THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche PhyMedExp INSERM U1046

L'hyperproduction de mucus est-elle un endotype des bronchopathies chroniques ?

Présentée par Jérémy CHARRIOT, MD

Le 10 décembre 2021

Sous la direction du Professeur Arnaud BOURDIN, MD, PhD
et du Professeur Nicolas MOLINARI, PhD

Devant le jury composé de

Professeur Christophe HIRTZ, PhD, Université de Montpellier	Président du Jury
Professeur Pascal CHANEZ, MD, PhD, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Professeur Bruno DEGANO, MD, PhD, Université de Grenoble-Alpes	Rapporteur
Dr. Dany JAFFUEL, MD, PhD, Université de Montpellier	Examinateur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

A mon père

Remerciements

Au Professeur Arnaud BOURDIN, MD, PhD, Université de Montpellier,

*Merci Arnaud pour ton soutien indéfectible tout au long de ses années, que ce soit pour ce projet, les autres ou au quotidien. Si un jour j'arrive à insuffler la passion pour la **P**neumologie avec autant de force que toi, je ne vais pas dire que je pourrais mourir heureux, mais cela représentera mon plus bel accomplissement professionnel.*

Au Professeur Nicolas MOLINARI, PhD, Université de Montpellier,

Intelligence, pertinence, réactivité, bienveillance : merci pour cette co-direction de thèse dans la bonne humeur ! Tu me ferais presque regretter de ne pas être statisticien. J'espère pouvoir encore collaborer longtemps avec toi.

Au Professeur Pascal CHANEZ, MD, PhD, Université d'Aix-Marseille,

Merci Professeur Chanez d'avoir accepté de juger mon travail, j'en suis honoré. Merci également de m'avoir ouvert l'esprit au fil des années grâce à vos questions tout aussi déstabilisantes que pertinentes.

Au Professeur Bruno DEGANO, MD, PhD, Université de Grenoble-Alpes,

Je suis honoré que vous ayez accepté de juger mon travail. Je suis convaincu que cette soutenance donnera lieu à de riches échanges grâce à votre expertise.

Au Professeur Christophe HIRTZ, PhD, Université de Montpellier,

Merci mille fois pour ton aide sur ce beau projet Christophe, et pour tes précieux conseils tout au long de cette thèse. C'est un plaisir et un honneur pour moi de t'avoir dans mon jury. Je suis sûr que nous aurons d'autres projets en communs et cela me ravit.

Au Dr. Dany JAFFUEL, MD, PhD, Université de Montpellier,

Dany, combien de vies as-tu-vécu pour m'apparaître comme un expert en toute chose (de la culture de la truffe aux analyses en composantes principales) ? Ou peut-être que je suis un aveugle et toi un sacré borgne…Je te remercie pour tes remarques toujours terriblement pertinentes.

Au Professeur Boris JUNG,

Merci Boris d'avoir accepté de m'accompagner dans cette thèse. J'espère que l'avenir nous réserve de nombreux projets en commun, mais je n'en doute pas trop ; après tout, la réanimation c'est aussi la preuve des limites de la pneumologie.

Au Dr. Isabelle VACHIER,

Un énorme merci pour ton soutien sans faille pendant toutes ces années, merci pour tout le cœur et l'énergie que tu investis dans ce laboratoire, merci pour tes conseils, ton expérience. Entre nous, merci aussi d'avoir accueilli l'amour de ma vie.

Merci à toute ***l'équipe de MedBioMed****, la recherche dans ces conditions, j'en redemande !*

Au Dr. Mathilde VOLPATO,

Pour ton travail, ton expertise sur le mucus, ta maîtrise de « R » et des plots dans tous leurs états.

A toutes celles et ceux *qui chercheront peut-être leur nom dans ces pages, et à celles et ceux qui ne chercheront pas mais qui de près ou de loin m'ont aidé,* **MERCI !** *(oui, je suis en retard pour rendre ce manuscrit).*

A ma maman, *les dernières années n'ont fait que renforcer tout l'amour et toute l'admiration que j'ai pour toi. Quelle chance de t'avoir à mes côtés ! (PS : désolé, je ne pense pas que tu afficheras un jour mon prix Nobel dans la maison, dommage ça aurait pu remplacer les photos de moi ado….)*

A ma « thésarde », moi ton « petit Master », *tu resteras le plus beau résultat de ma carrière scientifique ($p<0.00001$) : cette rencontre devant la hotte aspirante aura été inspirante (…) ! Tu es la seule personne qui me fasse encore perdre mes mots (les bons), à l'heure où j'écris ces lignes. Certes, nous n'avons qu'une vie, mais la mienne avec toi(+1) en vaut mille. Carpe diem, oui, mais vive la suite. Je t'aime.*

Table des matières

Remerciements---2
Table des matières ---4
Liste des illustrations---7
Abbréviations ---9
Résumé de la thèse---10
Thesis summary ---11
Partie A - Introduction---12
I. Le mucus des voies aériennes à l'état physiologique ---12
1. Rôle du mucus---12
2. Composition du mucus---12
3. Propriétés rhéologiques du mucus---14
a) Paramètres influençant la viscoélasticité du mucus---16
b) Autres propriétés rhéologiques et modèles physiopathologiques/expérimentaux ---17
4. Régulation de MUC5AC et MUC5B ---20
a) Production ---20
b) Sécrétion des mucines ---24
c) Dégradation et élimination des mucines ---27
II. Le mucus des voies aériennes en pathologies : hyperproduction, hypersécrétion, obstruction, exacerbations---29
1. Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ---29
a) Observations---29
b) Mécanismes physiopathologiques ---30
2. Asthme ---34
a) Observations---36
b) Mécanismes physiopathologiques ---37
3. Bronchectasies (hors mucoviscidose = bronchectasies non-CF (cystic fibrosis))---44
a) Microbiote, infection chronique, exacerbation et mucines---47
b) Hyperconcentration en mucines et hydratation du mucus ---49
c) Augmentation de la viscoélasticité du mucus---51
III. Outils d'analyse des expectorations et du mucus dans les pathologies bronchiques obstructives---53
« Sputum and mucus assessment tools for muco-obstructive lung diseases in 2021: Time to "unplug" from our daily routine ! » ---53
IV. Propriétés mucomodificatrices des thérapies « conventionnelles » actuellement disponibles chez l'homme dans les pathologies obstructives bronchiques---54
1. Principaux mucolytiques---54

2. Bêta-agonistes et Anticholinergiques inhalés ---- 55
3. Stéroïdes inhalés ---- 56
4. Stéroïdes oraux ---- 56
5. Anticorps monoclonaux ---- 57
a) Anti-Interleukine 5 et Anti-Interleukine 5R (Anti-IL-5/5R) ---- 57
b) Anti-Interleukine 4/13Ra (Anti-IL-4/13Ra) ---- 58
c) Anti-Thymic Stromal Lymphopoiétin (Anti-TSLP) ---- 59
6. Macrolides ---- 60
7. Thérapies « mucomodificatrices » non médicamenteuses ---- 61
a) Thermoplastie bronchique (TB) ---- 61
b) Dénervation bronchique ciblée ---- 62
Partie B - Présentation du travail de recherche ---- 64
I. Article 1 : Effet de l'exposition à la fumée de cigarette et de Club Cell Secretory Protein sur des cultures primaires d'épithélia bronchiques reconstitués *ex vivo* en interface air-liquide (ALI) de patients fumeurs et BPCO ---- 66
« Effect of Whole Cigarette Smoke exposure and Club Cell Secretory Protein supplementation on MUC5AC release in primary cultures of healthy smoker and COPD subjects » (soumis à "International Journal of COPD") ---- 66
II. Discussion ---- 68
1. Modèle d'exposition à la fumée de cigarette phase gazeuse et particulaire ---- 68
2. Hypersécrétion de mucines MUC5AC à *baseline* par les épithélia de BPCO ---- 68
3. CCSP diminue l'hypersécrétion de MU5AC induite par l'ATP ---- 69
4. Limites ---- 69
III. Article 2 : L'éosinophilie est prédite par la rhéologie des expectorations dans les pathologies obstructives bronchiques. ---- 71
Rheology predicts sputum eosinophilia in muco-obstructive lung diseases (soumis à "Chest") -- 71
IV. Discussion ---- 73
1. Propriétés viscoélastiques de l'expectoration et contenu en mucine ---- 73
2. Relation entre le stress critique Tau-c et l'éosinophilie de l'expectoration ---- 73
3. Rhéologie de l'expectoration, caractéristiques cliniques et résultats de la HRCT ---- 73
4. Limites ---- 75
5. Perspectives ---- 76
V. « COPD » CaRhe : Chronic airway disease, mucus rheology and exacerbations: a randomized controlled trial of COPD patients ---- 77
VI. COPD CaRhe : mesures de reproductibilité et de répétabilité multisites réalisées en réponse aux demandes formulées par l'ANSM le 20 Avril 2021 ---- 78
1. Abbréviations ---- 78
2. Objectif des essais ---- 78

3. Méthode ---- 78
a) Protocole des essais ---- 78
b) Méthode d'analyse des résultats ---- 79
4. Résultats ---- 80
a) Normalité ---- 80
b) Répétabilité et Reproductibilité ---- 81
5. Conclusion ---- 81
Conclusion et perspectives ---- 82
Références bibliographiques ---- 84

Liste des illustrations

Figure 1. Représentation « classique » de la couche de mucus des voies aériennes en deux phases GEL et SOL (microscopie électronique) 12
Figure 2. Structure glycoprotéique d'une mucine..... 13
Figure 3. Structure des polymères de mucines (4)..... 14
Figure 4. Représentation du comportement viscoélastique d'un fluide : l'état de droite représente un fluide dont la propriété visqueuse est prédominante 15
Figure 5. Evolution de paramètres rhéologiques (modules élastique G' et visqueux G'') en fonction de l'intensité de la force de déformation appliquée (strain ɤ). Le point de rupture atteint pour une contrainte critique donnée correspond au croisement des courbes de chaque module G' et G'' (données : Rhéonova) 16
Figure 6. Modèle « Gel-on-liquid » à gauche et « Gel-on-Brush » à droite (13) 18
Figure 7. Modèle Gel-on-Brush, de l'état le plus hydraté à gauche (A) vers le moins hydraté à droite (C), témoignant de l'impact du module osmotique (liée à l'hydratation du mucus) sur la clairance mucociliaire (12)..... 18
Figure 8. La « cohésivité » représente la force physique nécessaire pour rompre la couche de mucus, tandis que l'adhésivité représente la force nécessaire à appliquer afin de détacher cette couche de mucus de l'épithélium respiratoire 19
Figure 9. La membrane supportant la culture épithéliale est placée sur une lame de verre, au-dessus du milieu de culture. Une lamelle est placée sur la couche de mucus sécrété par l'épithélium. La chambre est scellée et placée à l'envers sur un microscope inversé.(17) 20
Figure 10. Epithélium de surface des voies aériennes, centré sur une glande sous-muqueuse (constituée de cellules séreuses et muqueuses)(19) 21
Figure 11. Synthèse des mucines MUC5AC et MUC5B le long des voies aériennes(20)..... 22
Figure 12. Facteurs et ligands influençant l'expression du gène MUC5AC (22) 23
Figure 13. Régulation de l'expression de MUC5B dans les voies aériennes 24
Figure 14. Sécrétion des mucines(18) 25
Figure 15. Ligands et leurs récepteurs à l'origine d'une stimulation de la sécrétion de mucines(25).. 26
Figure 16. Concentration en mucines MUC5B (A) et MUC5AC (B) chez des sujets contrôles et BPCO classés en fonction de la sévérité de leur trouble ventilatoire obstructif(3) 30
Figure 17. Régulation purinergique de l'hydratation du mucus et de sa clairance (40) 32
Figure 18. Asthme Th2-High (70)..... 35
Figure 19. Asthme Th2-Low (parfois appelé non-Th2)(72) 36
Figure 20. Colorations Alcian blue/periodic acid-Schiff (AB-PAS) d'épithélia provenant de poumons de patients (n = 2) décédés lors d'exacerbations d'asthme, mettant en évidence des glycoprotéines de mucine dans les grandes et petites voies respiratoires. Barres d'échelle, 500 µm et 100 µm dans les médaillons (trachée), 200 µm (bronches et bronchioles)(75). 37
Figure 21. Voie de signalisation IL-13/SPDEF/STAT6 (90) 39
Figure 22. Récepteur à l'IL-4 et à l'IL-13 (94)..... 40
Figure 23. Possible "cross-talk" entre les cellules musculaires lisses et l'épithélium bronchique (102) 42
Figure 24. Les images d'immunofluorescence d'un frottis d'expectoration d'un donneur asthmatique montrent que MUC5AC et MUC5B sont présentent dans le gel de mucus (F). Les images du plan de coupe révèlent une faible proportion de MUC5B comparativement à MUC5AC (G) (109)..... 43
Figure 25. Représentation de l'ancrage accrue à l'épithélium d'un mucus riche en MUC5AC dans l'asthme (79)..... 43
Figure 26. Tomodensitométrie thoraciques révélant des bronchectasies (118) 45

Figure 27. Algorithme de classification des bronchectasies non-CF(119)..... 46
Figure 28. Modèle physiopathologique proposé dans les bronchectasies non-CF (121) 47
Figure 29. Mucines dans les expectorations induites de personnes atteintes de bronchiectasie non-CF et de sujets témoins sains. (A) Quantification de MUC5B (mucine 5B) (Ai) et MUC5AC (Aii) par spectrométrie de masse marquée par un standard interne (128)..... 50
Figure 30. Cristaux de Charcot-Leyden dans un frottis d'expectoration visualisés en microscopie optique 58
Figure 31. TSLP et son impact sur l'immunité innée et adaptative au niveau de la muqueuse bronchique (189)..... 59
Figure 32. Potentiels effets des macrolides sur l'épithélium respiratoire 60
Figure 33. Procédure de thermoplastie bronchique a) La thermoplastie bronchique est réalisée à l'aide d'un bronchoscope b) Un cathéter est inséré dans une bronche proximale c) Le cathéter est ouvert in situ d) Le cathéter délivre une énergie thermique contrôlée (206)..... 61
Figure 34. Procédure de dénervation bronchique ciblée : Image de la console Nuvaira avec le cathéter dNerva dans le bronchoscope et le ballon réfrigérant extensible (210)..... 62
Figure 35. Corrélations entre la rhéologie et **a.** L'éosinophilie dans les expectorations **b.** mucus score tomodensitométrique (R^2 ajusté: 0.122 p-value: 0.01442), **c.** score CASA-Q (R^2 ajusté: 0.1305 p-value: 0.03065) et **d.** VEMS (FEV1) (R^2-ajusté: 0.02072 p-value: 0.1768). Points bleus: asthme, points rouges: BPCO, points verts: bronchectasies non-CF 74
Figure 36. Reproductibilité des mesures rhéologiques (Modulus élastique G', Module visqueux G'', et contrainte critique Tau-C) "intra-échantillon" 75
Figure 37. S1, S2, Sx...S12 échantillons et leurs données rhéologiques(G', G'', Tau-C) avant et après congélation. A. Représentation Graphique et B. Valeurs absolues 76
Figure 38. Normalité selon les cas testés..... 80
Figure 39. Résultats des données de répétabilité et de reproductibilité inter- et intra-sites 81

Abbréviations

ALI: Air-Liquid Interface

ARNm: Acide Ribonucléique Messager

BPCO : BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

CF: Cystic Fibrosis (Mucoviscidose)

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ENAC: Epithelial Na+ (Sodium) Channel

GINA: Global Initiative for Asthma

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

HBECs: Human Bronchial Epithelial Cells

IL-: Interleukine-

MUC: Mucin

NHBE: Normal Human Bronchial Epithelial cells

PCR : Polymerase Chain Reaction

SPDEF: SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor

STAT6 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 6

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoetin

VEMS : Volume Expiré à la 1ère Seconde

Résumé de la thèse

Le mucus des voies aériennes, cette barrière physiologique aux multiples facettes, est significativement impacté dans sa structure, ses propriétés biophysiques, ses fonctions et dans ses mécanismes de régulation dans les pathologies bronchiques chroniques obstructives. De ces observations, le néologisme « muco-obstructives » a même été forgé pour désigner des maladies aux mécanismes physiopathologiques pourtant distincts, tels que l'asthme, la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), ou encore les bronchectasies (hors mucoviscidose, appelées non-CF).

A l'heure actuelle, la médecine dite de précision entreprend de dépasser le stade du phénotypage clinique des maladies pour évoluer vers des déterminations plus fines sous-tendues par des mécanismes biologiques communs, les *endotypes*. A l'instar de certains types d'inflammation des voies aériennes (par ex. l'inflammation de type Th2 dans l'asthme), nous pouvons nous demander si les dysrégulations de la production et/ou de la sécrétion du mucus observées dans les pathologies bronchiques obstructives ne représenteraient pas un endotype à part entière de ces dernières, avec à la clé des stratégies diagnostiques voire des opportunités thérapeutiques innovantes.

Notre travail s'est attaché dans un premier à présenter les arguments sous-tendant cette hypothèse dans l'asthme, la BPCO et les bronchectasies non-CF. Nous avons ensuite passé en revue les outils à notre disposition en 2021 nous permettant de caractériser le mucus des voies aériennes. Dans la continuité de cela, nous avons élaboré un modèle d'exposition à la fumée de cigarette « *whole smoke* » d'épithélia bronchiques reconstitués *ex vivo* et cultivés en interface air-liquide, issus de patients fumeurs et BPCO. Dans le même temps nous nous sommes intéressés aux propriétés biophysiques du mucus et avons déterminé certaines variables à même d'influencer sa rhéologie en situation pathologique chez l'humain : mucines et éosinophiles sont les principaux acteurs de ce travail. Cela nous a permis *in fine* d'élaborer un protocole de recherche translationnelle se basant sur la « rhéométrie au lit du malade » pour tenter de guider la prescription de traitement « mucomodificateur » dans la BPCO.

Thesis summary

Airway mucus is a physiological barrier which is significantly impacted in its structure, biophysical properties, functions and regulation mechanisms in chronic obstructive pulmonary diseases. From these observations, the neologism "muco-obstructive" has even been coined to describe diseases with distinct pathophysiological mechanisms, such as asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), or bronchiectasis (excluding cystic fibrosis, called non-CF).

At present, the so-called *precision medicine* is moving beyond the stage of clinical phenotyping of diseases towards more refined determinations underpinned by common biological mechanisms, the *endotypes*. Following the example of certain types of airway inflammation (e.g., Th2-type inflammation in asthma), we can ask ourselves whether the dysregulations of mucus production and/or secretion observed in obstructive disease might be an endotype. It would involve diagnostic strategies and even innovative therapeutic opportunities.

We first presented the arguments underlying this hypothesis in asthma, COPD and non-CF bronchiectasis. We then reviewed the tools available in 2021 to characterise airway mucus. In continuation of this, we developed a "*whole smoke*" model of ex vivo reconstituted bronchial epithelia cultured at an air-liquid interface from smokers and patients with COPD. At the same time, we were interested in the biophysical properties of mucus and determined certain variables that can influence its rheology in pathological situations in humans: mucins and eosinophils are the main players in this work. This allowed us to develop a translational research protocol based on "bedside rheometry" assessment to guide the prescription of "mucomodifying" treatment in COPD.

Partie A - Introduction

I. Le mucus des voies aériennes à l'état physiologique

1. Rôle du mucus

Le mucus a un rôle physiologique d'humidification des voies aériennes, de barrière physique et immunologique, et participe au transport mucociliaire. Il possède des propriétés physiques exceptionnelles comme sa viscoélasticité, une rhéologie adaptative et une capacité d'autoréparation, et constitue donc un milieu idéal pour piéger et immobiliser les agents pathogènes et toxiques extérieurs et servir de barrière aux infections microbiennes. Ce rôle primordial explique sa conservation au cours de l'évolution de différentes espèces, depuis les coraux jusqu'à l'homme (1).

2. Composition du mucus

Chez le sujet sain, le mucus des voies aériennes est composé à 98% d'eau, 0.9% de sel, 0.8% de protéines globulaires et 0.3% de polymères de haut poids moléculaires (2). Même si nous verrons plus loin que la réalité est probablement plus complexe ***(cf. paragraphe I.3.b),*** ce mucus est classiquement représenté comme étant composé de deux phases, l'une dite « sol » (ou liquide péri ciliaire) dans laquelle baignent les cils, et l'autre dite « gel », constituée principalement de glycoprotéines polymérisées, les mucines **(*Figure 1.*)**.

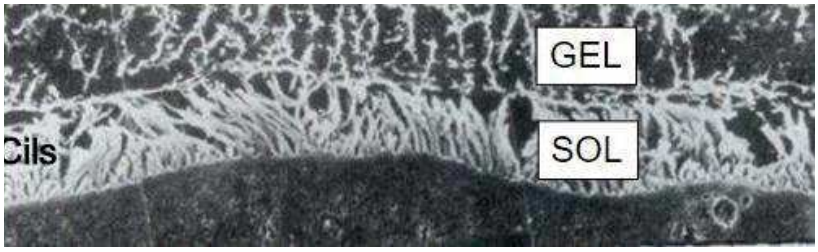
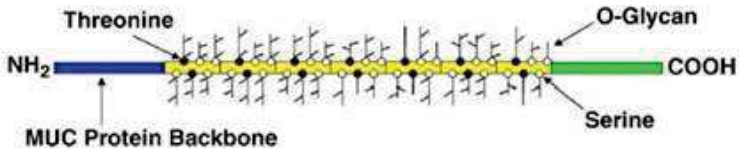


Figure 1. Représentation « classique » de la couche de mucus des voies aériennes en deux phases GEL et SOL (microscopie électronique)

Ces dernières sont de larges glycoprotéines (0.2 à 10micronm pour un seul polymère et environ 400 kDa) qui possèdent des régions riches en résidus sérine et thréonine pouvant se lier par O-Glycosylation à des chaînes glycaniques **(*Figure 2.*)**.



- Noyau protéique (NH2, Tamdem Repeat, COOH)
- Sucres: O glycanes (Ser/Thr)

Figure 2. Structure glycoprotéique d'une mucine

Il existe plusieurs gènes (gènes MUCs) codant pour des mucines distinctes et seules sept d'entre elles sont sécrétées (MUC1, MUC4, MUC16, MUC20, MUC5AC, MUC5B, MUC7). Seules certaines de ces mucines sécrétées peuvent se polymériser en formant des ponts disulfures prenant ainsi part à la formation d'un gel **(*Figure 3.*)**. MUC5AC et MUC5B sont de loin les deux mucines les plus représentées dans les voies aériennes et feront l'objet de nos recherches. Dans l'épithélium respiratoire, Kesimer et al. ont montré que les mucines MUC5B étaient prédominantes (3); les principales limites potentielles de cette observation, et d'ailleurs de toutes celles concernant le mucus, concernent la méthodologie de recueil des échantillons d'expectoration (ici expectoration induite dans la cohorte SPIROMICS) ainsi que les critères qualité d'un échantillon, et par conséquent l'extrapolabilité des résultats,. Nous verrons ces limites plus en détail dans le ***chapitre III***.

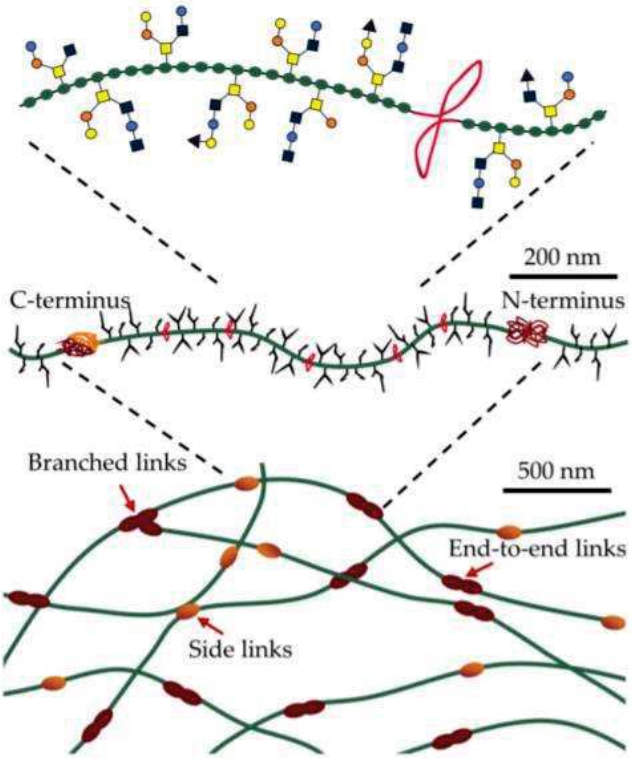


Figure 3. Structure des polymères de mucines (4)

3. Propriétés rhéologiques du mucus

La structure des mucines conditionne les propriétés physiques du gel de mucus qu'elles constituent. Celui-ci se comporte comme un fluide présentant à la fois une certaine viscosité (résistance d'un fluide à l'écoulement) et élasticité (propriété d'un fluide à reprendre sa forme initiale) ***(Figure 4.)***. Ces propriétés dites « viscoélastiques » ont un impact dans la physiopathologie, la présentation clinique et le pronostic de maladies bronchiques obstructives ***(cf. chapitre II)***. La rhéologie, domaine de la science étudiant l'écoulement des fluides, s'applique particulièrement à l'observation des comportements du mucus.

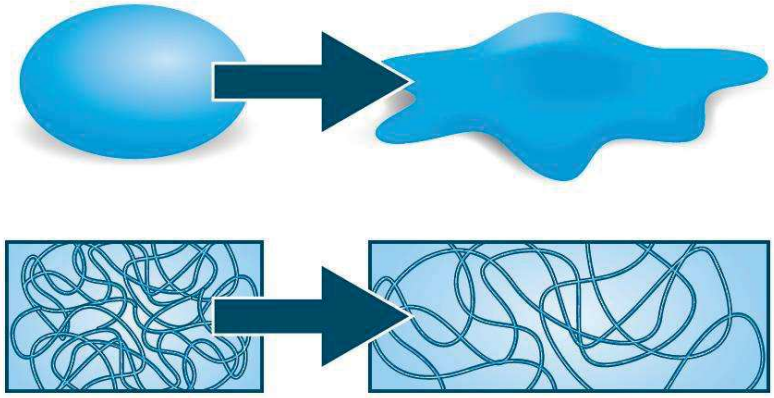


Figure 4. Représentation du comportement viscoélastique d'un fluide : l'état de droite représente un fluide dont la propriété visqueuse est prédominante

Afin de s'adapter aux différents besoins physiologiques d'un sujet, la structure du réseau de mucines est capable de se modifier de façon réversible grâce à des interactions de faible énergie. La nature de ces interactions entre mucines peut être déterminée par l'analyse de la réponse du mucus à une contrainte (un cisaillement ou une oscillation) d'intensité contrôlée. La contrainte exercée sur le fluide tend à désorganiser sa structure. Cependant, dans le cas de fluides viscoélastiques comme le mucus, sa composante élastique tend à ramener sa structure moléculaire vers sa conformation initiale.

À de basses fréquences ou intensités de contrainte, le mucus est dominé par des forces élastiques. Ainsi, après chaque déformation, la structure moléculaire du mucus retrouve sa conformation initiale. En augmentant la fréquence ou l'intensité de la contrainte, la structure du mucus se désorganise mais ne peut se reformer, elle a atteint son *point de rupture* (*crossover point*); le régime visqueux domine alors le régime élastique, et le gel s'écoule. En diminuant la fréquence ou l'intensité de la contrainte, le phénomène inverse se produit, le mucus reforme alors un gel lorsque la force de cisaillement diminue. Ce processus est appelé *recouvrement*. Le fait que la force exercée pour obtenir le point de rupture et le recouvrement soient quasi-identiques montre que le mucus est un gel physique qui est en partie maintenu par des interactions réversibles (5).

Ainsi le mucus peut être caractérisé par différents paramètres physiques rhéologiques, dont les principaux sont ***(Figure 5.)*** :

- module d'élasticité (ou de conservation) = G '
- module de viscosité (ou de perte) du mucus = G''
- contrainte critique = σc (σc = $\sqrt{2G_c'\gamma_c}$, où γ est l'intensité de la déformation exercée pour atteindre le point de rupture)

Ces paramètres sont obtenus grâce à des rhéomètres qui analysent le mucus à différents niveaux de précision : c'est pourquoi on parle de *micro-rhéologie* et de *macro-rhéologie*. Ces méthodes seront développées dans le ***chapitre III*** sur les outils d'analyses des expectorations et du mucus.

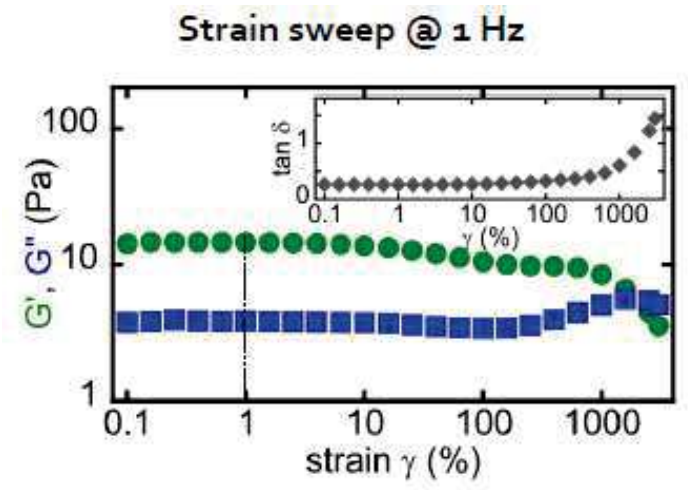


Figure 5. Evolution de paramètres rhéologiques (modules élastique G' et visqueux G'') en fonction de l'intensité de la force de déformation appliquée (strain ɣ). Le point de rupture atteint pour une contrainte critique donnée correspond au croisement des courbes de chaque module G' et G'' (données : Rhéonova)

a) *Paramètres influençant la viscoélasticité du mucus*

- L'environnement ionique : la concentration en ions calcium et sodium génère des mouvements d'eau influant sur l'osmolarité du mucus et donc sur son réseau. In vitro, une augmentation de l'osmolarité du mucus par apport de NaCl provoque une augmentation de sa viscoélasticité.

- Le pH : Il existe une forte corrélation entre les propriétés viscoélastiques du mucus et son pH. A pH plus acide, les interactions entre les parties hydrophobes des mucines sont favorisées ce qui augmente la polymérisation et la réticulation du gel. De plus, dans les voies aériennes, le pH influence les propriétés bactéricides du mucus. Il est diminué par les polluants acides, les micro-inhalations dues au reflux gastrique ainsi que dans certaines maladies (mucoviscidose)(6).

- La concentration des mucines gélifiantes : Georiades et al. ont démontré, par analyse de la diffusion de microparticules dans le gel de mucus, que les mucines forment un gel organisé en réseau seulement à partir d'une certaine concentration critique (7). La transition vers l'état visqueux de ce gel se fait elle pour des concentrations plus élevées, à partir desquelles les mucines s'associent en un réseau de glycoprotéines, les chaînes glycaniques des mucines formant alors des interdigitations qui augmentent la viscosité du gel. Ce lien entre réticulation et viscoélasticité est particulièrement étudié afin de créer des agents mucolytiques capables de « dépolymériser les mucines » et ainsi diminuer la viscosité trop élevée du mucus dans certaines pathologies.

- La structure des mucines: L'organisation N-terminale distincte de MUC5AC (par laquelle se fait notamment la polymérisation entre les protéines de mucines) peut expliquer les propriétés viscoélastiques uniques et plus adhésives des gels de MUC5AC, qui sont extrêmement ramifiés et hautement réticulés comparativement au gels de MUC5B (8). Autre exemple de l'impact de la structure, MUC5B présente 2 « glycoformes », une MUC5B « low-charge » et une MUC5B « high-charge », se distinguant par une différence de glycosylation (sulfation), une différence de charge électrique et un comportement physique à part (9,10).

- Protéines non mucines : Des molécules non-mucines, notamment des protéines riches en proline, TFF1 (trefoil factor 1) et des kératines, contribuent probablement à l'assemblage des mucines, bien que leur rôle ne soit pas clairement défini (11).

b) *Autres propriétés rhéologiques et modèles physiopathologiques/expérimentaux*

Dans le modèle de transport du mucus « Gel-Sol » (appelé aussi-Gel-on-liquid), le gel de mucus est propulsé au-dessus d'une couche périciliaire "aqueuse" entourant les cils. Selon les équipes de Brian Button et de Richard C. Boucher du *Marsico Lung Institute*, ce modèle ne permet pas d'expliquer la formation d'une couche de mucus distincte en situation physiologique, ni pourquoi la clairance est altérée en situation pathologique. Ils proposent un modèle « Gel-on-Brush » (Gel sur Brosse) dans lequel la couche périciliaire est occupée par des mucines (MUC1, MUC4, MUC16) et des mucopolysaccharides densément attachés à la surface des voies respiratoires ***(Figure 6.)*** (12).

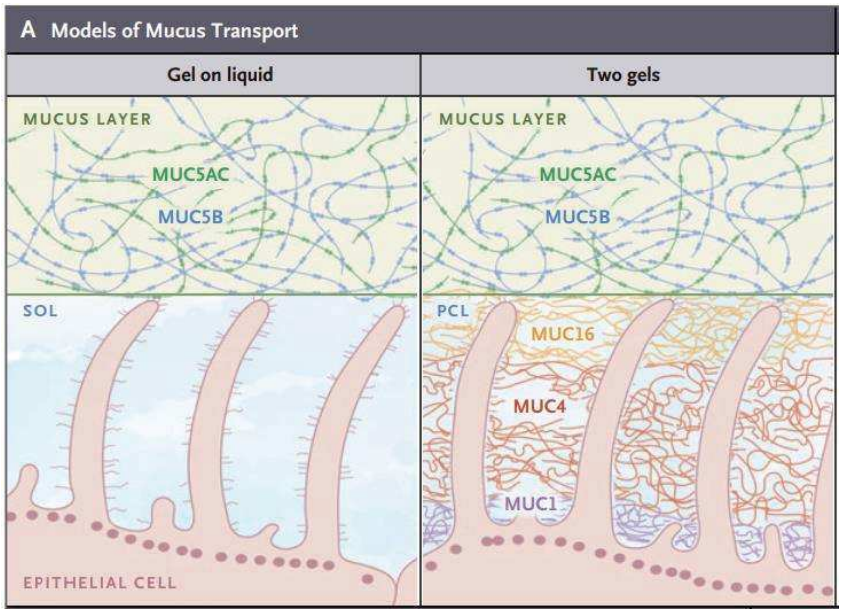


Figure 6. Modèle « Gel-on-liquid » à gauche et « Gel-on-Brush » à droite (13)

Cette brosse empêche la pénétration du mucus dans l'espace périciliaire et lui permet de former une couche distincte. Ils ont aussi démontré dans leur modèle qu'un état de déshydratation avancé du mucus, dans lequel le « *module osmotique » (K)* du mucus et de la couche périciliaire est très élevé, correspondait aux situations d'altération du transport mucociliaire rencontrées en pathologie humaine ***(Figure 7.)***.

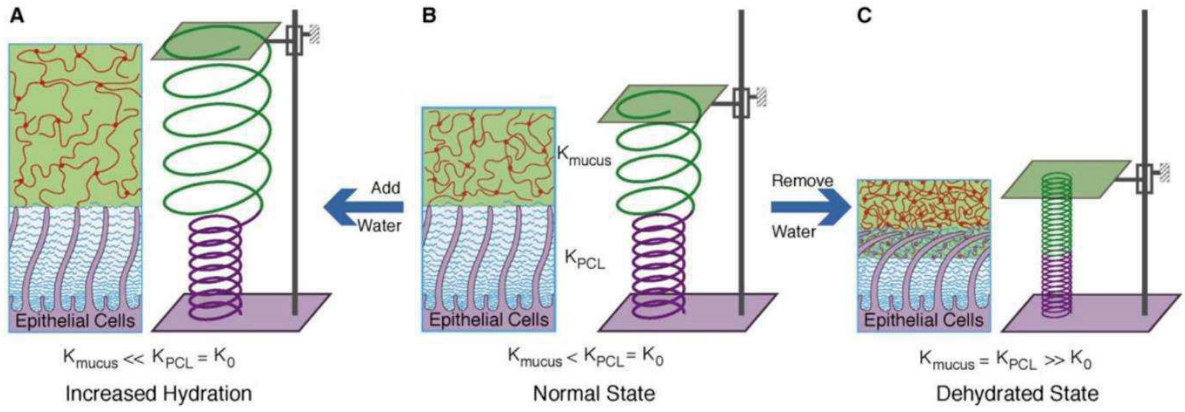


Figure 7. Modèle Gel-on-Brush, de l'état le plus hydraté à gauche (A) vers le moins hydraté à droite (C), témoignant de l'impact du module osmotique (liée à l'hydratation du mucus) sur la clairance mucociliaire (12)

Le comportement du mucus peut aussi être abordé du point de vue de sa *« cohésivité »* et de son *« adhésivité »*. Ainsi, la même équipe a mis au point un modèle expérimental permettant de tester ces paramètres pertinents dans l'étude de la toux, mécanisme de secours par excellence de la clairance du mucus dans les pathologies bronchiques obstructives ***(Figure 8.)*** (14).

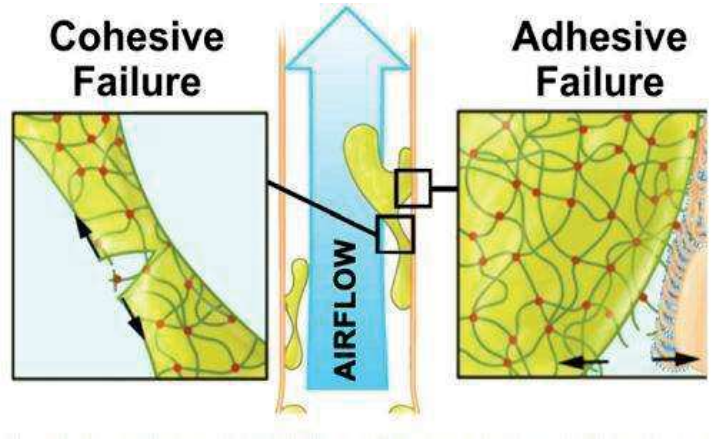


Figure 8. La « cohésivité » représente la force physique nécessaire pour rompre la couche de mucus, tandis que l'adhésivité représente la force nécessaire à appliquer afin de détacher cette couche de mucus de l'épithélium respiratoire

Notre équipe a quant à elle une expertise dans la culture en interface AIR-LIQUIDE (ALI) d'épithélia reconstitués ex vivo à partir de biopsies bronchiques de patients (15,16). Au cours de son doctorat, afin de disposer d'un modèle expérimental d'analyse rhéologique du mucus en fonction de différents paramètres, Myriam Jory et son équipe ont pu mettre au point une méthode d'analyse micro rhéologique du mucus sécrété par de tels épithélia ***(Figure 9.)*** (17). Cette méthode s'appuyant sur des micro-sondes permet de détecter le comportement du fluide à différents niveaux d'épaisseur de la couche du mucus reposant sur son épithélium. L'intérêt de ce modèle expérimental est d'étudier l'impact de pathologies ou de thérapeutiques sur le comportement micro rhéologique du mucus sécrété par des épithélia issus de patients. Les principales limites sont inhérentes à la microrhéologie elle-même, à savoir la variabilité des mesures selon le niveau de profondeur et la proximité de débris cellulaires en provenance de la culture.

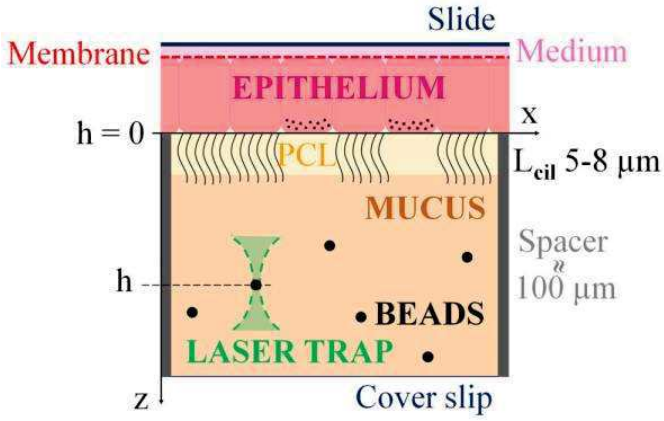


Figure 9. La membrane supportant la culture épithéliale est placée sur une lame de verre, au-dessus du milieu de culture. Une lamelle est placée sur la couche de mucus sécrété par l'épithélium. La chambre est scellée et placée à l'envers sur un microscope inversé.(17)

4. Régulation de MUC5AC et MUC5B

Bien que partageant de nombreuses caractéristiques structurelles, les mucines MUC5AC et MUC5B présentent quelques différences en termes de production, mais aussi de fonction. Dans les chapitres et paragraphes suivants, nous ferons la distinction entre ce qui relève de la production (expression/transcription) et de la sécrétion (exocytose des granules contenant les mucines formées).

a) *Production*

i. Sites de production

Les cellules sécrétrices de l'épithélium respiratoire dit de surface (cellules caliciformes, cellules club) et les glandes sous-muqueuses, sont les principaux sites d'expression des mucines MU5AC et MUC5B ***(Figure 10.)***. Les cellules muqueuses de ces glandes, qui les constituent à environ

60%, participent à près de la moitié du stock de mucus global des voies aériennes (18).

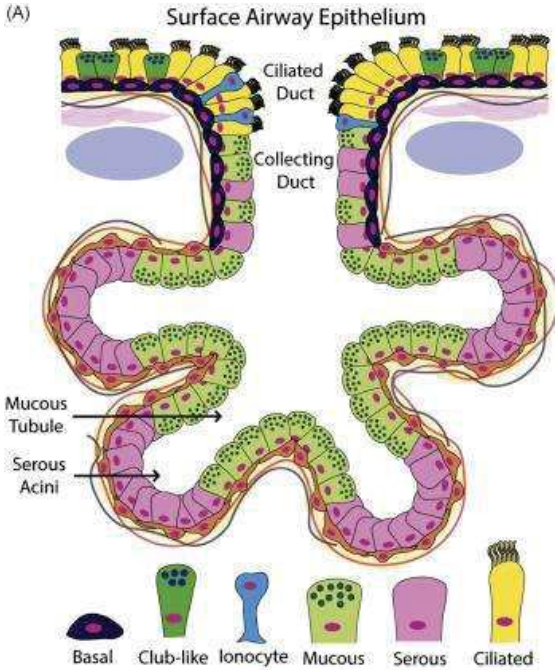


Figure 10. Epithélium de surface des voies aériennes, centré sur une glande sous-muqueuse (constituée de cellules séreuses et muqueuses)(19)

Des données relativement récentes issues d'études sur des modèles murins et humains ont permis de déterminer la distribution le long de l'arbre respiratoire des cellules sécrétrices des mucines MUC5AC et MUC5B (20). Ainsi MUC5B est la principale mucine sécrétée par l'épithélium et les glandes sous-muqueuses, et ce de façon prédominante au niveau des voies aériennes distales ***(Figure 11.)***.

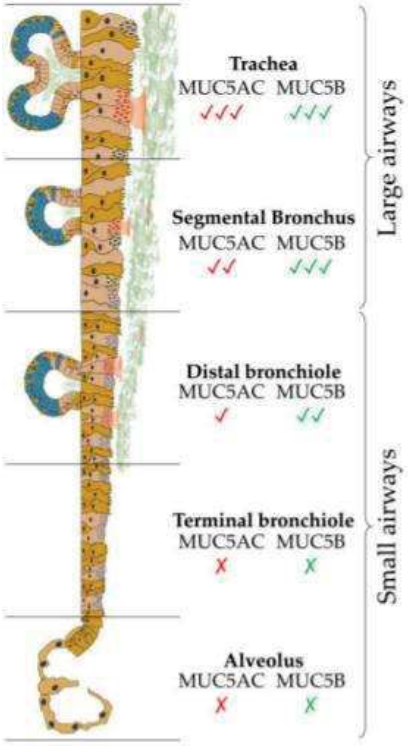


Figure 11. Synthèse des mucines MUC5AC et MUC5B le long des voies aériennes(20)

ii. Synthèse des mucines MUC5B et MU5AC et facteurs de transcriptions

Le gène MUC5B est situé près de celui de MUC5AC sur le chromosome 11p15.5 (21). La polymérisation des mucines est initiée dans le réticulum endoplasmique où elles forment des dimères (pour MUC5AC et MUC5B) assemblés par des ponts disulfures, avant d'être adressées au réseau transgolgien pour subir des modifications post-transcriptionnelles et former de longs polymères linéaires. Les mucines ainsi polymérisées sont ensuite condensées puis stockées dans des granules de sécrétion qui vont s'accumuler dans la région sous-apicale des cellules muco-sécrétantes (5).

De par l'ouverture vers l'extérieur de l'épithélium respiratoire et le rôle de barrière du mucus, une myriade de signaux intra- et extra-cellulaires régulent l'expression des mucines. De nombreux mécanismes transcriptionnels ont ainsi été proposés comme pouvant influencer l'expression de MUC5AC. Voynow et al. ont tenté de résumer cela ***(Figure 12.)*** (22). Nous noterons notamment la voie de stimulation par la fumée de cigarette, les voies de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ainsi que celle de l'interleukine-13 (IL-13).

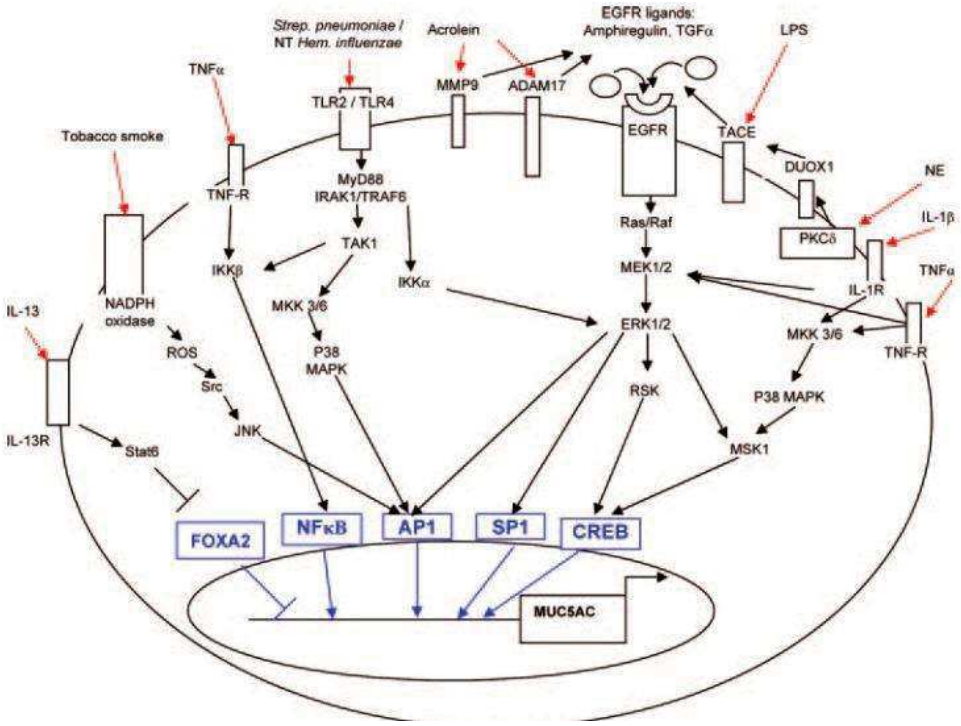


Figure 12. Facteurs et ligands influençant l'expression du gène MUC5AC (22)

Concernant MUC5B, sa régulation est moins connue que celle de MUC5AC car jusqu'à peu cette mucine était considérée comme moins présente dans les voies respiratoires et ayant un impact physiopathologique moindre. Outre les travaux d'Okuda cités précédemment, ceux de l'équipe de Roy et al. ont montré pourtant que la mucine MUC5B, et non pas MU5AC, était requise pour la clairance mucociliaire, pour le contrôle des infections des voies aériennes et pour le maintien de l'homéostasie immunitaire dans des poumons de souris (modèles de souris KO muc5b -/-). L'intérêt pour cette mucine est grandissant aussi dans le monde de la pathologie interstitielle, que ce soit dans les pneumopathies d'hypersensibilité chronique, la fibrose pulmonaire idiopathique ou bien les pneumopathies interstitielles liées à la polyarthrite rhumatoïde. Par ex., Hancock et al. ont démontré chez la souris que la concentration de MUC5B dans l'épithélium bronchiolo-alvéolaire était directement reliée à la qualité de la clairance mucociliaire mais aussi à la persistance et à l'extension de la fibrose pulmonaire(23).

Ces travaux apportent ainsi progressivement de la lumière sur les mécanismes transcriptionnels de MUC5B. Outre les méthylations et mutations de son gène, en particulier dans la région de son promoteur, plusieurs sites de fixation de facteurs transcriptionnels ont été identifiés, notamment *FOXA2* (forkhead box A2), *AP-1* (activator protein 1 transcription factor), *Sp1, NF-κB, TTF-*

1, STAT, c-Myc, etc…(24). Cependant, seule l'implication d'une poignée de facteurs sur l'expression de MUC5B a été testée de manière expérimentale.

D'autres voies de régulation impliquant certaines cytokines (*IL-1Bêta, IL-6, IL-13 et IL-17A*) induisent l'expression de MUC5B. Certains composants bactériens, notamment les lipopolysaccharides (*LPS*) et les entérotoxines staphylococciques, peuvent aussi induire une up-régulation de MUC5B ; pour les entérotoxines, cela passe par l'activation de *X-box binding protein 1 (XBP-1*), *acting transcription factor 6 (ATF6)*, *et CCAAT-enhancer-bonding protein homologous protein (CHOP)*, tandis que pour les LPS cela passerait par l'activation du *Toll-Like Receptor 4 (TLR4)* et de ses voies de signalisation d'aval, notamment *ERK1/2* et *p38 MAPK*.

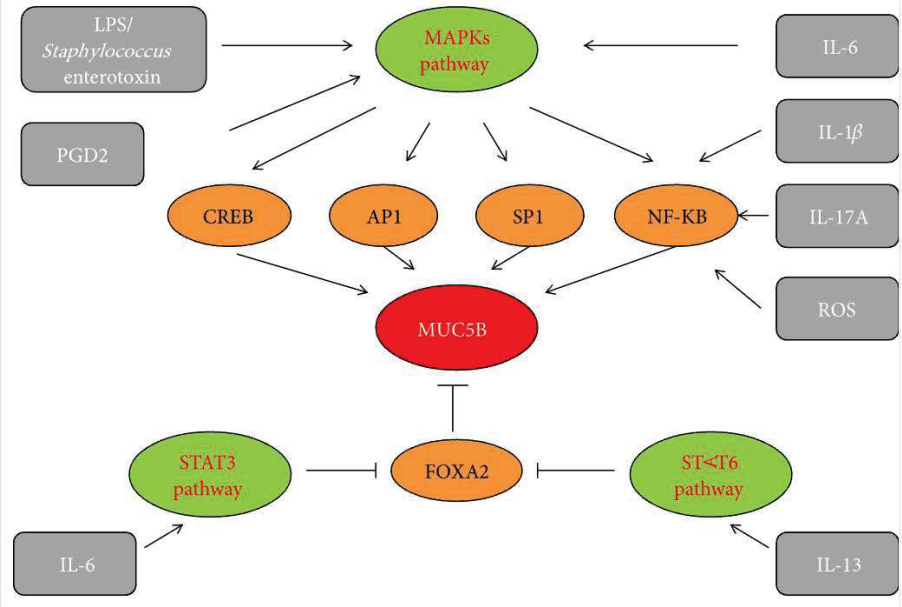


Figure 13. Régulation de l'expression de MUC5B dans les voies aériennes

b) *Sécrétion des mucines*

i. Exocytose des granules de mucines

Les mucines polymérisées matures sont stockées dans de larges granules dans les cellules sécrétrices. Elles sont sécrétées continuellement à bas bruit, mais cette sécrétion peut être amplifiée secondairement à des stimuli.

Ces granules sont amarrées à la membrane plasmique par l'interaction d'une protéine *Rab* (liée à la granule) avec une protéine effectrice qui agit comme un pont avec la protéine *Munc18*. *Munc18*

assure la conformation « fermée » de la Syntaxine qui est ancrée à la membrane plasmique. L'exocytose des granules est induite, à l'état de base, par de faibles niveaux d'activation des récepteurs purinergiques *P2Y2* et *Adénosine 3* par de l'ATP extracellulaire relargué de manière paracrine (et par son métabolite, l'adénosine). Les récepteurs activés sont couplés à la phospholipase C par la protéine Gq, qui par clivage génère du *Di-acyl-glycérol (DAG*) et *de l'Inositol triphosphate (IP3*). Le *DAG* active *Munc13* pour ouvrir la *Syntaxine* afin qu'elle puisse former un complexe *SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)* avec *SNAP-23 (synaptosomal-associated protein 23*) et *VAMP (vesicle-associated membrane protein)*, rapprochant la membrane plasmique de celle des granules. L'IP3 induit la libération de calcium par les récepteurs *IP3 (IP3R)* dans le réticulum endoplasmique, activant la *Synaptotagmine* pour induire l'enroulement final du complexe *SNARE*, ce qui aboutit à la fusion des membranes et à la libération des mucines ***(Figure 14.)*** (18,25).

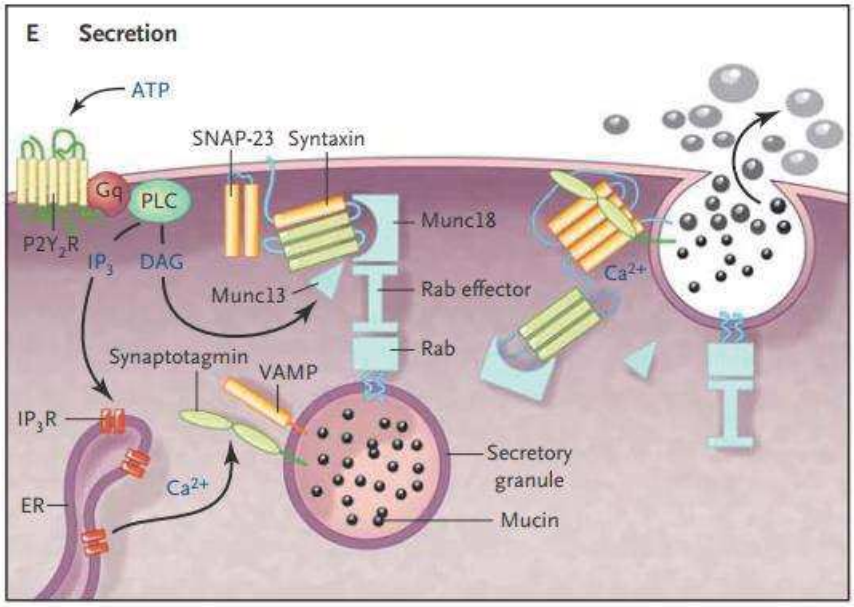


Figure 14. Sécrétion des mucines(18)

A noter que les mucines sont stockées sous une forme déshydratée dans les granules et peuvent ensuite « gonfler » jusqu'à 100 fois leur volume initial une fois dans l'espace extra-cellulaire.

ii. Régulation de la sécrétion des mucines et implication en expérimentation

Le taux basal de sécrétion semble correspondre au taux basal de synthèse des mucines dans les voies aériennes distales humaines ; sans signal de stimulation à l'état de base, il est donc difficile

de détecter des mucines intracellulaires en immunohistochimie. De plus, un défect dans la sécrétion de mucines peut aussi se traduire par une accumulation intracellulaire de mucines sans augmentation de la production. Certaines équipes souhaitant étudier la sécrétion ont donc tablé sur des modèles produisant de fortes quantité de mucus (métaplasie muqueuse) grâce à un challenge allergénique, par exemple par installation d'ovalbumine ou d'interleukine-13 dans les modèles murins (26). La stimulation de la sécrétion peut alors être étudiée grâce à l'utilisation d'agonistes tels que l'ATP. D'autres ligands ont été étudiés et sont résumés dans la ***(Figure 15.).***

Ligand	Receptor; site of action	Reference
ATP, UTP	P_2Y_2; epithelium	Chen et al. (68), Danahay et al. (49), Ehre et al. (37), Kemp et al. (69), and Kim and Lee (70)
Adenosine	A3AR; epithelium (in mice but not humans, dogs, or guinea pigs)	Young et al. (62)
Proteases	PAR1, PAR2, other; epithelium	Breuer et al. (71), Jones et al. (47), Liu et al. (72), and Park et al. (39)
Acetylcholine	Unknown; may be indirect	Singer et al. (34)
Histamine	Unknown; may be indirect	Huang et al. (73)
Serotonin	Unknown; may be indirect	Foster et al. (36)
Capsaicin (substance P)	NK1; may be indirect	Guo et al. (74) and Kuo et al. (75)
Ionomycin (calcium)	Syt2, Munc13, PKC, other; epithelium (intracellular)	Danahay et al. (49), Ehre et al. (37), Tuvim et al. (46), and Zhu et al. (18)
PMA	Munc13-2, PKC; epithelium (intracellular)	Danahay et al. (49), Ehre et al. (37), and Zhu et al. (18)

Figure 15. Ligands et leurs récepteurs à l'origine d'une stimulation de la sécrétion de mucines(25)

Le contrôle « moteur » de la sécrétion du mucus est lui aussi notable, en particulier la voie du système nerveux cholinergique dirigée par le nerf vague. Elle représente le stimulus nerveux dominant dans la sécrétion des mucines, principalement au niveau des glandes sous-muqueuses des voies respiratoires basses (27). La réponse à la stimulation cholinergique se fait en grande partie par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques M3, la sécrétion d'eau étant médiée par les récepteurs M1 (28). Les récepteurs Bêta-adrénergique ont quant à eux un rôle controversé chez l'humain concernant la sécrétion de mucines, mais lorsqu'ils sont stimulés par des médicaments bêta-agonistes, cela augmente la fréquence des battements ciliaires, facilitant ainsi le transport mucociliaire(29).

Toutefois, le tableau est probablement plus complexe. En effet, il est intéressant de remarquer que les bêta-agonistes inhalés sont capables d'induire un relargage d'acétylcholine via des récepteurs bêta2 présents au niveau des terminaisons parasympathiques, tandis que certains anticholinergiques inhalés peuvent aussi induire cela via une action sur les récepteurs muscariniques M2 (neurones inhibiteurs, capables d'induire une bronchoconstriction vagale). Bloquer totalement et non sélectivement les récepteurs M2 semble donc contre-productif. Les derniers médicaments anticholinergiques inhalés (Aclidinium bromide, Glycopyrrolate, etc…) sont ainsi développés avec l'idée de présenter une sélectivité accrue pour les récepteurs M3, et diminuée pour les récepteurs M2

(30). Cela est parait plus important dans la BPCO, maladie dans laquelle les récepteurs M2 sont tout à fait fonctionnels (31), que dans l'asthme dans lequel leur fonctionnalité parait réduite voire abolie (32).

c) *Dégradation et élimination des mucines*

Le turn-over du mucus est assuré essentiellement par la clairance mucociliaire et par la toux. La dégradation du mucus sécrété par des protéases endogènes ou bactériennes en est aussi un élément clé (33). En situation pathologique, notamment pendant les exacerbations de pathologies bronchiques obstructives, une des voies de résolution de ces épisodes est celle de l'autophagie ; son activation par l'inhibition de mTor permet de réduire le contenu intracellulaire en granules de mucines (34).

Nous venons d'aborder les mécanismes de production et de sécrétion d'un des principaux constituant du mucus, les mucines. Cela va nous permettre d'appréhender les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les principales maladies bronchiques, à savoir l'asthme, la BPCO et les bronchectasies (hors mucoviscidose). Bien qu'il apparaisse évident que l'altération de la régulation du mucus (production/sécrétion/composition) ne peut expliquer à elle seule toutes ces pathologies, c'est cet angle d'attaque que nous avons choisi de développer afin d'élaborer ensuite nos hypothèses de travail.

II. Le mucus des voies aériennes en pathologies : hyperproduction, hypersécrétion, obstruction, exacerbations

Bien qu'hétérogènes, la plupart de ces maladies appelées « muco-obstructives » par Richard C. Boucher (13) présentent la plupart des caractéristiques suivantes :

- Mucus « hyper »concentré en mucines (par hyperabsorption d'eau et/ou hypersécrétion de mucus)
- Altération de la fonction ciliaire
- Modification des paramètres rhéologiques du mucus (viscoélasticité, adhésivité, cohésivité)
- Toux possiblement inefficace

Les données autopsiques, de micro-scanner (micro-CT) et les études fonctionnelles ont aussi mis en évidence un trait commun : une atteinte précoce des voies aériennes distales.

1. Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

a) *Observations*

La BPCO, entité notamment définie par des symptômes respiratoires et un trouble ventilatoire obstructif, est une maladies chronique dans laquelle l'atteinte première bronchiolaire (réduction du nombre et du calibre) précède l'atteinte emphysémateuse (destruction des parois alvéolaire)(35). La sécrétion de mucus y est augmentée, ce qui participe à l'obstruction des voies aériennes distales. Celle-ci est corrélée à la sévérité du trouble ventilatoire obstructif ainsi qu'à la mortalité(36).

Récemment, Kesimer et al. ont mesuré par chromatographie et réfractométrie la concentration totales en mucines ainsi que les concentrations spécifiques en mucines MUC5AC et MUC5B par spectrométrie de masse dans des expectorations induites de patients de la cohorte SPIROMICS (*Subpopulations and Intermediate Outcomes Measures in COPD Study*) (3). L'équipe a notamment démontré que les concentrations absolues en mucines MUC5B et MUC5AC de patients BPCO sévères (définis ainsi selon l'intensité de leur trouble ventilatoire obstructif selon les critères des recommandations internationales GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) (37)) étaient respectivement 3 à 10 fois supérieures à celles de sujets contrôles qui n'avaient jamais fumé ***(Figure 16.)***. Fait notable, la concentration totales en mucines, décrite comme prédictive de la « bronchite chronique » (toux et expectorations pendant 3 mois sur 2 années consécutives), n'atteignait pourtant une aire sous la courbe que de 0.72 ([IC=0.65-0.79], soulignant la faiblesse de ce

symptôme dont la prévalence dans la BPCO est extrêmement variable selon les études (de 7.4% à 74%), témoin de sa subjectivité(38).

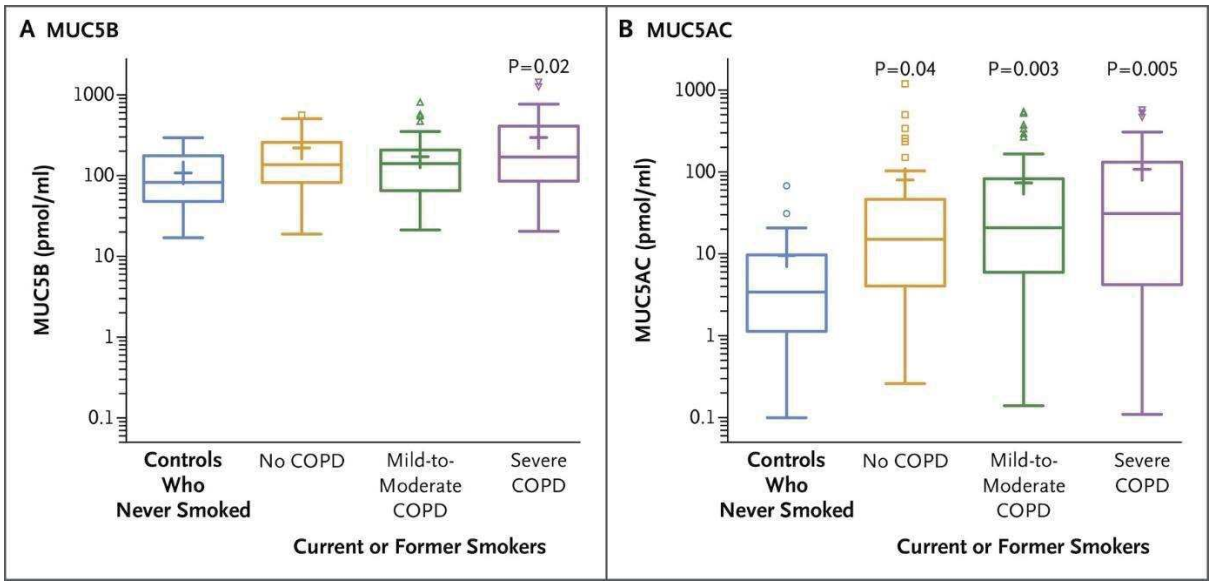


Figure 16. Concentration en mucines MUC5B (A) et MUC5AC (B) chez des sujets contrôles et BPCO classés en fonction de la sévérité de leur trouble ventilatoire obstructif(3)

La même équipe a ensuite démontré sur 331 participants de la même cohorte SPIROMICS que l'augmentation de la mucine MUC5AC dans leurs expectorations induites (mesurée par spectrométrie de masse) était mieux corrélée aux manifestations de BPCO (diminution du VEMS, augmentation de la fréquence des exacerbations et du rapport VR/CPT) comparativement à MUC5B. De plus, un suivi longitudinal sur 3 ans a mis en évidence qu'une concentration de MUC5AC (et non MUC5B) plus importante à l'état de base était un facteur prédictif de déclin du VEMS et du score CAT(39).

b) *Mécanismes physiopathologiques*

Dans la BPCO, les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'hyperconcentration de mucus et de mucines rapportée dans de nombreuses études, ainsi que la diminution in vivo de la clairance mucociliaire à laquelle elle est corrélée (40), sont complexes.

i. Exposition à la fumée de cigarette et hypersécrétion

L'exposition à la fumée de cigarette, principal facteur de risque de développer une BPCO dans les pays occidentaux, est associée à de nombreuses modifications de structure et de fonction de l'épithélium : hyperplasie et métaplasie des cellules caliciformes (41), remodelage des voies aériennes

(36), diminution du nombre de cellules club (42,43) et de la sécrétion de leur protéine CCSP (club cell secretory protein) (44,45). Ces modifications restent présentes à long terme.

Par ailleurs, l'exposition à la fumée de cigarette induit aussi clairement une augmentation de la sécrétion des mucines MUC5AC, que ce soit sur des modèles animaux ou des épithélia issus de lignées cellulaires immortalisées, notamment via le récepteur à l'EGF(46–48), l'élastase neutrophilique (49) ou encore les récepteurs cholinergiques alpha7 (50). Il est intéressant de noter que dans un modèle de cultures primaires de cellules NHBE (Normal Human Bronchial Epithelial cells) exposée à la fumée de cigarette en solution, aucun impact n'a été mis en évidence sur la transcription des mucines MUC5AC et MUC5B (51). Ces modèles ont toutefois leur limite puisqu'ils ne représentent que des expositions de courte durée. Nous présenterons plus loin nos travaux concernant la stimulation par la fumée de cigarette en phase gazeuse de cultures primaires d'épithélia bronchiques issus cette fois de patients fumeurs et BPCO ***(Partie B - Chapitre I.)***

Au vu de ces éléments, il apparait que la problématique dans la BPCO semble davantage lié à une altération de « l'homéostasie » des principales mucines induite par des agents toxiques ou pathogènes, plutôt qu'à la quantité absolue de ces mucines considérée isolément(21,52).

ii. Altération de l'hydratation du mucus

Une autre explication à cette « hyperconcentration » de mucus est liée à sa déshydratation. L'hydratation du mucus passe par une fine régulation impliquant les récepteurs purinergiques présents à la surface de l'épithélium, les canaux *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) et *ENAC* (Epithelial Na+ Channel), et le métabolisme des nucléotides et nucléosides auquel est lié la présence d'ATP extra-cellulaire ***(Figure 14.)*** (53). L'exposition à la fumée de cigarette est connue pour altérer la sécrétion d'anions chlore via la réduction de la transcription du gène CFTR, mais aussi par des dommages directs sur ce canal au niveau de la membrane apicale (54). De plus, l'augmentation du métabolisme nucléo-sidique/-tidique en cas de stimulation par la fumée de cigarette diminue la présence d'ATP en extracellulaire et donc l'activité au niveau des canaux CFTR et ENAC(40).

Cette altération du transport d'ions et de fluide est amplifiée par l'hypersécrétion de mucines MUC5AC et MUC5B induite par la fumée de cigarette. En effet, de l'adénosine mono- et di-phosphate présentes dans les granules de mucines sont « co-relarguées » avec elles, à des niveaux 10 fois supérieurs à ceux de l'adénosine tri-phosphate. Tout cela, associé au défect de fonctionnement de

CFTR, limite l'hydratation « ATP-CFTR dépendante » du mucus qui accompagne normalement la sécrétion de mucines (55).

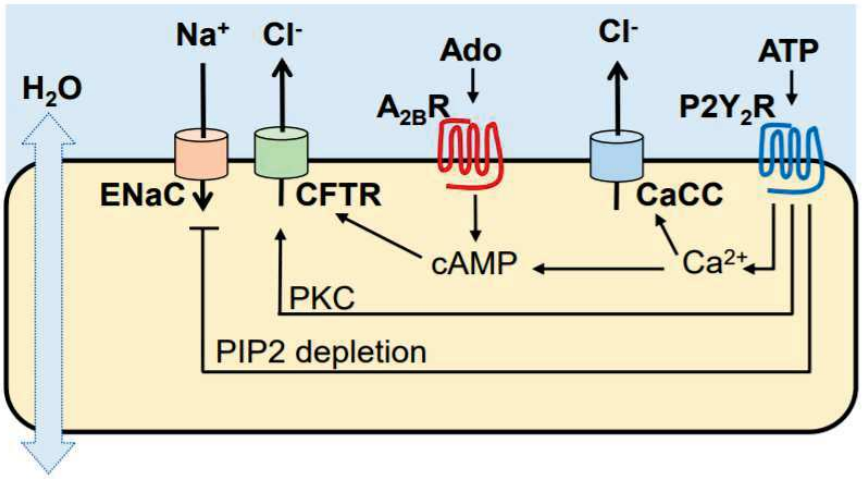


Figure 17. Régulation purinergique de l'hydratation du mucus et de sa clairance (40)

iii. Dysfonction ciliaire

A l'état normal, les cellules ciliées représentent environ 50% des cellules de l'épithélium respiratoire pseudostratifié, chacune possédant plus de 300 cils participant à la clairance muco-ciliaire. Au sein du réseau transcriptionnel impliqué dans la ciliogénèse, *FOXJ1 (Forkhead/winged helix proteins)* a un rôle central, régulant plus de 500 gènes (56). Récemment, Perotin et al. ont démontré une dysrégulation du cil primaire dans la BPCO, sans pouvoir affirmer si celle-ci était directement à l'origine de la maladie ou une conséquence d'autres altérations de l'épithélium respiratoire (57). Gohy et al. ont aussi mis en évidence sur des cultures primaires en ALI d'épithélia de BPCO une altération de la différenciation des cellules ciliées. Ces mécanismes amplifient vraisemblablement l'impact péjoratif de l'hypersécrétion de mucines sur la clairance mucociliaire et l'obstruction en résultant.

iv. Exacerbations et mucines

La question de l'hypersécrétion de mucines lors des exacerbations suit quasiment le même modèle que celui de l'exposition à la fumée de cigarettes (qui peut d'ailleurs aussi en être une cause), à la différence près qu'ici l'agresseur est le plus souvent ici un agent pathogène, majoritairement des virus (58). Ceux-ci sont capables d'induire la sécrétion de mucus via un chemin impliquant notamment les Toll-Like Receptors 3 (TLR3) et les récepteurs à l'EGF (59).

Dans des modèles murins et des cultures cellulaires, l'infection par le Rhinovirus conduisait à une hyperplasie des cellules caliciformes et à une hypersécrétion de mucines, phénomène qui était bloqué par l'inhibition de la voie de signalisation NOTCH3 par un inhibiteur gamma-secretase (60).

Dans une autre étude de Singanayagam et al. non encore publiée, un excès de mucines MUC5AC a été observé dans le lavage bronchiolo-alvéolaire de sujets BPCO en exacerbation suite à une infection par rhinovirus. Dans cette même étude, des souris KO muc5AC -/- infectées par le rhinovirus présentaient une moindre réaction inflammatoire (CXCL1 et 2, TNF, IL-1Bêta) que les souris témoins. Chez ces dernières, un traitement par inhibiteur de l'EGFR destiné à diminuer la sécrétion de MUC5AC induite par le rhinovirus permettait de diminuer lui aussi la réponse inflammatoire. Cela pourrait témoigner du rôle de MUC5AC dans la sévérité de l'exacerbation (61), bien qu'il puisse aussi s'agir d'un mécanisme protecteur proportionné.

De façon intéressante, dans une autre étude conduite par la même équipe, les corticoïdes inhalés diminuaient la réponse immunitaire antivirale (sécrétion d'interféron type I IFNβ and IFNλ1 and IFNλ2/3) chez des sujets humains BPCO infectés par Rhinovirus, et induisaient une augmentation de la sécrétion de mucines MUC5AC et MUC5B. Cet effet était amoindri dans un modèle similaire d'infection chez la souris après traitement par inhalation d'interférons Bêta (62).

v. Colonisation bactérienne et mucines

Enfin, la question du rapport entre colonisation bactérienne et production/sécrétion de mucines est aussi à aborder, un des rôles clés du mucus étant celui de barrière physique anti-bactérienne(63). En effet, la couche de mucus peut être pensée comme propice au développement et au maintien d'un microbiote commensal, le réseau de mucines permettant l'ancrage de bactéries bénéfiques via leurs biofilms, luttant ainsi contre la croissance de germes pathogènes(64). Cependant, certaines bactéries arrivent à exploiter ce réseau afin de créer un environnement favorable à leur développement.

Par ex., la pyocyanine du Pseudomonas Aeruginosa peut ainsi augmenter la sialysation (ajout d'un groupe acide sialique aux chaines glucoconjuguées) et diminuer la fucosylation (ajout d'un groupement sucré fucose) des mucines, augmentant son pouvoir de liaison aux cellules épithéliales (65), et défavorisant la prolifération d'autres pathogènes (4,66).

Ces données permettent de mettre en relief l'importance de la qualité du réseau de mucines, et non pas seulement de sa quantité. Pour souligner cela, et en gardant en tête que colonisation n'est

pas synonyme de pathogénicité, Sibila et al. ont montré chez des patients BPCO sévères à l'état stable que la quantité de mucines MUC5AC et MUC5B dans leur lavage bronchiolo-alvéolaire n'était pas significativement différente lorsque des germes « colonisant » étaient retrouvés (Haemophilus Influenzae, Moraxella Catarrhalis, etc…) comparativement aux patients dits non colonisés (67).

2. Asthme

L'asthme est défini comme étant une maladie présentant des variations dans sa présentation clinique (*phénotypes*), mais habituellement caractérisée par une inflammation chronique des voies aériennes. L'asthme associe un cortège de symptômes respiratoires, et une variabilité d'un trouble ventilatoire obstructif déterminé fonctionnellement (spirométrie) (définition Global Initiative for Asthma - GINA 2021, (68)). Sa physiopathologie est de mieux en mieux appréhendée.

Bien que la réalité est probablement plus complexe, il est usuel de distinguer deux « endotypes », à savoir des patients présentant des profils d'inflammation de type 2 « -High » (Th2-High) et -Low (Th2-Low) (69), en référence aux cellules T-helper de type 2, les innate lymhpoids cells 2 (ILC-2) jouant aussi un rôle central.

Le premier endotype Th2-High se caractérise par un relargage accru de cytokines « signatures » *(IL-4, IL-5 et IL-13)* par des cellules de l'immunité innée et adaptative, ainsi que par leurs biomarqueurs d'aval (éosinophiles sériques et dans l'expectoration, Fractionnal Exhaled Nitric Oxide (Feno), IgE totales sériques, périostine, etc…) ***(Figure 18.)***.

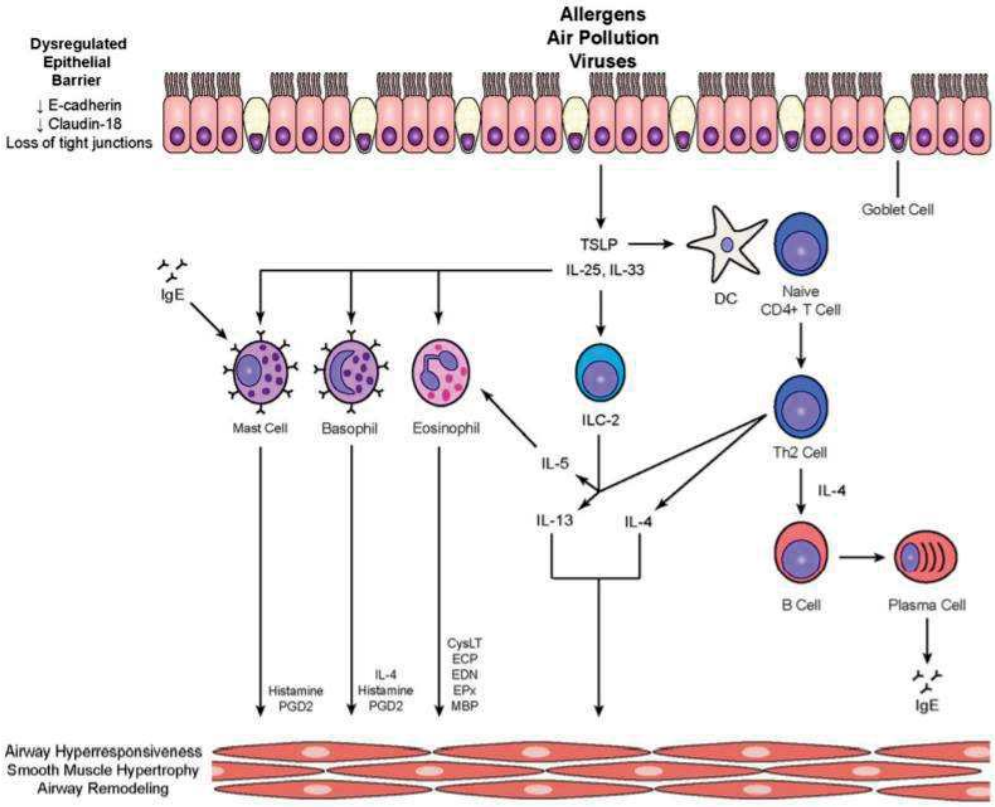


Figure 18. Asthme Th2-High (70)

Le second endotype se définit en contraste du premier, les cellules T-helper 1 et/ou T-helper 17 semblant jouer un rôle non négligeable dans cette situation ***(Figure 19.).*** Ils représenteraient 37% des patients asthmatiques sévères, sur une définition basée sur des études transcriptomiques d'épithélia de patients dans la cohorte U-BIOPRED(71).

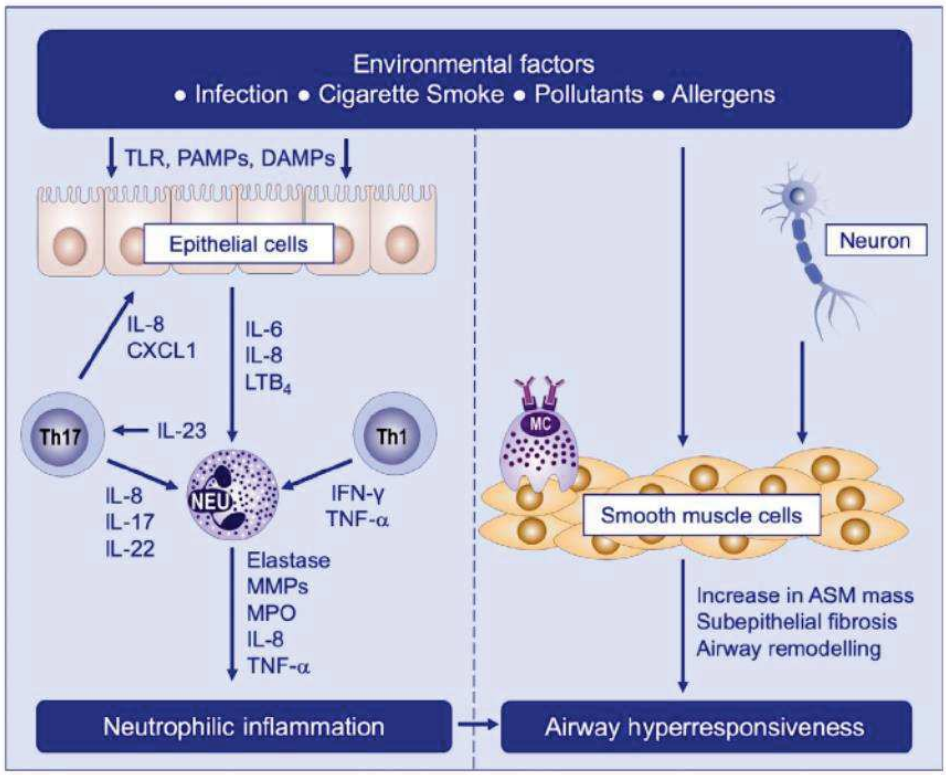


Figure 19. Asthme Th2-Low (parfois appelé non-Th2)(72)

Ces distinctions Th2-High/Th2-Low nous seront utiles pour la suite de notre propos.

a) *Observations*

L'obstruction des voies aériennes distales par le mucus joue un rôle majeur dans l'asthme aigu grave et a été très bien étudiée dans des séries autopsiques ***(Figure 20.)*** (73,74).

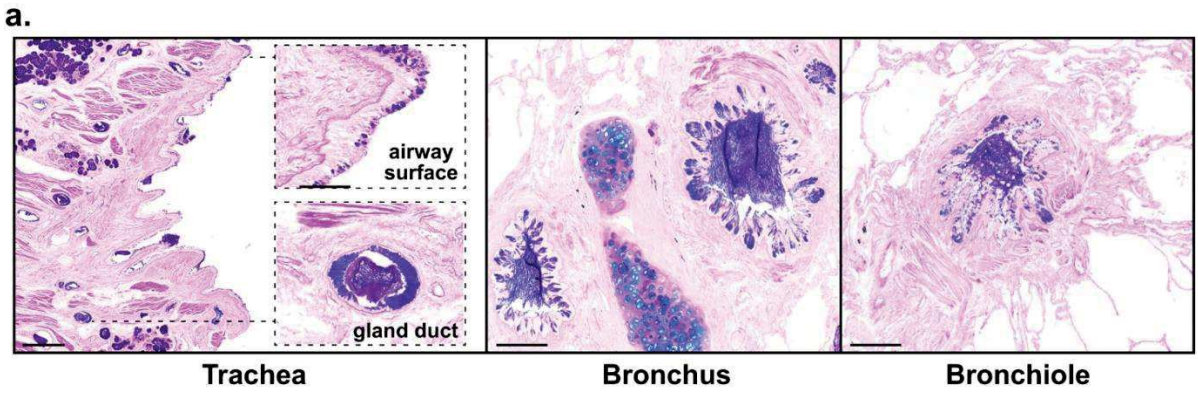


Figure 20. Colorations Alcian blue/periodic acid-Schiff (AB-PAS) d'épithélia *provenant de poumons de patients (n = 2) décédés lors d'exacerbations d'asthme, mettant en évidence des glycoprotéines de mucine dans les grandes et petites voies respiratoires. Barres d'échelle, 500 µm et 100 µm dans les médaillons (trachée), 200 µm (bronches et bronchioles)(75).*

L'obstruction par le mucus est aussi significative dans les cas d'asthme sévère non fatals : Dunican et al. suggèrent que ces « mucus plugs » (bouchons muqueux) sont liés à l'intensité du trouble ventilatoire obstructif (évalué en spirométrie), mais aussi à l'éosinophilie dans l'expectoration (76). Dans leur étude, un mucus score (score tomodensitométrique d'impactions mucoïdes) élevé était lié à un VEMS < 60% de la théorique et associé à une augmentation des éosinophiles dans l'expectoration ainsi qu'à la présence d'EPO (Eosinophil Peroxydase).

Une hyperproduction de mucines, et en particulier de mucines MUC5AC, est aussi observée chez des sujets atteints d'asthme léger à modéré (expectorations induites, mucines « stockées »)(77), ce qui suggère une multiplicité des facteurs à l'origine de cette anomalie. Afin de complexifier le tableau, Woodruff et al. ont observé que dans un groupe de patients asthmatiques dit « Th2-high* » que l'expression de MUC5AC était augmentée tandis que celle de MUC5B diminuée (78). Nous retrouvons ici implicitement la notion d'homéostasie et de ratio entre ces 2 principales mucines.

**(ici phénotype basé sur une signature de 3 gènes principaux dont l'expression est induite par l'Interleukine-13 : Periostin, CLCA1, SERPINB2)*

b) *Mécanismes physiopathologiques*

La physiopathologie de l'asthme peut être appréciée à travers les prismes suivants :hyperréactivité bronchique, remodelage épithélial, production/sécrétion de mucus, hypertrophie et constriction

musculaire lisse. Nous verrons qu'il n'y a pas de frontière imperméable entre ces différents éléments. Nous nous focaliserons sur ceux en rapport avec la production/sécrétion de mucus et de mucines.

i. Remodelage épithélial et production de mucus : voie de signalisation IL-13/SPDEF/STAT6 *(Figure 21.)*

Le remodelage des voies aériennes dans l'asthme, léger à sévère, est dominé par l'hyperplasie et la métaplasie des cellules caliciformes. Les cellules qui orchestrent ce remodelage sont les cellules Th2 et les ILC-2. Elles sécrètent toutes deux de l'IL-13(79), cytokine primordiale pour obtenir cette endotype d'hyperproduction/hypersécrétion de mucus. La surexpressiond'IL-13 fait partie du profil des individus dits Th2-High.

L'IL-13 est à l'origine de l'hyperproduction de MUC5AC in vitro et dans des modèles murins (80), ce qui traduit sa capacité à réguler cette production par un effet direct sur les cellules épithéliales via des modifications de leur profil d'expression d'ARNm et de miRNA(81–83). Une des toutes premières étapes serait l'induction de la différenciation de cellules club en cellules caliciformes à travers l'action coordonnée de facteurs de transcription tels que *STAT6/Spdef (Sam pointed domain-containing ETS transcription factor)*, *Foxa2* et *TTF1*(84,85). STAT6 est impliqué puisque des souris transgéniques KO STAT6 -/-, surexprimant l'IL-13, ne développent pas d'hyperproduction de mucus, ce qui est restauré après reconstitution sélective de ce gène (80). Cependant, ni STAT6 ni SPDEF ne régulent directement l'expression et/ou la sécrétion de la mucine MUC5AC. L'hypothèse est que cela passerait plutôt par des gènes « spdef-dépendant » tels que : CLCA1(86), Serpin3A(87), et 15-lipoxygenase-1(88). Il s'agit là d'un cercle vicieux puisque Spdef est capable d'induire la production de cytokines par l'épithélium (telles que l'IL-33 ou Thymic Stromal Lymphopoiétin (TSLP)), cytokines qui elles-mêmes promeuvent la production d'IL-13 (85).

L'impact de l'IL-13 sur MUC5B semble davantage discutable : il induirait l'expression de MUC5B dans des modèles murins, mais diminuerait sa production dans des cultures de NHBE en ALI(89).

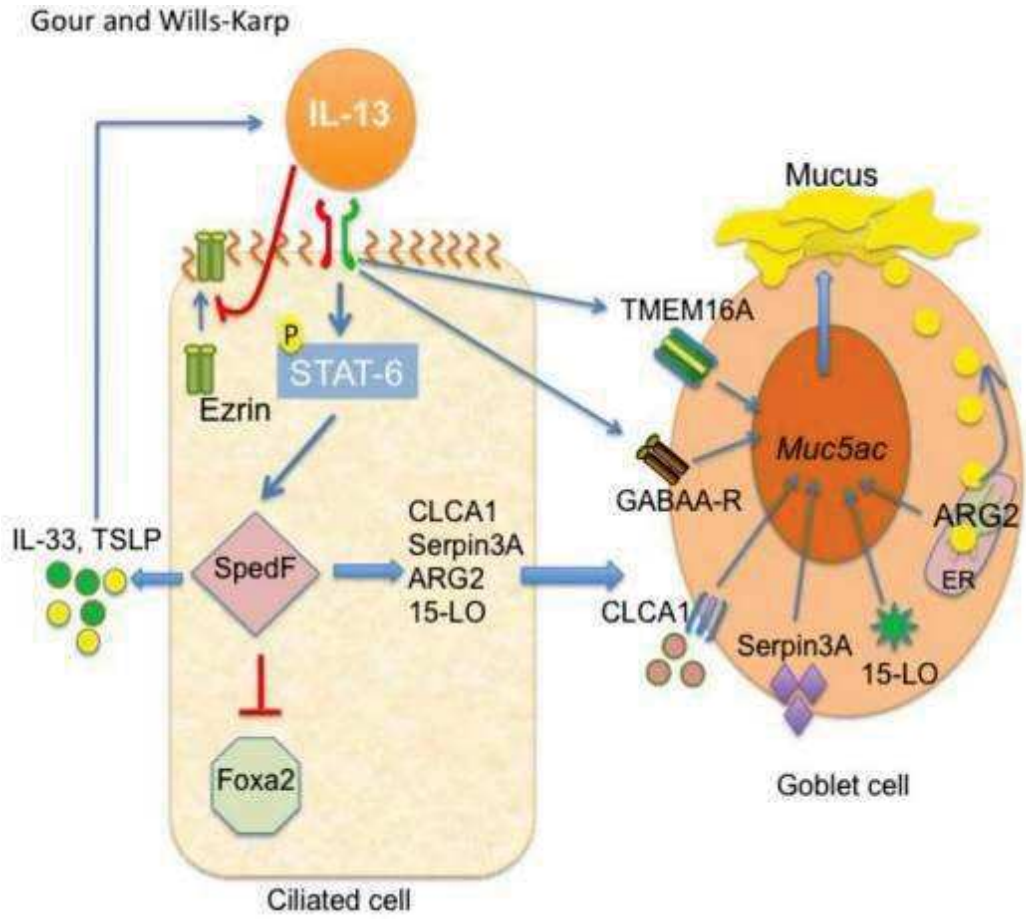


Figure 21. Voie de signalisation IL-13/SPDEF/STAT6 (90)

Concernant l'IL-4, l'induction de la production et de la sécrétion de MUC5AC par cette cytokine observée à l'origine dans des modèles murins (91) est finalement plutôt liée à la voie de l'IL-13. Une des explications est que l'IL-4 possède 2 types de récepteurs, le récepteur à l'IL-4 de type II étant composé des sous-unités IL-4Ralpha et IL-13Ralpha1, et par conséquent activable aussi par l'IL-13 ***(Figure 21.)*** (90). De plus, la sécrétion de mucus est IL-13 dépendante : Cohn et al. ont ainsi montré que le transfert adaptatif d'une immunité adaptative Th2 dépourvue de gène exprimant l'IL-4 induit tout de même une hyperplasie des cellules caliciformes et une hypersécrétion de mucus dans un modèle murin(92). L'IL-4 garde toutefois un rôle dans le recrutement des cellules Th2(93). Dans une approche thérapeutique, l'inhibition conjointe de ces 2 voies est donc préférable à une inhibition isolée de chacune d'elle ***(cf. paragraphe IV.5.).***

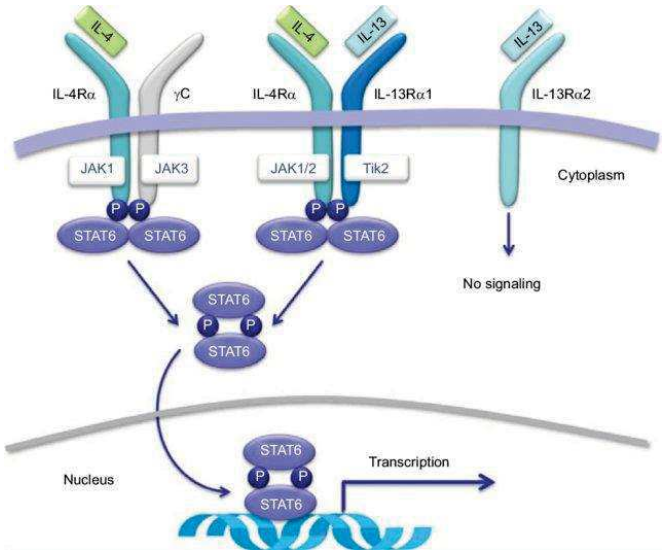


Figure 22. Récepteur à l'IL-4 et à l'IL-13 (94)

Bien sûr tout ce qui sera situé « en amont » de ces voies précédemment décrites est à considérer comme potentiellement « mucomodificateur ». C'est notamment le cas de Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), une cytokine (une alarmine) produite en excès par les cellules de l'épithélium bronchique d'une majorité de patients asthmatiques sévères, qui de par son rôle de promotion de la réponse immunitaire Th2 va conduire elle aussi in fine à l'endotype d'hyperproduction et d'hyperrsécrétion de mucines, en faisant une cible thérapeutique ***(cf. paragraphe IV.5.).***

ii. Hypersécrétion de mucines

Concernant l'hypersécrétion, l'IL-13 peut aussi induire des gènes ayant un rôle primordial dans l'hypersécrétion de mucus, tel que *TMEM16A (transmembrane protein 16A)* qui est un canal chlore calcium-dépendant nécessaire à l'exocytose de granules contenant muc5AC(95).

Ensuite, tout comme ce que nous avons vu dans la BPCO, la présence d'agresseurs (polluants, fumée de cigarette) ou, plus spécifiquement à l'asthme, d'allergènes (ou leurs éléments d'aval dans la réaction allergique), peut stimuler la sécrétion de mucines et sa production, notamment via le récepteur de l'EGF (96).

iii. Hyperréactivité bronchique, muscle lisse et mucines

Durant un épisode de bronchoconstriction, les cellules épithéliales sont sujettes à des stress physiques (mécano stimulation) qui sont capables d'activer la production de TGF-Bêta et de GMCSF, qui à leur tour peuvent recruter des cellules dendritiques et d'autres cellules de l'immunité(97), à l'origine de l'activation du système immunitaire inné et adaptatif. Cette mécano stimulation augmente aussi l'expression de l'EGF(98) qui va promouvoir la métaplasie des cellules caliciformes(96). Cela permet d'expliquer les observations in vivo de Grainge et al. : sur des biopsies bronchiques de patients asthmatiques soumis seulement à un test de provocation bronchique à la méthacholine et non pas à un test de provocation allergénique, les auteurs observaient du remodelage caractérisé par une prolifération des cellules caliciformes, un épaississement de la membrane basal et une hypersécrétion de mucus(99).

Le problème peut aussi être pris à l'envers. En effet, Evans et al. ont montré sur des modèles murins d'asthme (ovalbumine/aspergillus) que le gène muc5ac était nécessaire à l'expression d'une hyperréactivité bronchique (100) : ces souris KO muc5ac -/- perdait cette caractéristique malgré une provocation bronchique à la méthacholine.

Enfin, au-delà d'un rôle considéré souvent à tort comme passif des cellules clés de la bronchoconstriction, les cellules musculaires lisses, certains auteurs suggèrent que ces dernières sont capables d'induire une hyperproduction et une hypersécrétion de mucines. Faiz et al. ont montré qu'en réponse à l'IL-1Bêta, élément de l'inflammasome *NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3)* exagérément exprimé dans l'asthme(101), des cellules musculaires lisses des voies aériennes cultivées en ALI issues de patients asthmatiques sécrétaient davantage de CCL20. Ils ont ensuite montré que cette cytokine était à l'origine d'une hyperproduction de mucines MUC5AC lorsqu'utilisée comme traitement sur des cultures en ALI (lignée CALU-3). De plus, cette augmentation de CCL20 est retrouvée in vivo dans les expectorations de sujets asthmatiques. Son récepteur CCR6 est lui présent à la fois sur des cellules musculaires lisses des voies aériennes, mais aussi d'autres types cellulaires ***(Figure 23.)*** (102,103). Ces mécanismes physiopathologiques pourraient être à l'œuvre à la fois dans l'asthme « Th2-High » et « Th2-Low », une hyperplasie et une migration de ces cellules étant associées aux cytokines Th17 (104,105) mais aussi aux cytokines Th2 (106,107).

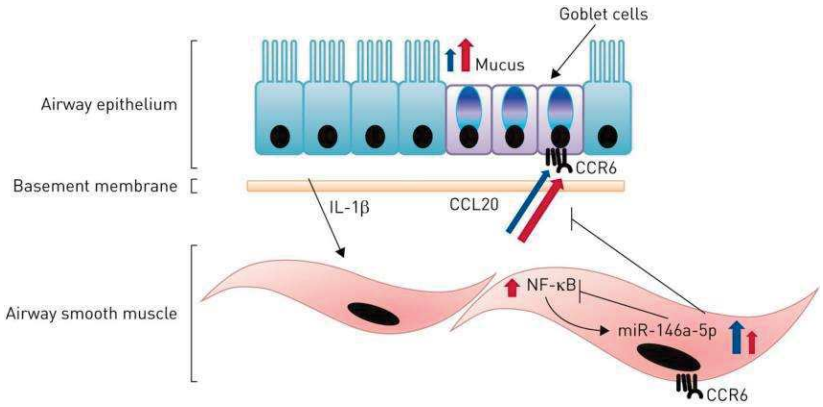


Figure 23. Possible "cross-talk" entre les cellules musculaires lisses et l'épithélium bronchique (102)

iv. Impact de la perturbation de l'homéostasie des mucines

Nous l'avons vu, MUC5AC, produite de façon accrue, endosse alors un rôle pathologique et MUC5B, dont l'expression est déficitaire dans l'asthme, pourrait perdre son rôle protecteur (108). Toutefois, ces observations d'altérations de l'expression des mucines n'impliquent pas la formation d'un mucus intrinsèquement pathologique in vivo dans les voies aériennes des sujets asthmatiques. Des données de confirmation *in vivo* sont nécessaires.

L'équipe de J.V. Fahy a montré que ces altérations impactaient le ratio MUC5AC/MUC5B directement observé dans l'expectoration de patients asthmatiques(109), qui était plus élevé comparativement aux patients contrôles ***(Figure 24.)***. Un ratio plus élevé était d'ailleurs lié à un endotype Th2-High (éosinophiles dans l'expectoration >2%). Cette constatation in vivo est extrêmement pertinente car confirme les données des modèles cellulaires et animaux. De plus, cela permet d'échafauder d'autres hypothèses liées davantage à l'impact de la modification du réseau de mucines. Par ex., cette moindre représentation de la mucine MUC5B pourrait favoriser la survie des éosinophiles dans le réseau de polymère par une moindre interaction avec Siglec-F (Sialic acid-binding, immunoglobulin-like lectin), nécessaire pour induire l'apoptose des éosinophiles (110).

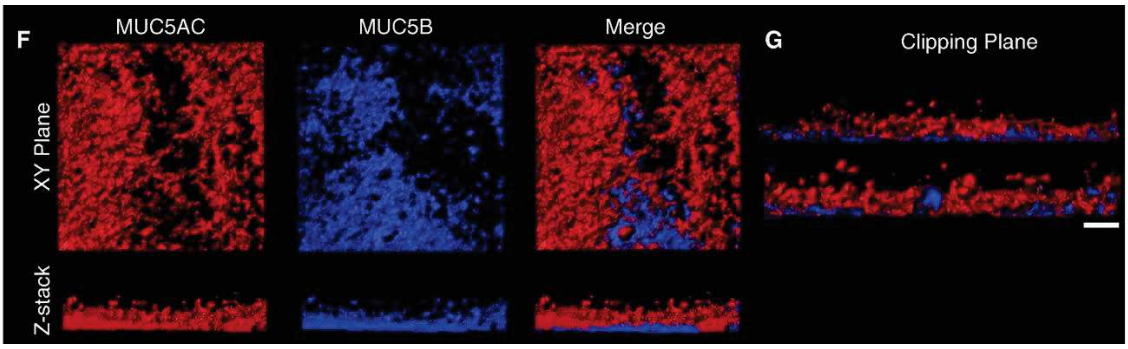


Figure 24. Les images d'immunofluorescence d'un frottis d'expectoration d'un donneur asthmatique montrent que MUC5AC et MUC5B sont présentent dans le gel de mucus (F). Les images du plan de coupe révèlent une faible proportion de MUC5B comparativement à MUC5AC (G) (109)

Autre exemple, un réseau riche en mucines MUC5AC semble « s'ancrer » davantage à l'épithélium bronchique, voire carrément se connecter aux cellules sécrétrices, altérant ainsi le transport mucociliaire et favorisant les bouchons muqueux ***(Figure 25.)*** (111).

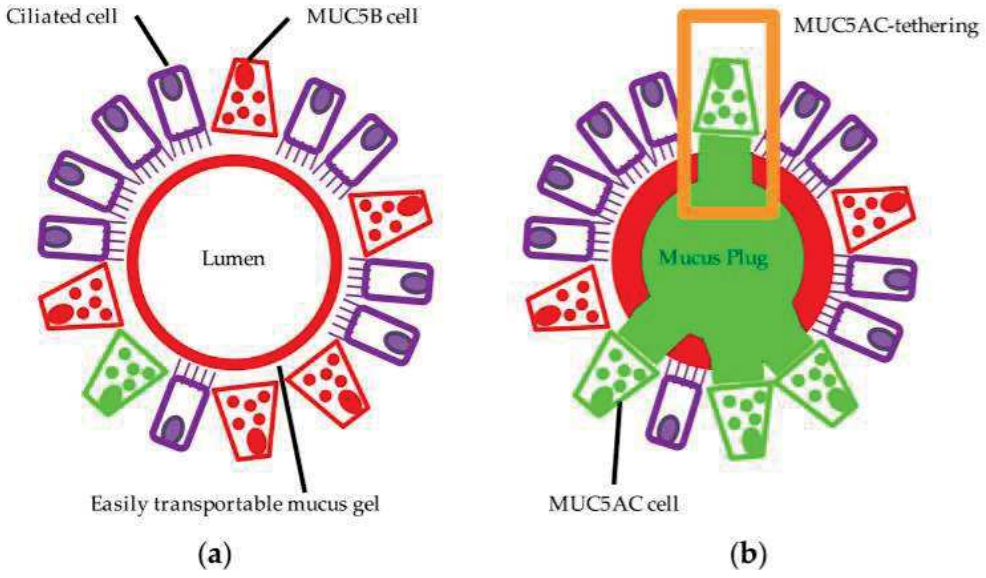


Figure 25. Représentation de l'ancrage accrue à l'épithélium d'un mucus riche en MUC5AC dans l'asthme (79)

v. Anomalies qualitatives du mucus

Rhéologiquement parlant, le mucus des patients asthmatiques présente des composantes visqueuses et élastiques augmentées(112), expliquées vraisemblablement par des proportions relatives en mucines différentes, ce que nous tenterons de démontrer dans nos travaux, mais aussi

peut-être par la prépondérance du glycoforme « high-charge » de MUC5B dans l'asthme (79) soulignant ainsi l'importance de la glycosylation des mucines(113).

Enfin, des modifications post-transcriptionnelles pourraient aussi influencer le comportement physique de ce mucus. Par exemple, à l'instar de ce qui a été démontré dans la mucoviscidose(114), le pH à l'intérieur de la lumière bronchique pourrait être à l'origine d'un défect de « l'unpackaging » de la mucine MUC5B une fois sécrétée, puisque l'expectoration de patients asthmatiques en exacerbation a été décrite plus acide que la normale(115).

vi. Lien entre le phénotype clinique « bronchite chronique » et les données physiopathologiques

A la lumière des données précédemment exposées, il est bon de se demander si ces observations peuvent être reliées à un phénotype clinique « mucosécrétant » : cette hyperproduction/hypersécrétion de mucus a-t-elle une traduction autre que dans des séries autopsiques ?

Notre équipe a montré que le symptôme « bronchite chronique », objectivement mesurée par un questionnaire validé (CASA-Q) auprès de patients asthmatiques, n'était pas corrélée à l'hyperplasie des cellules caliciformes dans les biopsies bronchiques de ces mêmes patients (116). Cette observation est à mettre en lien avec la subjectivité du report du symptôme « bronchite chronique » par les patients et les praticiens et doit nous mettre en garde quant aux limites du phénotypage clinique.

3. Bronchectasies (hors mucoviscidose = bronchectasies non-CF (cystic fibrosis))

Les bronchectasies sont définies scannographiquement par des bronches élargies ; classiquement et de façon assez partiale par un calibre de 33% supérieur à celui de leurs artères bronchiques adjacentes ***(Figure 26.).*** Elles peuvent ne toucher qu'un segment de lobe est être focales, ou bien atteindre plusieurs lobes et être diffuses. Les premières études histopathologiques mettaient déjà en évidence une atteinte sévère des voies ariennes distales, des bronchiolectasies, et des bouchons muqueux (117). La « bronchorrhée » et la toux sont des caractéristiques cliniques typiques des patients présentant des bronchectasies, tout comme les exacerbations, la plupart du temps d'origine infectieuse, qui émaillent leur histoire naturelle. Toutefois il y'a là aussi une hétérogénéité certaine puisque certains patients restent totalement asymptomatiques.

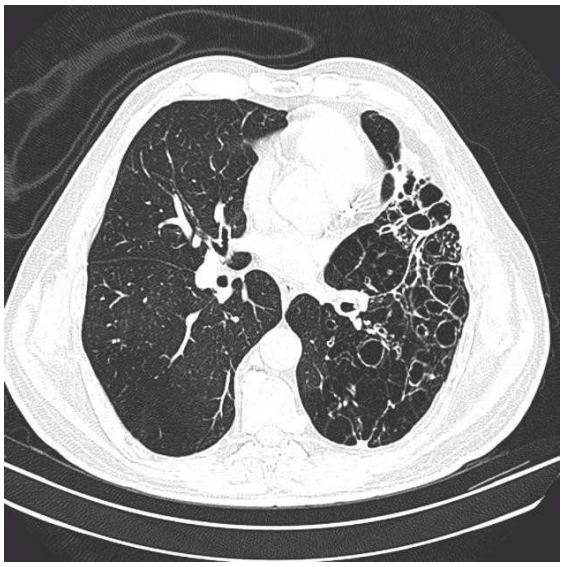


Figure 26. Tomodensitométrie thoraciques révélant des bronchectasies (118)

Les bronchectasies non-CF sont complexes à aborder car il s'agit davantage d'une entité plus que d'une maladie. De plus leurs étiologies, bien souvent non retrouvées (bronchectasies « idiopathiques »), sont extrêmement hétérogènes ***(Figure 27.)*** (119). Définir un mécanisme physiopathologique commun est donc un non-sens, d'autant plus lorsqu'on s'aperçoit que les bronchectasies peuvent être retrouvées dans la BPCO et dans l'asthme ; nous pouvons seulement supposer qu'un des mécanismes physiopathologiques pourrait être une dysrégulation de l'homéostasie immunitaire, locale et/ou systémique, puisque les bronchectasies peuvent être retrouvées à la fois dans des déficits immunitaires mais aussi dans d'autres maladies à l'inverse dites « hyper-immunes »(120). Les bronchectasies traduiraient alors un défect de la réponse de l'hôte, déterminée génétiquement, aux différents « stress environnementaux »(121).

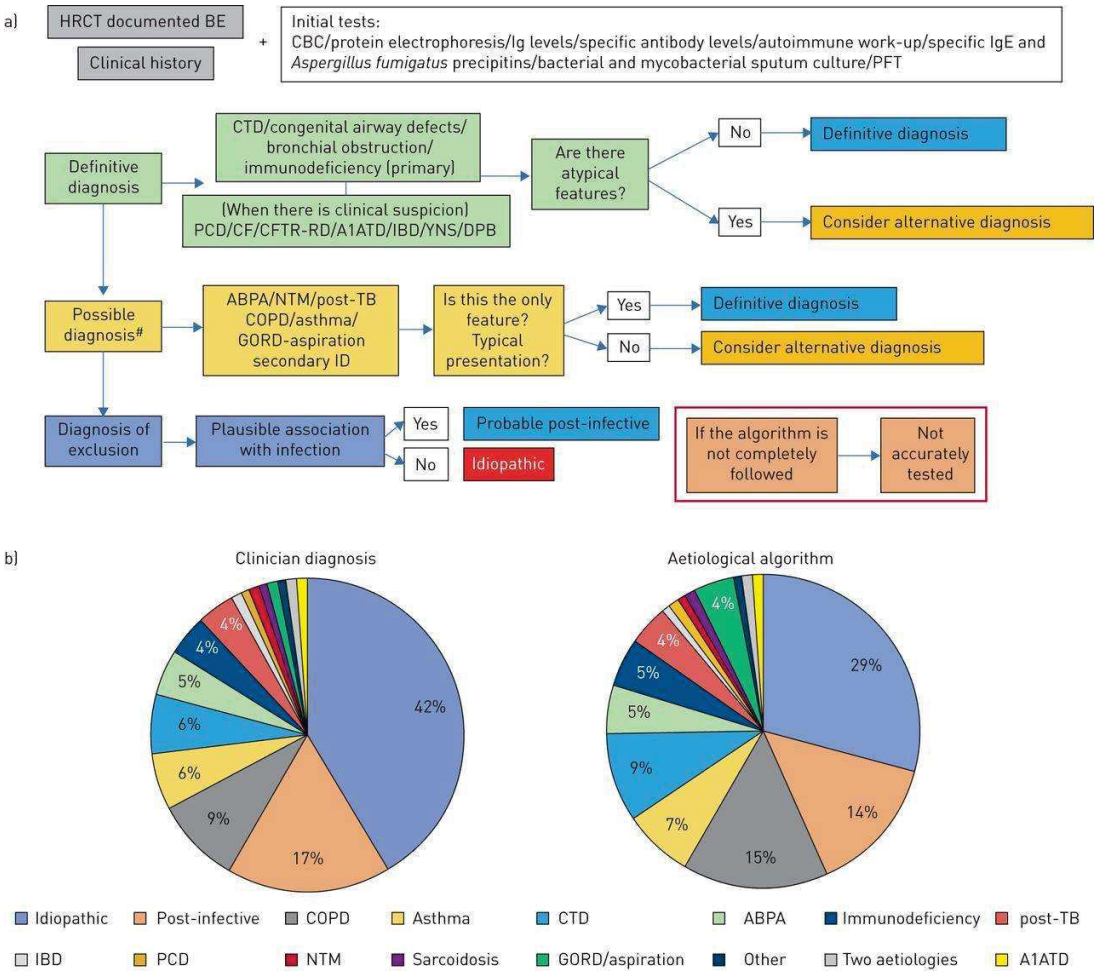


Figure 27. Algorithme de classification des bronchectasies non-CF(119)

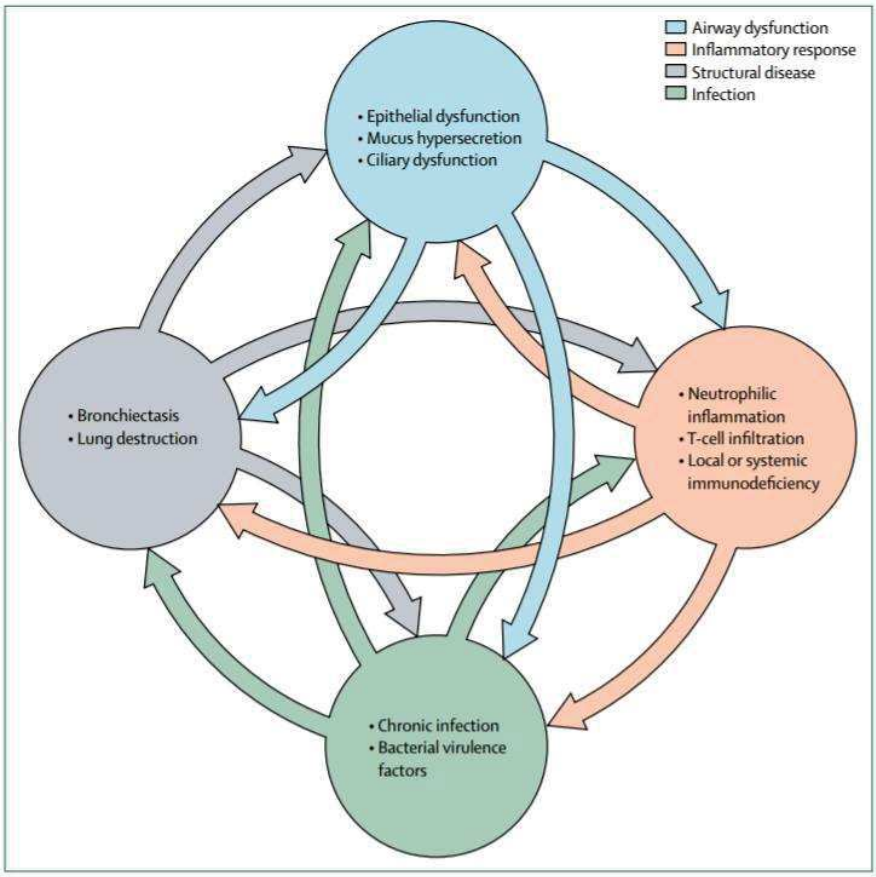


Figure 28. Modèle physiopathologique proposé dans les bronchectasies non-CF (121)

Nous allons nous focaliser ici sur les caractéristiques du mucus et sur les facteurs pouvant influencer sa production. Les données sont souvent extrapolées à partir d'observations issues du monde de la mucoviscidose, ce qui représente un biais certain compte-tenu du caractère monogénique de cette maladie (mutation du gène CFTR) et de l'absence d'anomalie du canal CFTR dans les bronchectasies non-CF non mutées (122).

Le cas de l'ABPA (aspergillose broncho-pulmonaire allergique) ne sera pas abordé dans ce chapitre.

a) *Microbiote, infection chronique, exacerbation et mucines*

Les bronchectasies se caractérisent par une infection chronique généralement polymicrobienne (colonisation) dans plus de 50% à 80% des cas (123) et par des exacerbations (124). Les germes les plus fréquemment représentés sont Pseudomonas Aeruginosa et Haemophilus Influenzae. Ce microbiote est bien évidemment impacté par les antibiothérapies itératives(125).

Dans une magnifique étude portant sur la bactérie Pseudomonas Aeruginosa et l'infection d'un modèle 3D de « mucus natif » (mucus de cochon), Wheeler et al. ont déterminé que le réseau de mucines permettait d'initier une régulation négative des gènes de virulence impliqués dans le *quorum-sensing* (régulation de l'expression de gènes bactériens en fonction de la densité bactérienne environnante), la *biosynthèse des sidérophores* (chélateurs bactériens du fer) et la *sécrétion de toxines*. Ce mucus était aussi à l'origine d'une désintégration rapide du biofilm, une caractéristique des infections de muqueuses (126). Cela souligne bien le rôle de barrière du mucus.

Par ailleurs, Sibila et al. ont montré que la mucine MUC2 était retrouvée en proportion plus élevée dans les expectorations de patients avec bronchectasies non-CF dits colonisés, comparativement aux patients non colonisés (particulièrement lorsqu'il s'agissait de Pseudomonas Aeruginosa), tandis qu'aucune différence n'était retrouvé pour la mucine MUC5AC(127). A noter que MUC5B était indétectable. Toutefois, les méthodes de collecte des échantillons, de purification et de détection par Kit Elisa ont été critiquées par la suite par l'équipe de Ramsey qui a été capable de retrouver une sécrétion de MUC5B dans son étude(128)). L'absence de groupe contrôle est aussi critique.

Concernant les exacerbations, bien que peu d'études aient été menées spécifiquement dans les bronchectasies non-CF pour comprendre les interactions entre microbiote et régulation de la production/sécrétion de mucines, nous pouvons prudemment extrapoler certaines observations faites chez des patients ayant une mucoviscidose: durant une exacerbation, la sécrétion de MUC5AC et MUC5B est fortement augmentée, cette augmentation passerait par les médiateurs précédemment décrits dans d'autres pathologies obstructives (LPS, TLR, voie de l'EGFR, etc…)(22), et elle serait maximale dès le début de l'exacerbation pour MUC5B, progressive pour MUC5AC (129). Partant de là nous pouvons spéculer qu'à l'état stable MUC5AC est séquestrée en intra-cellulaire, ne pouvant contribuer à une clairance muco-ciliaire efficace des pathogènes qui se lient aux mucines, contribuant à une susceptibilité accrue aux infections (130). Ces affirmations doivent toutefois être prises avec beaucoup de précaution, car dans la mucoviscidose la quantité absolue de mucines produite à l'état de base est certes diminuée et hyperconcentrée (131), mais la quantité d'ADN fragmenté issus de débris cellulaires est le composant principal retrouvé dans les expectorations (132) et l'altération de l'hydratation du mucus par déficience du canal CFTR reste la problématique clé : le remodelage des voies aériennes à l'origine de l'hyperproduction/sécrétion de mucus n'est pas le *primum movens*.

Les bactéries ne sont pas les seuls microorganismes retrouvés dans cette entité. Cause ou conséquence, les bronchectasies sont propices au développement de champignon, et notamment d'Aspergillus Fumigatus (133), ainsi que de mycobactéries atypiques non tuberculeuses (NTM, pour

non-tuberculous mycobacteria) dont l'incidence y est 60% plus élevée que dans les autres pathologies obstructives(134), faisant supposer une altération de la barrière protectrice de mucus. Une mutation du gène CFTR est souvent retrouvée (50% en prospectif) dans une population incidente de patients bronchectasiques infectés à NTM, mais les critères diagnostiques pour une mucoviscidose ne sont réunis que dans 20% des cas (135). Thornton et al. ont montré qu'une préincubation de tissue nasal avec des mucines MUC5AC et MUC5B diminuait ensuite l'adhésion de NTM à la matrice extra-cellulaire après inoculation(136). Aucune étude n'a étudié in vivo l'interaction NTM/Mucines.

La principale limite à la compréhension des interactions hôtes-pathogènes et leurs impacts sur la production de mucus reste notre capacité même à détecter ces germes et leurs profils de sensibilité, qui évolue en même temps que nos technologies et qui nous fera peut-être redéfinir la notion de pathogénicité et sortir du paradigme microbe/antibiotique.

b) *Hyperconcentration en mucines et hydratation du mucus*

Ramsey et al. de l'équipe de Richard Boucher ont étudié les concentrations en mucines et les propriétés biophysiques d'expectorations spontanées ou induites de patients présentant des bronchectasies non-CF. Ces expectorations étaient hyperconcentrées en mucines totales, et en particulier en MUC5AC et MUC5B comparativement à des sujets sains. Ce résultat concordait avec les observations de biopsies bronchiques de ces patients qui révélaient davantage de cellules marquant MUC5AC et MUC5B. Toutefois cela ne se traduisait pas par une augmentation de l'expression des gènes codant pour ces mucines, les taux d'ARNm étant similaire dans le groupe sujets sains (128).

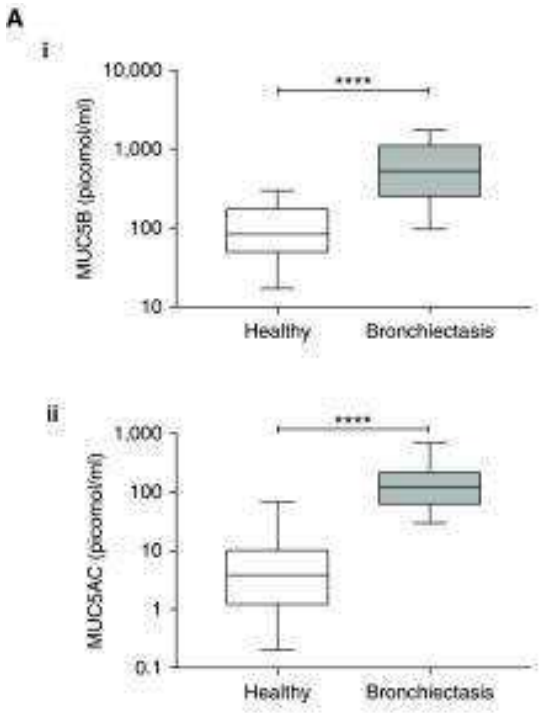


Figure 29. Mucines *dans les expectorations induites de personnes atteintes de bronchiectasie* non-CF *et de sujets témoins sains. (A) Quantification de MUC5B (mucine 5B) (Ai) et MUC5AC (Aii) par spectrométrie de masse marquée par un standard interne (128)*

Ce contraste entre l'absence d'augmentation de la transcription des mucines d'une part, et l'hyperconcentration du mucus en ces mêmes mucines d'autre part, intrigue. Les hypothèses avancées par l'équipe de Richard Boucher regroupent de possibles régulations post-transcriptionnelles de la production des mucines, ou bien le fait que ce soit l'état de moindre hydratation plus que l'état d'hyperproduction du mucus qui conduit à la concentration du mucus (137,138). Pour appuyer ce dernier point, ils avancent trois observations issues de la littérature : 1) La forte adhérence du mucus à son épithélium induit une hypoxie locale capable d'inhiber l'activité CFTR et donc d'altérer le transfert de fluide (139,140), 2) de manière comparable à ce que nous avons vu dans la BPCO, la présence anormale de nucléoside/nucléotide en extra-cellulaire pourrait perturber la balance « absorption de Na+/sécrétion de Cl- » (40), 3) l'activité HNE (Human Neutrophil Elastase) - dont la concentration dans l'expectoration est ici corrélée dans l'étude de Ramsey à la concentration de mucines - pourrait contribuer au déséquilibre de l'état d'hydratation du mucus en favorisant l'absorption de fluide(141).

Enfin, pour revenir aux malades, il est intéressant de noter que la concentration en mucines était inversement corrélé au VEMS et positivement corrélé à un score scannographique d'extension

des bronchectasies, mais aussi totalement indépendante de la présence de pathogène en microbiologie.

c) *Augmentation de la viscoélasticité du mucus*

Dans de précédentes études de Ramsey et al., les auteurs retrouvaient aussi une augmentation des modules élastiques et visqueux des expectorations des patients avec bronchectasies non-CF, ainsi qu'une augmentation du module osmotique(128,142). Au vu de ce que nous avons vu précédemment et par analogie avec la mucoviscidose, cela pourrait traduire un défaut d'hydratation du mucus et une hyperconcentration des composants solides du mucus dont les mucines font partie.

Aussi, Alcaraz-Serrano et al. ont montré que les expectorations de patients avec bronchectasies non-CF dans lesquelles sont retrouvés du Pseudomonas Aruginosa de phénotype muqueux (mPA) présentent des modules visqueux et élastiques plus élevés que des expectorations sans germes retrouvés(143). Cela impliquerait un impact de la colonisation de germes potentiellement pathogènes sur la rhéologie du mucus. Toutefois il est difficile de généraliser ces résultats: premièrement, il n'y avait aucune différence significative entre les groupes « mPA » et « PA non muqueux», deuxièmement, il n'y avait aucune différence significative entre les groupes présentant ou non des pathogènes dans leurs expectorations lorsque la fréquence d'oscillation appliquée à l'expectorat pour l'analyse rhéologique était plus élevée (100 rad/s, soit une simulation de l'effort de toux).

Notre travail s'attachera à évaluer l'impact de la microbiologie sur la rhéologie du mucus.

Nous venons de le voir le mucus, sa composition, ses propriétés biophysiques et sa régulation, jouent un rôle central dans la physiopathologie des principales maladies obstructives des voies aériennes. Afin d'en faire une cible thérapeutique efficiente, il est crucial de savoir l'analyser dans toutes ses dimensions. Le prochain chapitre est une revue de la littérature décrivant les principaux outils d'analyse des expectorations et du mucus en particulier à notre disposition en 2021

III. Outils d'analyse des expectorations et du mucus dans les pathologies bronchiques obstructives

« Sputum and mucus assessment tools for muco-obstructive lung diseases in 2021: Time to "unplug" from our daily routine ! »

(Revue de la littérature en réponse à l'invitation du journal « Cells »)

Sputum and mucus assessment tools for muco-obstructive lung diseases in 2021: Time to “unplug” from our daily routine !

Jeremy Charriot [1,2], MD j-charriot@chu-montpellier.fr

Mathilde Volpato [1], MD m-volpato@chu-montpellier.fr

Aurélie Petit [1], PhD aurelie.fort@inserm.fr

Isabelle Vachier [1], PhD isabelle.vachier@medbiomed.fr

Arnaud Bourdin [1,2], MD, PhD a-bourdin@chu-montpellier.fr

1 - Department of Respiratory Diseases, Montpellier University Hospitals, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier Cedex, France.

2 - PhyMedExp INSERM U1046, Montpellier, France.

Corresponding author:

Jeremy Charriot, Department of Respiratory Diseases, Montpellier University Hospital, Arnaud de Villeneuve Hospital, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud – 34295 Montpellier Cedex, France:

Mai: j-charriot@chu-montpellier.fr

Phone : +33 4 67 04 20 20

The authors declare no conflicts of interest in relation with this study.

Abstract word count: 215

Manuscript word count: 4272

Keywords: asthma, COPD, non-CF bronchiectasis, muco-obstructive lung diseases, sputum, mucus, mucins, rheology

Abbreviations

AB/PAS: Alcian Blue / Periodic Acid-Schiff stain

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent assay

FEV1: Forced expiratory volume in 1 s

FRAP: fluorescence recovery after photobleaching

HRCT: High-Resolution Computed Tomography

IL: Interleukin

MCC: Mucociliary clearance

mRNA: Messenger ribonucleic acid

MUC: Human mucin (denoted with the number after MUC)

muc5AC: Mucin 5 AC

muc5B: Mucin 5B

non-CF bronchiectasis: non- cystic fibrosis bronchiectasis

PCL: Periciliary layer

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

Abstract

Obstructive lung diseases such as Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Asthma or non-cystic fibrosis (non-CF) bronchiectasis share some major pathophysiological features : small airway involvement, dysregulation of the adaptative and innate immune lung homeostasis, mucus hyperproduction and/or hyper concentration. Mucus regulation is a particularly interesting way to approach these diseases as it contributes to the airflow obstruction, the intensity of symptoms, the severity of theses diseases and to some extent to their prognosis. It is therefore crucial to understand what constitutes the mucus of our patients, its behavior in the stable state and during an exacerbation and its regulatory mechanisms. These are all elements that can represent therapeutic targets, especially in the era of biologics. First, we will briefly discuss the composition and characteristics of sputum with a focus on mucus and mucins in particular, and then elaborate on the different ways of collecting samples and ensuring their quality. We will then review the different direct analytical techniques available in routine or more experimental settings, and discuss their advantages, limitations. We will also discuss indirect ways of assessing mucus (questionnaire, High-Resolution Chest Tomography (HRCT) scanning, lung function). Finally, we will try to integrate these techniques with current and future therapeutic possibilities. Cystic fibrosis will not be discussed in this paper because of its monogenic nature.

Sputum, Mucus and Mucins in healthy subjects

Role and components

Sputum is mucus that is coughed up from the lower airway. Mucus has a physiological role in humidifying the airway, acting as a physical and immunological barrier, and participating in mucociliary transport. It has unique biophysical properties, including viscoelasticity, changing rheology and self-repairing capacity, and is therefore an ideal medium for trapping and immobilizing external pathogens and toxins(1). This important role explains its preservation during the evolution of various species, from corals to humans(2).

In healthy subjects, airway mucus is composed of 98% water, 0.9% salt, 0.8% globular proteins and 0.3% high molecular weight polymers (3). In order to approach the muco-ciliary apparatus as a whole, mucus is now represented as being composed of two gel phases, a mucus layer and a periciliary layer (4) (**Figure 1**). Mucus is mainly composed of mucins. The latter are large glycoproteins (0.2 to 10micronm for a single polymer and about 400 kDa) that have regions rich in serine and threonine residues that can bind by O-Glycosylation to glycan chains.

There are several genes (MUCs) encoding distinct mucins and only seven of them are secreted. Only 5 of these secreted mucins can polymerize and thus take part in the formation of a gel, 3 being secreted in the airway and all located at chromosome 11p15.5: MUC5AC, MUC5B and MUC2 (6). In healthy human airway, MUC5B is the dominant secretory mucin in the superficial epithelium (club cells and goblet cells) and submucosal glands, with distal airway being a major site of expression. MUC2 secretion is negligible (7).

Airway mucins regulation

When discussing the regulation of airway mucins, it is important to distinguish between production (i.e., expression/transcription/synthesis) and secretion (exocytosis of mucins-containing granules). Various pathways enhancing mucus production have been described (8). One of the most studied is the EGFR/RAF/RAS/MEK/ERK pathway that leads to mu5ac gene expression in response to

100 several ligands such as Lipopolysaccharides (LPS), TGF-alpha, Amphiregulin, etc. (9,10). Another
101 pathway of interest, the IL13/STAT6/SPDEF pathway, is also involved in mucus production and is
102 responsible for airway remodeling toward a mucosecretory profile (goblet cell hyperplasia and
103 metaplasia) in obstructive lung diseases (11,12).

104 Mature polymerized mucin secretion occurs continuously at low levels but may be amplified
105 by many stimuli. In the basal state, granule exocytosis is induced by low levels of activation of the
106 purinergic P2Y2 and Adenosine 3 receptors by paracrine released extracellular ATP (and its metabolite,
107 adenosine). The activated receptors are coupled to phospholipase C by the Gq protein, which cleaves
108 Di-acyl-glycerol (DAG) and Inositol triphosphate (IP3). DAG activates Munc13 to open Syntaxin so that
109 it can form a soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex
110 with synaptosomal-associated protein 23 (SNAP-23) and vesicle-associated membrane protein
111 (VAMP), bringing the plasma and granule membranes together. IP3 induces calcium release from IP3
112 receptors (IP3R) into the endoplasmic reticulum, activating synaptotagmin to induce the final coiling
113 of the SNARE complex, which results in membrane fusion and mucin release (13,14).

114 Given these data, we can easily imagine that preserving a mucins MUC5AC/MUC5B ratio is
115 crucial to prevent the development of obstructive lung diseases(15).

116 *Mucus and mucins in muco-obstructive lung diseases*

117 Richard C. Boucher and his team from the university of North Carolina-Chapel Hill have
118 proposed the term “muco-obstructive lung diseases”, which encompasses lung diseases with common
119 pathophysiological features of small airway involvement with mucus plugging, dysregulation of mucins
120 homeostasis (hyperconcentration) and of their biophysical properties (increase of mucus viscosity and
121 elasticity), and airflow obstruction (5). Asthma, which shares all these characteristics, has a place in
122 our discussion despite specific pathological pathways involving innate and adaptative immunity
123 deficiency.

COPD

COPD is defined by respiratory symptoms and airflow obstruction(16). Small airway are early affected (17), which is partly due to mucus hypersecretion. This abnormality is correlated with the severity of airflow obstruction and with mortality(18). Kesimer et al. have shown in patients with severe COPD from the cohort SPIROMICS (Subpopulations and Intermediate Outcomes Measures in COPD Study) that absolute concentrations in mucins MUC5B and MUC5AC were 10 times higher than those in healthy subjects, and that total mucins concentration could predict chronic bronchitis(19). The same team later demonstrated in the same population that MU5AC concentration in induced sputum was better correlated than MUC5B concentration with COPD features (FEV1 (Forced Expiratory Volume in the 1st second), exacerbations rate, hyperinflation)(20). Several mechanisms have been proposed to underpin these observations. They include 1) an obvious impact of past or current cigarette smoke exposure on airway remodeling (goblet cells hyperplasia and metaplasia)(18,21), on mucus production/secretion -in particular through the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)- (10,22,23), and on mucus hydration (24–26), 2) a qualitative impairment of the mucin network, enhanced in the settings of chronic infection and/or acute exacerbations (1,27–29), 3) an impairment of the muco-ciliary clearance that might be worsened by a possible deficiency in cilia motility (30).

Asthma

Mucus plugs have long been described in asthma, especially in fatal cases(31). In severe asthma, they are in relation with the severity of the airflow obstruction and with the eosinophilia in sputum (32). Mucus and especially MUC5AC hyperproduction have also been observed in patients with mild to moderate asthma, whereas muc5b gene expression is rather reduced (33) suggesting a multiplicity of pathophysiological mechanisms leading to such abnormalities (34,35). Although distinct endotypes (Th2-High and Th2-Low) have been described in asthma (36), we will mention here in particular the importance of the IL-13/SPDEF/STAT6 pathway (Interleukine-13/SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor/Signal Transducer And Activator Of Transcription 6) that drives airway remodeling toward a different mucosecretory pattern through goblet cells metaplasia and

hyperplasia (37,38), muc5ac overexpression (39), and presumably reduced production of mucin MUC5B. The latter totally destabilizes the MUC5AC/MUC5B ratio, the increase of which is linked to a Th2-High endotype (40). This is consistent with the observation that a mucus with less mucins MUC5B could favor eosinophils survival (41). In parallel, another study showed that a mucin-rich MUC5AC network was more strongly tethered to the epithelium, impairing mucociliary clearance(42). These data highlight the fact that mucus quality is as important as quantity in our pathophysiological approach. Interestingly, bronchoconstriction alone is also able to induce a secretory epithelial profile and mucus hypersecretion (43), suggesting a possible cross-talk between airway smooth muscle cells (ASMc) and secretory cells that could act through the epithelium-derived cytokine CCL20 and its receptor CCR6 (44,45).

Non-CF bronchiectasis

To propose a common pathophysiological pathway for mucus overproduction/over secretion in non-CF bronchiectasis, a high-resolution chest tomography (HRCT) scanning diagnosis, is a daunting challenge due to the heterogeneity of this entity and the multiplicity of the etiologies, when found(46). The first histopathological studies found severe small airway disease, bronchiolectasis and mucus plugs(47). Besides, although chronic bronchitis and exacerbations are a hallmark of this condition, they are not systematically reported. Data about mucus and mucins regulation are scarce and often extrapolated from Cystic Fibrosis (CF), yet a monogenic disease. The main alterations observed in the sputum of patients are mucins MUC5AC and MUC5B hyperconcentration and an increase of their viscous and elastic modulus. This was contrasting with no increase in mucins gene expressions (48). It suggests that mucus presents at a dehydrated state, possibly induced by local hypoxic inhibitions of CFTR activity (49) or by fluid absorption enhanced by Human Neutrophil Elastase activity (HNE) (50). Noteworthy, 50% of patients with an incident diagnosis of bronchiectasis are found to have at least one CFTR mutations that does not necessarily implies a cystic fibrosis diagnosis(51). At last, the impact of chronic infection and exacerbation deserves a comment, even if there few in vivo studies specifically addressing this issue in non-CF bronchiectasis. Based on in vitro or ex vivo models of Pseudomonas

Aeruginosa infection showing that mucus downregulates bacterial virulence genes at basal state (52,53), we can speculate that alteration of the mucins homeostasis and network in bronchiectasis contribute to mucociliary impairment and increased susceptibility to infection.

As we have just seen, mucus and mucins are major determinants of obstructive airway disease. However, reliable and relevant measurement of these parameters in humans remains challenging.

Samples collection

Flexible Bronchoscopy

Bronchial flexible fibroscopy (also called bronchoscopy) is the mucus collection tool that immediately comes to mind for any respiratory physician. It allows a subjective, non-quantitative macroscopic study of mucus secretion and bronchial mucosa (54)(dilated bronchial mucus glands, atrophy). Bronchoscopy can also be used to aspirate mucus or even mucous plugs, and/or to perform a bronchoalveolar lavage (BAL) whose the fluid will reflect the composition of non-contaminated mucus in small airway. However, retrieval of BAL fluid is variable, especially in patients with the most severe small airway involvement(55). Bronchoscopy also allows bronchial biopsies or epithelial brushings to be taken to assess airway remodeling (56). Although excellent for the latter analysis, the realization of the examination itself may modify several parameters that may impact on the composition or quality of the mucin network: for example, lidocaine is usually instilled into the airway and could reduce mucus production (57,58), saline solution is used for BAL and may change the rheological properties of mucus(59) and finally, cough, physical stress or mechanical stimulation induced by the endoscope may favor mucus secretion through the activation of the cholinergic system(60). The drugs used for anesthesia (when general anesthesia is preferred) may rather impact on mucociliary clearance(61). The medical environment needed, the invasive nature of fibroscopy and its morbidity for the most severe patients remain the main limitations of this examination.

Sputum

Sputum seems the easiest way to collect mucus via cough. No medical supervision is needed for spontaneous sputum. In contrast, “induced sputum” requests serial standardized spirometric assessments and clinical evaluation as hypertonic saline nebulization can lead to bronchial hyperresponsiveness(62,63). Standardized processing procedures (purification, centrifugation, no freezing) are also crucial to obtain reliable data (64). The quality of these samples is usually assured by cytology examination (<25% squamous cells(65)), and alpha-Amylase activity in the sample (19) even if no consensual threshold has been defined. Comparative studies of the two methods have shown similarities in total cell counts but a greater number of viable cells are observed in induced sputum samples (66). Moreover, a correction factor needs to be applied when assessing the percentage of solids and mucins in mucus due to the use of hypertonic saline(67). Another potential pitfall for data analysis is that this hypertonic solution also modifies sputum rheology. That said, the variations are in the same direction for all the pathologies studied (68,69). Although relevant to understand the pathophysiology of obstructive lung diseases, studies with spontaneous sputum methods are restricted to subjects able to expel, and that induced sputum is not feasible in patients with severe airflow obstruction. These facts may introduce a selection bias in such experiments.

Direct assessment techniques of human airway mucus and mucins

Bearing in mind the advantages and disadvantages as well as the potential biases and difficulties associated with sampling human airway mucus, its “direct analysis” remains a valuable and varied source of information, which we will now detail.

Macroscopic studies of sputum

Patients are the first eyewitness to changes in their sputum. In his now famous 1987 paper, Anthonisen defined COPD exacerbation by increased purulence and sputum production (70) and thus supported the introduction of antibiotic in this condition. This definition is still in use in the most recent guidelines(16). The limits of this assessment are intuitive: the definition of purulence is inaccurate

(from uncolored to yellow-green), and the link with bacterial infection of the lower respiratory tract controversial (71,72). Indeed, the presence of pathogens in sputum does not necessarily imply a need for antibiotics(73). Moreover, this “technique” coming from the COPD world can hardly be extrapolated to asthma: here, sputum color may be linked to neutrophilia but does not replace cytology (74,75).

Cytology

Total cell count is a useful routine tool to assess sputum quality (76) and classify airway inflammation, especially in asthma(77): 1) sputum samples with normal neutrophil (<61%) and eosinophil (<1.9%) counts are considered as paucigranulocytic 2) samples with normal neutrophil counts and raised eosinophil counts (≥2%) are considered as eosinophilic 3) samples with raised neutrophil counts (≥61%) and normal eosinophil counts are considered as neutrophilic 4) samples with both raised neutrophil and eosinophil counts are considered as mixed granulocytic. Cytology is relevant to understand mucus regulation as neutrophilia has been linked to mucus hypersecretion through an increase in Human Neutrophil Elastase (HNE) release(78), and sputum hypereosinophilia has been shown to modify mucus and favor mucus plugs notably through the formation of Charcot-Leyden Crystals (CLC) in obstructive diseases such as asthma(32,79). Cytology protocols are now well standardized and their limits are essentially in relation with the sampling quality(76).

Microbiology

We have previously described the influence of microbiome and acute or chronic infection in airway mucus regulation. The current gold standard for sputum microbiology is based on smear microscopic examination (bacteria, mycobacteria, aspergillus), their identification after staining and/or biochemical tests (motility, McFarland standard, fluid thioglycolate medium (FTM), catalase, and oxidase tests), then their cultures for growing in different media. Their antimicrobial will then be tested when possible(80). Numerous quality checks exist at each of these steps. However, the low yield of such technique in the literature for a diagnosis of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) raises

questions : it ranges from 13% for non-invasive techniques up to 56% for invasive sampling (BAL fluid)(81,82). The main limitation reported is once again the quality of the sample, that for instance may be contaminated by pathogens from the upper airway or non-representative of distal airway microenvironment.

The development of Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) procedures allows us to identify an ever-increasing range of pathogens, including viruses, with increased sensitivity and very high specificity (83). This is particularly valuable during acute exacerbations of obstructive lung diseases induced by viruses, as for asthma where it accounts for more than half of cases even in adults (84). Although beneficial to reduce unnecessary exposure to antibiotics, the rise in the use of multiplex molecular assays for respiratory infection syndromes (85) or in stable obstructive lung diseases, also raises concerns due to its high sensitivity: this is likely to lead us to rethink the notions of pathogens colonization, chronic infection and pathogenicity.

Histological and immunostaining

Airway tissue specimens (bronchial biopsies or brushings, lung explant) are routinely assessed with histological stainings (Periodic Acid-Schiff (PAS), Alcian Blue (AB)) that are simple and widespread standardized techniques(86). Fluorescent lectins can be used for semi-quantitative analysis by fluorescence intensity measurement and are inexpensive, although rather reserved for experimental settings(87). It should be noted that non-specific labelling only analyses the mucus and periciliary layers as a whole and not mucins themselves(88). Staining with antibodies (Anti-MUC5AC/Anti-MUC5B) is more specific and authorizes distinct mucins subtypes quantification or cell differentiation and mucociliary clearance assessments (4,89). These techniques may also be coupled with rheological experiments(48), for instance with fluorescent probes or dyes(90). In a future increasingly oriented towards precision medicine and treatable traits, they allow fine endotyping and a quite accurate

measure of the impact of a therapeutic intervention (91). The limitations of these analyses are inherent in the technology, environmental conditions and parameters employed (92,93).

Molecular assays

Mucins MUC5AC and MUC5B genes expression in obstructive lung diseases have been dissected in numerous studies, especially in cigarette smoke exposure models (10,19,23,94,95). Quantitative RT-PCR, Northern Blot or in situ hybridization are inexpensive methods that permit an accurate evaluation of mucins mRNA levels in various conditions (7). However, these analyses deserve careful considerations when it comes to their *in vivo* scalability. First, most of studies are performed in human bronchial epithelial cells cultured at Air-Liquid-Interface (96). This model is very interesting because of its ability to reproduce pathological airway features (97,98), but the model itself has some limits that we will developed in a subsequent paragraph. Secondly, mucins production as assessed by mRNA levels may not be the most suitable way to understand muco-obstructive lung diseases as it is not always congruent with the level of mucin proteins and does not detect post-transcriptional modifications. Indeed, increase of intracellular mucins-containing granules, mucins hyperconcentration (48), dysregulation of epithelial fluid transfer (49) or qualitative change of the mucin network(42) are probably more relevant observations in the context. More recent techniques such as Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) assay, that studies “DNA-Protein/transcription factor” binding interactions (99,100), or single-cell RNA-sequencing assay (101–104), extremely relevant to understand cells populations and linage in heterogenous samples, give us a dynamic vision of the airway epithelium and its muco-secretory cells. We will not develop here genetic approaches essentially based on experimental animal models and described elsewhere(88). Moreover, their use is hardly transposable in daily medical routine.

Semi-quantitative and quantitative assessments of mucin proteins

ELISA technique antibody detection-based western blotting are the widely used techniques to detect mucin proteins(105–107). Sandwich ELISA seems preferable as it offers greater sensitivity and

specificity than absorption ELISA (108). Sputum or BAL volume is here a major limitation in relation with the sampling method that may directly impact on mucin concentrations estimations. In addition, another pitfall in mucins detection is the possible alteration of their epitopes which can lead to underestimation of mucin measurements(48). For instance, Henderson et al. have shown that MUC5B concentrations in CF sputum is systematically underestimated or undetected with immunoblotting in samples containing Pseudomonas Aeruginosa (PA) (109). The authors suggest that this loss of immunodetection might be explained by proteolytic cleavage of MUC5B at antibody recognition sites induced by PA. To overcome this issue, they propose to perform mucus analysis with mass spectrometry. This highly sensitive proteomic tool provide information regarding the relative abundance and types of proteins in human mucus, and introduce the notion of "sputome"(110–112). Beside, percent solids (wt%) represents a much more simple and affordable method that is proving to be correlated with total mucin and DNA concentration in non-CF bronchiectasis mucus (48,113), but without any consideration for its components. Dot-blot assays are also simple tools to detect glycoproteins but they are severely lacking in sensitivity and specificity(114).

Biophysical properties and Rheology of human mucus

The physical behavior of the mucin network is highly influenced by its ratio of mucins MUC5A/MUC5B(40), the structural and conformational changes of each of these mucins (O-glycosylation, degree of sulfation, ionic charges)(107,115) and consequently its interactions with other proteins (DNA, bacteria, etc.) or solvents/fluids(116). In relation with that, rheology, the science of fluid flow and deformation, may be particularly relevant to study mucus and mucociliary clearance. Like any physical science, there are several methods depending on the level of accuracy desired(117). Mucus nano rheology may be performed with fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assays (118). In this setting, probes usually have a 5 nm diameter and report the properties of the solvent or the smallest protein component of mucus. It is interesting to assess the behavior of mucus under various concentrations of solids (119). Micro rheology is an appropriate method to study the local rheology of mucus considered as a whole layer (120) at the epithelial cilia scale. 1 µm particles

are usually used to ensure that the study probes are larger than the correlation length (mesh size) of mucus. Consequently, this method is particularly appropriate to analyze mucus secreted by human bronchial epithelial cells cultured *ex vivo* at Air-Liquid Interface. With the use of microbeads probes, Jory et al. have shown that mucus gradually varies in rheological response, from an elastic behavior close to the epithelium to a viscous one far away (121). At last, a fraction of the mucus sample may be directly assessed. This is the field of macro rheology that can be performed by specific instruments like cone-and-plate rheometer, capillary viscometer, or filancemeter. They enable the estimation of viscosity and elasticity under various physiological or pathological conditions(117), or the impact of therapeutical interventions on mucus rheology, such as hypertonic saline (69,122). This perspective also offers the possibility to focus on mucus adhesion, cohesivity and cough clearance (123). Interestingly, Patarin et al. demonstrated that sputum rheology as assessed by a “miniaturized” cone-and-plate rheometer could be a useful biomarker for differentiating various muco-obstructive lung diseases (68). Additionally, our team have shown that sputum rapid-on site rheology not only is correlated with mucins concentrations as assessed by mass spectrometry, but predicts sputum eosinophilia irrespectively of the underlying disease, which is particularly relevant in the biologic era (*clinicaltrial NCT04081740, manuscript submitted*).

Ex vivo models

This paragraph is deliberately on the borderline between direct and indirect mucus assessments. The most common model. The most relevant model for studying mucus is bronchial epithelia reconstituted from patient bronchial biopsies. These epithelia are cultured at air-liquid interface in order to approximate as closely as possible *in vivo* conditions. Interestingly, these cultures retain the "pathological" phenotype of the patients from which they are derived (percentage of ciliated, club or goblet cells)(124). Ex vivo airway epithelial cell models provide a biologically representative platform for investigating airway diseases (97,98). Numerous current or potential drugs can be tested and

molecular mechanisms elucidated via this model (125,126). However, the experience of the laboratory team is crucial for the success of cell cultures, as contaminations are frequent (127). Moreover, advantage or limit, the reconstituted ex vivo epithelia are free from interactions with the other neighboring functional “compartments” (smooth muscle cells, vessels, collagen and fibroblasts…), even if co-cultures can be performed(128), which may obviously limit the extrapolability of some findings. It may also not be fully representative of the pathophysiological mechanisms involved in the distal airway as biopsies are performed in proximal bronchial airway. 3D organoids, that mimic the major attributes of their counterpart organs in vivo, could overcome this limitation in the future (129–131).

Indirect assessment techniques of human mucus dysregulation

Mucus dysregulation might be indirectly investigated from the perspective of its clinical and paraclinical consequences that we will briefly develop thereafter.

Respiratory symptoms

The most meaningful symptom to address the issue of mucus hyperproduction in muco-obstructive lung diseases is “chronic bronchitis”. It is defined by cough and sputum at least 3 months a year, for 2 years in a row (16). In COPD, it is still part of the diagnostic guidelines though it is reported in a range from 7.4% to 74% of patients (132,133) according to studies, highlighting its subjective nature. Nevertheless, it has been related to exacerbations and mortality(134). Validated questionnaires have been developed to obtain semi-quantitative scales that could be used in clinical trials and daily medical practice. The Cough and Sputum Questionnaire (CASA-Q), mostly used in COPD and asthma, is very specific to chronic bronchitis and has the advantage of assessing both the intensity of symptoms and their impact(135–137). Strikingly, Alagha et al. have shown that chronic bronchitis as assessed by CASA-Q was not correlated to goblet cell hyperplasia in asthma. This calls into question the reliability of our clinical assessments.

Imaging: High-Resolution (HR) and Micro Computed Tomography (CT) scanning

With the exception of bronchiectasis which is an imaging diagnosis, chest HRCT scan cannot confirm a diagnosis of obstructive lung disease on its own, but it can reveal some of their manifestations: air trapping (138), mucus plugs (32,139), atelectasis, bronchiolitis (tree-in-bud), airway wall thickness (140,141). Spirometer-triggered HRCT exist allowing structure-function analysis of small airway, especially when performed after methacholine challenge (142–144). Dunican et al. developed a bronchopulmonary segment-based scoring system to quantify mucus plugs on HRCT scans. Interestingly, a high mucus score was associated with lower FEV1 and with marked increases in sputum eosinophils in patients with asthma, and with lung function outcomes in smokers with limited emphysema (32,145). However, one may object that this technique remains imprecise to know the real nature of bronchial occlusion: distinguishing differences in density between mucus, increased wall thickness or smooth muscle hyperplasia is quite impossible. Micro-CT is particularly interesting to understand the development of small airway diseases directly from human lung samples (18,146,147). Unfortunately, this very anatomical approach has not yet been applied to the study of mucus in humans, but some early work has been initiated in big animals to assess mucociliary transport (148).

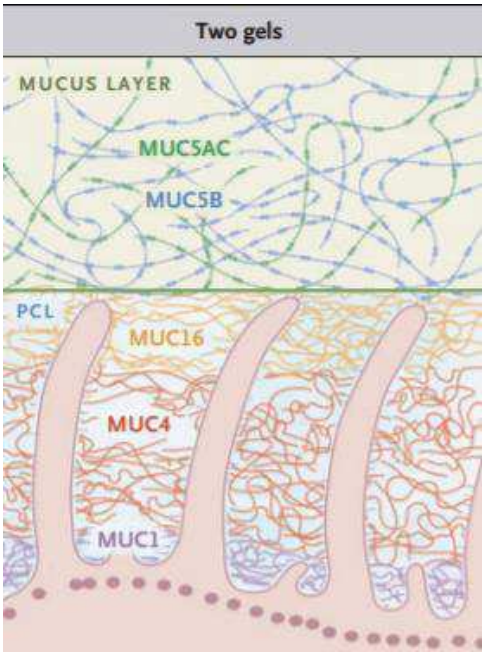
Conclusion

In some ways, mucus dysregulation could be considered as the alpha and omega of obstructive lung diseases such as asthma, COPD or non-CF bronchiectasis. Despite the wide range of available techniques to assess production, secretion, biophysical and biochemical properties, daily medical practice relies for years now on clinical evaluation, chest HRCT, cytology and microbiology. These examinations have an extremely variable added value when considering “endotyping” and provide a random service to the patient. However, our growing knowledge of the pathophysiological mechanisms at work in these diseases is opening up new challenges. Improving current techniques and developing new models to collect and analyze human mucus samples and study *in vivo* pathophysiological mechanisms are perquisites for understanding intra-individual dynamics of mucus

and its interactions with the (micro)environment. Not every technique described in this review may benefit from a widespread use because of the expertise and time-processing required. With the miniaturization of device, mucus macro rheology assessment seems to be one of the most easily accessible biomarkers for nowadays medicine, with tangible connections between past, current and future therapeutics and clinical outcomes. Indeed, mucolytics such as hypertonic saline and rhDNAse are able to influence the hydration state of mucus(68,122), whereas macrolides (azithromycin, erythromycin) inhibits mucus secretion and have proved to reduce exacerbations in obstructive lung diseases(149–151). In the age of monoclonal antibodies from the world of asthma (Anti-IL5/5R, Anti-IL-4/13R, Anti-TSLP)(152–155), some of which directly impact airway remodeling or even inhibit mucus secretion, the implementation of such a method as a point-of-care or simply to guide therapy would be of great interest (COPD CaRhe - clinicaltrial.gov NCT04339270). Finally, in order to better understand the complexity of mucus regulation, it is likely that a multimodal approach will come closest to what we call tailored medicine and may even allow early detection of these diseases.

414 ***Figure 1***

415



416

417 *Figure 1.* ***Model of mucus transport, from Richard C. Boucher – The New England Journal of Medicine.*** *PCL: periciliary layer*

418

Figure 2

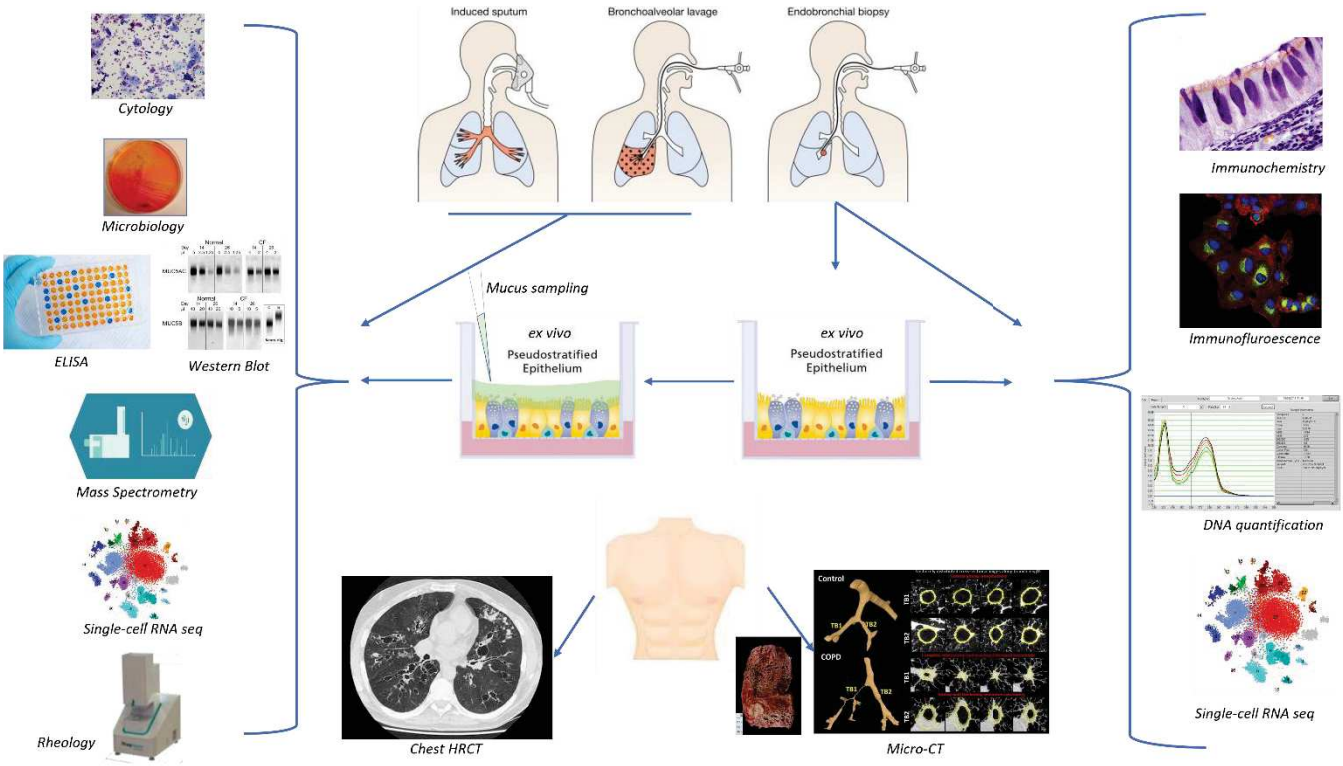


Figure 2. Summary of main current direct and indirect techniques to assess airway mucus and mucins. HRCT: High-Resolution Computed Tomography; RNA: Ribonucleic Acid

425 ***Table 1***

	Production	Secretion	Biophysicial Behaviour	Strengths	Limits
Total cell count (sputum/BALF)	-	-	+ *(indirect link)*	Simple, unexpansive, performed routinely in health facilities	Information provided about mucus are limited
Microbiology	+/- *(indirect link)*	+/- *(indirect link)*	+/- *(indirect link)*	Simple, unexpansive, performed routinely in health facilities	No clear direct correlation *in vivo* between bacterial load and mucus production/secretion
ELISA (mucins)	++ *(cell lysates)*	++	-	Quantitative assay, can be used in vivo Rapid and simple measurement of intra- or extra-cellular mucins	Caution needed with samples processing and epitopes intactness, or homologous regions
Western Blot (mucins)	++ *(cell lysates)*	++	-	Rapid and simple measurement of intra- or extra-cellular mucins	Semi-quantitative Caution needed with samples processing and verification of specificity Requires denaturation of mucins for running on agarose gels
Immunohistochemistry and Immunofluorescence (secretory cells, mucus)	+ *(intracellular mucins)*	+	-	Spatial localization of mucins in airway and/or in secretory cells, co-localization with other components	Qualitative or semi-quantitative assessment. Time-consuming Scoring system needs blinded individuals
Mass Spectrometry	++	++	-	Accurate quantitative assay Very high specificity	Not routinely performed Expansive, Time-consuming
Quantitative RT-PCR (mucins mRNA)	+++	-	-	Simple, unexpansive Specific quantitative information on mucin expression at the mRNA level	No detection of post-transcriptional modifications
Single-cell RNA seq	+ *(intracellular mechanisms)*	+ *(intra cellular mechanisms)*	-	Dynamic picture of the intra-cellular mucus-secreting/producing machinery	No quantitative assessment of mucins production and secretion Expansive and time-consuming
Rheology	-	+/- *(indirect link)*	+++ *(viscoelastic properties)*	May be easily performed with *in vivo* samples Relationship with clinical phenotyping	The yield of sputum collection is variable Caution needed with samples processing and quality check (salivary contamination)
Ex vivo models	++	++	+	Chronic airway disease phenotype is maintened Measurement of exposure to drugs or toxics is feasible	Lab expertise needed for cell culture, mucus sampling might be difficult (PBS washes) Time consuming
HRCT	-	+ **(indirect scoring)**	-	Routinely performed, unexpansive *In vivo* endotyping of chronic airway disease	No specific informations on mucus production or secretion
Micro-CT	-	+ **(indirect observation)**	-	High-quality *ex vivo* imaging of small airway diseases	Expansive Invasive method (surgical lung biopsy or lung explant)

426

427 *Figure 3. Strengths and limits of main current direct and indirect techniques to assess airway mucus and mucins*

References

1. Meldrum OW, Chotirmall SH. Mucus, Microbiomes and Pulmonary Disease. Biomedicines. 13 juin 2021;9(6):675.

2. Bakshani CR, Morales-Garcia AL, Althaus M, Wilcox MD, Pearson JP, Bythell JC, et al. Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. npj Biofilms Microbiomes. 4 juill 2018;4(1):1-12.

3. Rose MC, Voynow JA. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. Physiological Reviews. 1 janv 2006;86(1):245-78.

4. Button B, Cai L-H, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. Science. 24 août 2012;337(6097):937-41.

5. Boucher RC. Muco-Obstructive Lung Diseases. New England Journal of Medicine. 16 mai 2019;380(20):1941-53.

6. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. Annu Rev Physiol. 1 mars 2008;70(1):459-86.

7. Okuda K, Chen G, Subramani DB, Wolf M, Gilmore RC, Kato T, et al. Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine [Internet]. 23 oct 2018 [cité 21 nov 2018]; Disponible sur: https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201804-0734OC

8. Voynow JA. Mucins, Mucus, and Sputum. CHEST Journal. 1 févr 2009;135(2):505.

9. Burgel P-R, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. Thorax. nov 2004;59(11):992-6.

10. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel P-R, Dao-Pick T, Ueki IF, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 1 janv 2001;280(1):L165-72.

11. Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease. Cytokine. sept 2015;75(1):68-78.

12. Yu H, Li Q, Kolosov VictorP, Perelman JuliyM, Zhou X. Interleukin-13 Induces Mucin 5AC Production Involving STAT6/SPDEF in Human Airway Epithelial Cells. Cell Communication & Adhesion. 1 août 2010;17(4-6):83-92.

13. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. New England Journal of Medicine. 2010;363(23):2233-47.

14. Adler K, Tuvim M, Dickey B. Regulated Mucin Secretion from Airway Epithelial Cells. Frontiers in Endocrinology. 2013;4:129.

15. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. Nature. 16 janv 2014;505(7483):412-6.

16. 2021 GOLD Reports [Internet]. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. [cité 17 oct 2021]. Disponible sur: https://goldcopd.org/2021-gold-reports/

17. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, et al. Small-Airway Obstruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. New England Journal of Medicine. 26 oct 2011;365(17):1567-75.

18. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 24 juin 2004;350(26):2645-53.

19. Kesimer M, Ford AA, Ceppe A, Radicioni G, Cao R, Davis CW, et al. Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis. New England Journal of Medicine. 7 sept 2017;377(10):911-22.

20. Radicioni G, Ceppe A, Ford AA, Alexis NE, Barr RG, Bleecker ER, et al. Airway mucin MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort. The Lancet Respiratory Medicine. mai 2021;S2213260021000795.

21. Innes AL. Epithelial Mucin Stores Are Increased in the Large Airways of Smokers With Airflow Obstruction<xref rid="AFF1">[*]</xref> CHEST Journal. 1 oct 2006;130(4):1102.

22. Shao MXG, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor -converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 30 sept 2003;100(20):11618-23.

23. Shao MXG, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-α-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 1 août 2004;287(2):L420-7.

24. Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, et al. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. FASEB J. févr 2012;26(2):533-45.

25. Anderson WH, Coakley RD, Button B, Henderson AG, Zeman KL, Alexis NE, et al. The Relationship of Mucus Concentration (Hydration) to Mucus Osmotic Pressure and Transport in Chronic Bronchitis. Am J Respir Crit Care Med. 24 avr 2015;192(2):182-90.

26. Kreda SM, Seminario-Vidal L, van Heusden CA, O'Neal W, Jones L, Boucher RC, et al. Receptor-promoted exocytosis of airway epithelial mucin granules containing a spectrum of adenine nucleotides. J Physiol. 15 juin 2010;588(Pt 12):2255-67.

27. Jeffries JL, Jia J, Choi W, Choe S, Miao J, Xu Y, et al. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewisx to increase binding to airway epithelial cells. Mucosal Immunol. juill 2016;9(4):1039-50.

28. Hoffman CL, Lalsiamthara J, Aballay A. Host Mucin Is Exploited by Pseudomonas aeruginosa To Provide Monosaccharides Required for a Successful Infection. mBio. 11(2):e00060-20.

29. Sibila O, Garcia-Bellmunt L, Giner J, Rodrigo-Troyano A, Suarez-Cuartin G, Torrego A, et al. Airway Mucin 2 Is Decreased in Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease with Bacterial Colonization. Ann Am Thorac Soc. mai 2016;13(5):636-42.

30. Perotin J-M, Coraux C, Lagonotte E, Birembaut P, Delepine G, Polette M, et al. Alteration of primary cilia in COPD. European Respiratory Journal [Internet]. 1 juill 2018 [cité 21 oct 2021];52(1). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/1/1800122

31. Kuyper LM, Paré PD, Hogg JC, Lambert RK, Ionescu D, Woods R, et al. Characterization of airway plugging in fatal asthma. Am J Med. juill 2003;115(1):6-11.

32. Dunican EM, Elicker BM, Gierada DS, Nagle SK, Schiebler ML, Newell JD, et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. J Clin Invest. 1 mars 2018;128(3):997-1009.

33. 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. 1 sept 2009;180(5):388-95.

34. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and Moderate Asthma Is Associated with Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression. Am J Respir Crit Care Med. 1 févr 2001;163(2):517-23.

35. Bush A. Pathophysiological Mechanisms of Asthma. Frontiers in Pediatrics. 2019;7:68.

36. Kuruvilla ME, Lee FE-H, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. Clinic Rev Allerg Immunol. avr 2019;56(2):219-33.

37. Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, et al. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. J Clin Invest. oct 2009;119(10):2914-24.

38. Park K-S, Korfhagen TR, Bruno MD, Kitzmiller JA, Wan H, Wert SE, et al. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. J Clin Invest. avr 2007;117(4):978-88.

39. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nat Med. août 2002;8(8):885-9.

40. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, Dunican EM, Yu M, Carrington SD, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2016;194(10):1296-9.

41. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis - PubMed [Internet]. [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25497369/

42. Bonser LR, Zlock L, Finkbeiner W, Erle DJ. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma [Internet]. 2016 [cité 25 sept 2017]. Disponible sur: https://www.jci.org/articles/view/84910/pdf

43. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. N Engl J Med. 26 mai 2011;364(21):2006-15.

44. Faiz A, Weckmann M, Tasena H, Vermeulen CJ, Berge MV den, Hacken NHT ten, et al. Profiling of healthy and asthmatic airway smooth muscle cells following interleukin-1β treatment: a novel role for CCL20 in chronic mucus hypersecretion. European Respiratory Journal [Internet]. 1 août 2018 [cité 22 oct 2021];52(2). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/2/1800310

45. Martin JG. Airway smooth muscle may drive mucus hypersecretion in asthma. European Respiratory Journal [Internet]. 1 août 2018 [cité 22 oct 2021];52(2). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/2/1801166

46. Araújo D, Shteinberg M, Aliberti S, Goeminne PC, Hill AT, Fardon T, et al. Standardised classification of the aetiology of bronchiectasis using an objective algorithm. European Respiratory Journal [Internet]. 1 déc 2017 [cité 23 oct 2021];50(6). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/50/6/1701289

47. Whitwell F. A Study of the Pathology and Pathogenesis of Bronchiectasis *. Thorax. sept 1952;7(3):213-39.

48. Ramsey KA, Chen ACH, Radicioni G, Lourie R, Martin M, Broomfield A, et al. Airway Mucus Hyperconcentration in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 15 mars 2020;201(6):661-70.

49. Zheng W, Kuhlicke J, Jäckel K, Eltzschig HK, Singh A, Sjöblom M, et al. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. FASEB J. janv 2009;23(1):204-13.

50. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na+ channels and increases airway epithelial Na+ transport. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. mai 2005;288(5):L813-819.

51. Ziedalski TM, Kao PN, Henig NR, Jacobs SS, Ruoss SJ. Prospective analysis of cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in adults with bronchiectasis or pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. Chest. oct 2006;130(4):995-1002.

52. Wheeler KM, Cárcamo-Oyarce G, Turner BS, Dellos-Nolan S, Co JY, Lehoux S, et al. Mucin glycans attenuate the virulence of Pseudomonas aeruginosa in infection. Nat Microbiol. déc 2019;4(12):2146-54.

53. Ramphal R, Arora SK, Ritchings BW. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of Pseudomonas aeruginosa. Am J Respir Crit Care Med. oct 1996;154(4 Pt 2):S170-174.

54. Hirschfeld JH. Dilated bronchial mucous glands in chronic bronchitis, a neglected morphologic finding. Correlation of bronchoscopic and bronchographic appearance. Am Rev Respir Dis. janv 1961;83:16-25.

55. Leaker BR, Nicholson GC, Ali FY, Daudi N, O'Connor BJ, Barnes PJ. Bronchoabsorption; a novel bronchoscopic technique to improve biomarker sampling of the airway. Respir Res. 4 sept 2015;16:102.

56. Bush A, Pohunek P. Brush Biopsy and Mucosal Biopsy. Am J Respir Crit Care Med. 1 août 2000;162(supplement_1):S18-22.

57. Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Houtmeyers E, de Paepe K, Decramer M. High-dose lidocaine reduces airway mucus transport velocity in intubated anesthetized dogs. Respir Med. févr 2006;100(2):258-63.

58. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. Anesthesiology. sept 2012;117(3):580-91.

59. Kim C-H, Hyun Song M, Eun Ahn Y, Lee J-G, Yoon J-H. Effect of hypo-, iso- and hypertonic saline irrigation on secretory mucins and morphology of cultured human nasal epithelial cells. Acta Otolaryngol. déc 2005;125(12):1296-300.

60. Ramnarine SI, Haddad EB, Khawaja AM, Mak JC, Rogers DF. On muscarinic control of neurogenic mucus secretion in ferret trachea. J Physiol. 15 juill 1996;494(Pt 2):577-86.

61. Bronchial mucus transport velocity in patients receiving propofol and remifentanil versus sevoflurane and remifentanil anesthesia - PubMed [Internet]. [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16632821/

62. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. Am J Respir Crit Care Med. oct 1996;154(4 Pt 1):866-9.

63. Induced sputum analysis: step by step | European Respiratory Society [Internet]. [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: https://breathe.ersjournals.com/content/9/4/300

64. Davies JR, Wickström C, Thornton DJ. Gel-forming and cell-associated mucins: preparation for structural and functional studies. Methods Mol Biol. 2012;842:27-47.

65. Joyce SM. Sputum analysis and culture. Ann Emerg Med. mars 1986;15(3):325-8.

66. Bhowmik A, Seemungal T a. R, Sapsford RJ, Devalia JL, Wedzicha JA. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 1 nov 1998;53(11):953-6.

67. Henderson AG, Fuller F, Anderson WH, Alexis NE, Lazarowski ER, Kesimer M, et al. Differences Between Spontaneous and Induced Sputum in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). In: B38 TALKING ABOUT COPD BIOMARKERS [Internet]. American Thoracic Society; 2015 [cité 25 oct 2021]. p. A2914-A2914. (American Thoracic Society International Conference Abstracts). Disponible sur: https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2015.191.1_MeetingAbstracts.A2914

68. Patarin J, Ghiringhelli É, Darsy G, Obamba M, Bochu P, Camara B, et al. Rheological analysis of sputum from patients with chronic bronchial diseases. Scientific Reports. 24 sept 2020;10(1):15685.

69. King M, Dasgupta B, Tomkiewicz RP, Brown NE. Rheology of cystic fibrosis sputum after in vitro treatment with hypertonic saline alone and in combination with recombinant human deoxyribonuclease I. Am J Respir Crit Care Med. juill 1997;156(1):173-7.

70. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Ann Intern Med. févr 1987;106(2):196-204.

71. Daniels JMA, Graaff CSD, Vlaspolder F, Snijders D, Jansen HM, Boersma WG. Sputum colour reported by patients is not a reliable marker of the presence of bacteria in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Clinical Microbiology and Infection. 2010;16(6):583-8.

72. Allegra L, Blasi F, Diano P, Cosentini R, Tarsia P, Confalonieri M, et al. Sputum color as a marker of acute bacterial exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Respiratory Medicine. 1 juin 2005;99(6):742-7.

73. Miravitlles M, Kruesmann F, Haverstock D, Perroncel R, Choudhri SH, Arvis P. Sputum colour and bacteria in chronic bronchitis exacerbations: a pooled analysis. European Respiratory Journal. 1 juin 2012;39(6):1354-60.

74. Pabreja K, Gibson P, Lochrin AJ, Wood L, Baines KJ, Simpson JL. Sputum colour can identify patients with neutrophilic inflammation in asthma. BMJ Open Respiratory Research. 1 oct 2017;4(1):e000236.

75. Berlyne GS, Efthimiadis A, Hussack P, Groves D, Dolovich J, Hargreave FE. Sputum in asthma: Color versus cell counts. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1 janv 2000;105(1):182-3.

76. Leader of the Working Group: A. Efthimiadis1 AS, Group M of the W, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. European Respiratory Journal. 1 juill 2002;20(37 suppl):19s-23s.

77. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. Am J Respir Crit Care Med. 1 août 2008;178(3):218-24.

78. Shao MX, Nadel JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-α-converting enzyme. The Journal of Immunology. 2005;175(6):4009-16.

79. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, Gevaert E, Aegerter H, Percier J-M, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. Science [Internet]. 24 mai 2019 [cité 24 janv 2020];364(6442). Disponible sur: https://science.sciencemag.org/content/364/6442/eaaw4295

80. Shen F, Sergi C. Sputum Analysis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563195/

81. Ranzani OT, Senussi T, Idone F, Ceccato A, Li Bassi G, Ferrer M, et al. Invasive and non-invasive diagnostic approaches for microbiological diagnosis of hospital-acquired pneumonia. Crit Care. 18 févr 2019;23(1):51.

82. Naidus EL, Lasalvia MT, Marcantonio ER, Herzig SJ. The Diagnostic Yield of Noninvasive Microbiologic Sputum Sampling in a Cohort of Patients with Clinically Diagnosed Hospital-Acquired Pneumonia. J Hosp Med. 1 janv 2018;13(1):34-7.

83. Hanson KE, Azar MM, Banerjee R, Chou A, Colgrove RC, Ginocchio CC, et al. Molecular Testing for Acute Respiratory Tract Infections: Clinical and Diagnostic Recommendations From the IDSA's Diagnostics Committee. Clinical Infectious Diseases. 15 nov 2020;71(10):2744-51.

84. Kurai D, Saraya T, Ishii H, Takizawa H. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD. Frontiers in Microbiology. 2013;4:293.

85. Monard C, Pehlivan J, Auger G, Alviset S, Tran Dinh A, Duquaire P, et al. Multicenter evaluation of a syndromic rapid multiplex PCR test for early adaptation of antimicrobial therapy in adult patients with pneumonia. Critical Care. 14 juill 2020;24(1):434.

86. Ostedgaard LS, Moninger TO, McMenimen JD, Sawin NM, Parker CP, Thornell IM, et al. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. Proc Natl Acad Sci U S A. 27 juin 2017;114(26):6842-7.

87. McGuckin MA, Thornton DJ. Detection and quantitation of mucins using chemical, lectin, and antibody methods. Methods Mol Biol. 2000;125:45-55.

88. Atanasova KR, Reznikov LR. Strategies for measuring airway mucus and mucins. Respiratory Research. 21 nov 2019;20(1):261.

89. Khelloufi M-K, Loiseau E, Jaeger M, Molinari N, Chanez P, Gras D, et al. Spatiotemporal organization of cilia drives multiscale mucus swirls in model human bronchial epithelium. Sci Rep. 5 févr 2018;8(1):2447.

90. Requena S, Ponomarchuk O, Castillo M, Rebik J, Brochiero E, Borejdo J, et al. Imaging viscosity of intragranular mucin matrix in cystic fibrosis cells. Sci Rep. 1 déc 2017;7(1):16761.

91. Agusti A, Bel E, Thomas M, Vogelmeier C, Brusselle G, Holgate S, et al. Treatable traits: toward precision medicine of chronic airway diseases. European Respiratory Journal. 1 févr 2016;47(2):410-9.

92. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy | Journal of Cell Biology | Rockefeller University Press [Internet]. [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: https://rupress.org/jcb/article/185/7/1135/35453/Accuracy-and-precision-in-quantitative

93. Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. Lab Invest. juill 2018;98(7):844-55.

94. Takeyama K, Dabbagh K, Lee H-M, Agustí C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc Natl Acad Sci U S A. 16 mars 1999;96(6):3081-6.

95. Amatngalim GD, Schrumpf JA, Dishchekenian F, Mertens TCJ, Ninaber DK, Linden AC van der, et al. Aberrant epithelial differentiation by cigarette smoke dysregulates respiratory host defence. European Respiratory Journal. 1 avr 2018;51(4):1701009.

96. Thornton DJ, Gray T, Nettesheim P, Howard M, Koo JS, Sheehan JK. Characterization of mucins from cultured normal human tracheobronchial epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. juin 2000;278(6):L1118-1128.

97. Gras D, Chanez P, Vachier I, Petit A, Bourdin A. Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. Pharmacology & Therapeutics. déc 2013;140(3):290-305.

98. Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. Journal of Allergy and Clinical Immunology. mai 2012;129(5):1259-1266.e1.

99. Wang X, Li Y, Luo D, Wang X, Zhang Y, Liu Z, et al. Lyn regulates mucus secretion and MUC5AC via the STAT6 signaling pathway during allergic airway inflammation. Sci Rep. 16 févr 2017;7(1):42675.

100. Chen G, Ribeiro CMP, Sun L, Okuda K, Kato T, Gilmore RC, et al. XBP1S Regulates MUC5B in a Promoter Variant–Dependent Pathway in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Airway Epithelia. Am J Respir Crit Care Med. 15 juill 2019;200(2):220-34.

101. Jackson ND, Everman JL, Chioccioli M, Feriani L, Goldfarbmuren KC, Sajuthi SP, et al. Single-Cell and Population Transcriptomics Reveal Pan-epithelial Remodeling in Type 2-High Asthma. Cell Reports. juill 2020;32(1):107872.

102. Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel M-J, et al. Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. Development [Internet]. 23 oct 2019 [cité 25 oct 2021];146(20). Disponible sur: https://doi.org/10.1242/dev.177428

103. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. Nature. nov 2020;587(7835):619-25.

104. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. Nature. août 2018;560(7718):319-24.

105. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, Fardon TC, Finch S, Mateus EF, et al. Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis: Mucins in bronchiectasis. Respirology. oct 2015;20(7):1082-8.

106. Abdullah LH, Wolber C, Kesimer M, Sheehan JK, Davis CW. Studying Mucin Secretion from Human Bronchial Epithelial Cell Primary Cultures. In: McGuckin MA, Thornton DJ, éditeurs. Mucins: Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [cité 25 oct 2021]. p. 259-77. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-513-8_16

107. THORNTON DJ, CARLSTEDT I, HOWARD M, DEVINE PL, PRICE MR, SHEEHAN JK. Respiratory mucins: identification of core proteins and glycoforms. Biochemical Journal. 15 juin 1996;316(3):967-75.

108. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. J Nat Med. 1 janv 2018;72(1):32-42.

109. Henderson AG, Ehre C, Button B, Abdullah LH, Cai L-H, Leigh MW, et al. Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. J Clin Invest. 1 juill 2014;124(7):3047-60.

110. Kesimer M, Sheehan JK. Mass Spectrometric Analysis of Mucin Core Proteins. In: McGuckin MA, Thornton DJ, éditeurs. Mucins: Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [cité 25 oct 2021]. p. 67-79. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-513-8_4

111. Nicholas B, Skipp P, Mould R, Rennard S, Davies DE, O'Connor CD, et al. Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum. PROTEOMICS. 2006;6(15):4390-401.

112. Radicioni G, Cao R, Carpenter J, Ford AA, Wang TT, Li Y, et al. The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome. Mucosal Immunol. nov 2016;9(6):1442-54.

113. A Biophysical Basis for Mucus Solids Concentration as a Candidate Biomarker for Airways Disease [Internet]. [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087681

114. Xiang Y, Zheng Y, Liu S, Liu G, Li Z, Dong W. Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. Sci Rep. 8 juin 2021;11(1):12022.

115. Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule. J Biol Chem. 4 avr 1997;272(14):9561-6.

116. Verdugo P. Supramolecular Dynamics of Mucus. Cold Spring Harb Perspect Med. nov 2012;2(11):a009597.

117. Lai SK, Wang Y-Y, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. Adv Drug Deliv Rev. 27 févr 2009;61(2):86-100.

118. Hill DB, Button B. Establishment of respiratory air-liquid interface cultures and their use in studying mucin production, secretion, and function. Methods Mol Biol. 2012;842:245-58.

119. Hill DB, Long RF, Kissner WJ, Atieh E, Garbarine IC, Markovetz MR, et al. Pathological mucus and impaired mucus clearance in cystic fibrosis patients result from increased concentration, not altered pH. Eur Respir J. déc 2018;52(6):1801297.

120. Meldrum OW, Yakubov GE, Bonilla MR, Deshmukh O, McGuckin MA, Gidley MJ. Mucin gel assembly is controlled by a collective action of non-mucin proteins, disulfide bridges, Ca2+-mediated links, and hydrogen bonding. Sci Rep. 11 avr 2018;8(1):5802.

121. Frontiers | Mucus Microrheology Measured on Human Bronchial Epithelium Culture | Physics [Internet]. [cité 15 oct 2021]. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2019.00019/full

122. Budai-Szűcs M, Berkó S, Kovács A, Jaikumpun P, Ambrus R, Halász A, et al. Rheological effects of hypertonic saline and sodium bicarbonate solutions on cystic fibrosis sputum in vitro. BMC Pulmonary Medicine. 12 juill 2021;21(1):225.

123. Button B, Goodell HP, Atieh E, Chen Y-C, Williams R, Shenoy S, et al. Roles of mucus adhesion and cohesion in cough clearance. Proc Natl Acad Sci USA. 04 2018;115(49):12501-6.

124. Knabe L, Petit A, Vernisse C, Charriot J, Pugnière M, Henriquet C, et al. CCSP counterbalances airway epithelial-driven neutrophilic chemotaxis. Eur Respir J. juill 2019;54(1).

125. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, et al. SUpplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in copd. Chest [Internet]. 4 déc 2014 [cité 8 déc 2014]; Disponible sur: http://dx.doi.org/10.1378/chest.14-1174

126. Singanayagam A, Glanville N, Girkin JL, Ching YM, Marcellini A, Porter JD, et al. Corticosteroid suppression of antiviral immunity increases bacterial loads and mucus production in COPD exacerbations. Nat Commun. 8 juin 2018;9(1):2229.

127. Gras D, Petit A, Charriot J, Knabe L, Alagha K, Gamez AS, et al. Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth. BMC Pulm Med. 3 mai 2017;17(1):80.

128. O'Sullivan MJ, Jang JH, Panariti A, Bedrat A, Ijpma G, Lemos B, et al. Airway Epithelial Cells Drive Airway Smooth Muscle Cell Phenotype Switching to the Proliferative and Pro-inflammatory Phenotype. Frontiers in Physiology. 2021;12:754.

129. van der Vaart J, Clevers H. Airway organoids as models of human disease. Journal of Internal Medicine. 2021;289(5):604-13.

130. Zhou J, Li C, Sachs N, Chiu MC, Wong BH-Y, Chu H, et al. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus. PNAS. 26 juin 2018;115(26):6822-7.

131. Bourguignon C, Vernisse C, Mianné J, Fieldès M, Ahmed E, Petit A, et al. [Lung organoids]. Med Sci (Paris). avr 2020;36(4):382-8.

132. de Oca MM, Halbert RJ, Lopez MV, Perez-Padilla R, Tálamo C, Moreno D, et al. The chronic bronchitis phenotype in subjects with and without COPD: the PLATINO study. Eur Respir J. juill 2012;40(1):28-36.

133. Burgel P-R, Nesme-Meyer P, Chanez P, Caillaud D, Carré P, Perez T, et al. Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subjects. Chest. avr 2009;135(4):975-82.

134. Lahousse L, Seys LJM, Joos GF, Franco OH, Stricker BH, Brusselle GG. Epidemiology and impact of chronic bronchitis in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J [Internet]. 10 août 2017 [cité 25 janv 2020];50(2). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593375/

135. Alagha K, Bourdin A, Vernisse C, Garulli C, Tummino C, Charriot J, et al. Goblet cell hyperplasia as a feature of neutrophilic asthma. Clin Exp Allergy. juin 2019;49(6):781-8.

136. Deslee G, Burgel P-R, Escamilla R, Chanez P, Court-Fortune I, Nesme-Meyer P, et al. Impact of current cough on health-related quality of life in patients with COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 13 sept 2016;11:2091-7.

137. Monz BU, Sachs P, McDonald J, Crawford B, Nivens MC, Tetzlaff K. Responsiveness of the cough and sputum assessment questionnaire in exacerbations of COPD and chronic bronchitis. Respir Med. avr 2010;104(4):534-41.

138. Bommart S, Marin G, Bourdin A, Molinari N, Klein F, Hayot M, et al. Relationship between CT air trapping criteria and lung function in small airway impairment quantification. BMC Pulm Med. 28 févr 2014;14:29.

139. Okajima Y, Come C, Nardelli P, Sonavane S, Yen A, Hrudaya N, et al. Mucus plugging on CT and mortality in smokers. European Respiratory Journal [Internet]. 28 sept 2019 [cité 26 oct 2021];54(suppl 63). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/54/suppl_63/OA1917

140. Gono H, Fujimoto K, Kawakami S, Kubo K. Evaluation of airway wall thickness and air trapping by HRCT in asymptomatic asthma. European Respiratory Journal. 1 déc 2003;22(6):965-71.

141. Telenga ED, Oudkerk M, van Ooijen PMA, Vliegenthart R, ten Hacken NHT, Postma DS, et al. Airway wall thickness on HRCT scans decreases with age and increases with smoking. BMC Pulmonary Medicine. 1 févr 2017;17(1):27.

142. Robinson TE, Leung AN, Moss RB, Blankenberg FG, Bloch DA, Oehlert JW, et al. Spirometer-Triggered High Resolution Computed Tomography (HRCT) of the Chest, Clinical Score, and Pulmonary Function Measurements in Cystic Fibrosis (CF) Patients before and after Treatment for a Pulmonary Exacerbation. Pediatr Res. avr 1999;45(7):355-355.

143. King GG, Carroll JD, Müller NL, Whittall KP, Gao M, Nakano Y, et al. Heterogeneity of narrowing in normal and asthmatic airways measured by HRCT. European Respiratory Journal. 1 août 2004;24(2):211-8.

144. Marin G, Gamez AS, Molinari N, Kacimi D, Vachier I, Paganin F, et al. Distal airway impairment in obese normoreactive women. Biomed Res Int. 2013;2013:707856.

145. Dunican EM, Elicker BM, Henry T, Gierada DS, Schiebler ML, Anderson W, et al. Mucus Plugs and Emphysema in the Pathophysiology of Airflow Obstruction and Hypoxemia in Smokers. Am J Respir Crit Care Med. 15 avr 2021;203(8):957-68.

146. Hogg JC, McDonough JE, Sanchez PG, Cooper JD, Coxson HO, Elliott WM, et al. Micro-computed tomography measurements of peripheral lung pathology in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 15 sept 2009;6(6):546-9.

147. Kirby M, Tanabe N, Vasilescu DM, Cooper JD, McDonough JE, Verleden SE, et al. Computed Tomography Total Airway Count Is Associated with the Number of Micro–Computed Tomography Terminal Bronchioles. Am J Respir Crit Care Med. 1 mars 2020;201(5):613-5.

148. Ortiz JL, Ortiz A, Milara J, Armengot M, Sanz C, Compañ D, et al. Evaluation of Mucociliary Clearance by Three Dimension Micro-CT-SPECT in Guinea Pig: Role of Bitter Taste Agonists. PLOS ONE. 10 oct 2016;11(10):e0164399.

149. Uzun S, Djamin RS, Kluytmans JAJW, Mulder PGH, Veer NE van't, Ermens AAM, et al. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet Respiratory Medicine. 1 mai 2014;2(5):361-8.

150. Chalmers JD, Boersma W, Lonergan M, Jayaram L, Crichton ML, Karalus N, et al. Long-term macrolide antibiotics for the treatment of bronchiectasis in adults: an individual participant data meta-analysis. The Lancet Respiratory Medicine. 1 oct 2019;7(10):845-54.

151. Reijnders TDY, Saris A, Schultz MJ, Poll T van der. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care. The Lancet Respiratory Medicine. 1 juin 2020;8(6):619-30.

152. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med. 5 mars 2009;360(10):973-84.

153. Castro M, Wenzel SE, Bleecker ER, Pizzichini E, Kuna P, Busse WW, et al. Benralizumab, an anti-interleukin 5 receptor α monoclonal antibody, versus placebo for uncontrolled eosinophilic asthma: a phase 2b randomised dose-ranging study. Lancet Respir Med. nov 2014;2(11):879-90.

154. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. New England Journal of Medicine. 21 mai 2018;0(0):null.

155. Diver S, Khalfaoui L, Emson C, Wenzel SE, Menzies-Gow A, Wechsler ME, et al. Effect of tezepelumab on airway inflammatory cells, remodelling, and hyperresponsiveness in patients with moderate-to-severe uncontrolled asthma (CASCADE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. The Lancet Respiratory Medicine [Internet]. 10 juill 2021 [cité 12 juill 2021];0(0). Disponible sur: https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(21)00226-5/abstract

IV. Propriétés mucomodificatrices des thérapies « conventionnelles » actuellement disponibles chez l'homme dans les pathologies obstructives bronchiques

Bien que le mucus soit un mécanisme de défense tout à fait physiologique, nous avons vu que des dysfonctionnements de sa régulation contribuent grandement à la survenue d'événements cliniques défavorables. Maintenant que nous avons détaillé les outils permettant d'évaluer le mucus sous différents aspects nous allons nous intéresser aux principales thérapeutiques « mucomodificatrices » passées, actuelles et à venir dans l'asthme la BPCO, et les bronchectasies non-CF, à savoir celles pouvant impacter 1) la production (synthèse et remodelage des voies aériennes) et/ou 2) la sécrétion et/ou 3) sa composition et par conséquent ses propriétés rhéologiques.

1. Principaux mucolytiques

Il existe de multiples façons de réduire la viscoélasticité du mucus et l'adhésivité du mucus, par exemple en augmentant l'hydratation, en modifiant les charges ioniques, par protéolyse du squelette glycoprotéique de mucines ou en réduisant les ponts disulfures des mucines à l'aide de composés thiols. Cette dernière technique est d'ailleurs largement utilisée in vitro dans tous les laboratoires pour liquéfier le mucus (dithiothréitol DTT). Les composés réducteurs ayant cet effet sont appelés « mucolytiques » et ont particulièrement été essayés dans la mucoviscidose et les bronchectasies non-CF. Parmi les plus connus la N-Acétylcystéine nébulisée a été utilisée chez l'humain à ces fins et a même une autorisation sur le marché dans cette indication. Au-delà du rôle mucolytique, elle aurait surtout un rôle anti-oxydant et anti-inflammatoire (sur la chimio-attraction des neutrophiles) qui a un temps été évoqué comme intéressant dans la BPCO(144,145). Cette molécule n'a pourtant jamais la preuve de son efficacité clinique contre placebo(146,147).

Le sérum salé hypertonique (minimum 3% de NaCl) est lui largement utilisé en pratique clinique dans les bronchectasies. Son action mucolytique favorise le transport mucociliaire et passerait par une augmentation de l'hydratation du mucus via un transfert d'eau par effet osmotique depuis l'épithélium vers la lumière des voies aériennes, par action sur les canaux sodium amiloride-sensible (ENAC) (148–150). Ce traitement a aussi démontré un impact positif sur la rhéologie du mucus en diminuant sa viscoélasticité (151,152). Toutefois, son impact clinique reste relativement modeste ; son action est aidante en complément de la physiothérapie pour le drainage bronchique notamment pendant une exacerbation, mais il n'existe pas de preuves robustes de son efficacité sur la prévention de ces

épisodes ou l'amélioration pérenne de la fonction respiratoire (153). Par ailleurs, cette molécule peut s'avérer délétère dans l'asthme et ou dans d'autres pathologies obstructives faisant preuve d'hyperréactivité bronchique puisque le sérum salé hypertonique est source de bronchoconstriction (154–156).

La DNAse (rhDNAse dornase alfa) a elle aussi était surtout étudiée dans la mucoviscidose et dans les bronchectasies non-CF, puisque les plus fortes concentrations d'ADN issus de débris cellulaires ont été retrouvées dans ces pathologies(132). Son action passe par le clivage enzymatique de ces débris d'ADN extracelullaires, ce qui favoriserait la clairance muco-ciliaire par modification de la rhéologie du mucus, et donc le drainage bronchique(157,158). Il est surprenant de constater qu'aucun bénéfice clinique n'a été démontré dans les bronchectasies dites idiopathiques(159,160), tandis qu'il semble persister un bénéfice en terme de réduction des exacerbations dans la mucoviscidose(161). De plus, un essai chez les enfants comparant face à face sérum salé hypertonique et rhDNAse en traitement court ne montraient aucune différence clinique en terme de gain de fonction respiratoire, la différence de coût entre les deux molécules étant elle réelle (162).

A noter l'utilisation dans des études pré-cliniques d'agents mucolytiques dits « non-destructifs », c'est-à-dire ne dissociant pas les liaisons chimiques mais désorganisant le réseau polyionique oligosaccharidique. C'est le cas notamment de l'héparine non-fractionnée(163). Aucun essai clinique de phase 2 ou 3 n'est en cours.

Plus récemment, Ehre et al. de l'équipe de Richard Boucher ont expérimenté un nouvel agent pharmacologique inhalé « réducteur » de mucines, P3001. Mis à part son efficacité sur l'hypersécrétion de mucines chez la souris, un autre résultat particulièrement intéressant était la réduction drastique du module élastique du mucus issu de patients BPCO, mais aussi de sa proportion en mucines MUC5B, ce qui n'était obtenu in vitro, de façon équivalente, qu'avec le DTT(164). Ces résultats restent à confirmer in vivo chez l'humain. Nous pouvons aussi nous interroger sur la pertinence de la perte de MUC5B, puisque nous avons vu le rôle majeur qu'elle jouait dans la défense des voies aériennes(108).

Il est vraisemblable que l'impact limité de ces thérapies mucolytiques provient de leur très court délai d'action, de leur élimination rapide une fois dans les bronches et de leur absence d'emprise sur les causes même de l'hyperproduction/hypersécrétion de mucus.

2. Bêta-agonistes et Anticholinergiques inhalés

Les récepteurs muscariniques et adrénergiques, présents dans tout le poumon(165), sont des récepteurs couplés aux protéines G qui peuvent activer ou moduler des voies de transduction similaires. Comme ces récepteurs sont exprimés dans les mêmes cellules, ils ont la capacité de moduler leur activité l'un l'autre(166). Nous avons vu précédemment ***(cf. paragraphe I.4.b.)*** que la sécrétion de mucus était aussi contrôlée par les récepteurs muscariniques et bêta2-adrénergiques, principalement au niveau des glandes sous-muqueuses (167). Les Bêta2-agonistes (salbutamol, formotérol, etc…) semblent avoir un effet mineur sur la sécrétion de mucus chez l'humain, mais ils sont capables d'augmenter la fréquence des battements ciliaires, médiée par la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), la stimulation de la protéine kinase A (PKA) et la phosphorylation d'une chaîne légère du bras externe de la dynéine(29). La classe des anticholinergiques inhalés, et en particulier les dernières générations (Aclinidinium bromure, Uméclidinium, Glycopyrronium) qui sont de plus en plus sélectives pour les récepteurs M3, ont montré leur capacité à inhiber la sécrétion de mucines, notamment MUC5AC, mais aussi à contrer la métaplasie et l'hyperplasie des cellules caliciformes(168).

3. Stéroïdes inhalés

Les stéroïdes inhalés (budésonide, béclométasone, fluticasone, etc…) représentent la clé de voûte du traitement de l'asthme(68), et sont indiqués en complément d'un bêta2-agoniste de long délai d'action inhalé dans la BPCO notamment lorsqu'il existe un profil éosinophilique (37) et plutôt exacerbateur. Concernant son lien avec la régulation du mucus, la fluticasone a la capacité de diminuer la métaplasie des cellules caliciformes induite par l'IL-13(89), probablement par une modulation de l'expression des gènes des mucines à travers la voie SPDEF-FOXa2. Dans un modèle d'épithélium bronchique reconstitué *ex vivo* infecté par le rhinovirus, la fluticasone permet d'inhiber l'augmentation de l'expression des gènes des mucines ainsi que leur sécrétion (169), et ce sans affecter la réplication du virus. Ce résultat est à contrebalancer avec d'autres résultats contradictoires dans des modèles murins(62). Enfin, il y'a aussi un effet dose à ne pas négliger ; un passage et donc des effets systémiques des corticostéroïdes inhalés ne doivent pas être méconnus (170–172).

4. Stéroïdes oraux

Les glucocorticoïdes ont la caractéristique de réprimer l'expression du gène MUC5AC via leur récepteur (Glucocorticoid Receptor GR) et l'Histone Deacetylase-2 (HDaC2)(173,174). Toutefois il semble que

cette up-régulation de l'expression ne s'accompagne pas nécessairement d'une hypersécrétion de la protéine(175). Les données *in vivo* concernant l'effet des stéroïdes systémiques directement sur la sécrétion de mucus sont rares. Toutefois, en prenant l'exemple de l'asthme, nous pouvons supposer que la composante éosinophilique peut impacter certaines propriétés du mucus comme sa rhéologie, ce qui pourrait être une cible des corticoïdes systémiques.

5. Anticorps monoclonaux

Nous avons maintenant un recul de plus de dix ans sur les premiers anticorps monoclonaux utilisés dans l'asthme (176,177), et testés avec plus ou moins de succès dans la BPCO. Nous nous attacherons à décrire ici les liens potentiels entre ces thérapies et la régulation du mucus.

a) *Anti-Interleukine 5 et Anti-Interleukine 5R (Anti-IL-5/5R)*

Ces anticorps monoclonaux ciblent spécifiquement la voie de l'interleukine-5 (IL-5), cytokine à l'origine du recrutement des éosinophiles dans les voies aériennes, et ont montré une efficacité remarquable dans la réduction des exacerbations et l'amélioration du contrôle dans l'asthme sévère (177,178). Deux molécules existent, l'une ciblant le récepteur alpha à l'interleukine-5, le Benralizumab, (exprimé essentiellement par les éosinophiles), l'autre neutralisant l'interleukine 5 circulante (Mepolizumab).

Le lien avec le mucus pourrait être ici les cristaux de Charcot-Leyden (CCL) (Eosinophilic Galectin-10) ***(Figure 30)***. Ceux-ci sont formés de Galectin-10, une protéine abondamment présente dans le plasma des éosinophiles (7 à 10% du cytoplasme)(179). Ces cristaux, décrits au début du XIXe siècle, sont des marqueurs de l'inflammation Th2-High et sont fréquemment retrouvés au sein de bouchons muqueux, notamment dans un type très particulier d'asthme, l'Aspergillose BronchoPulmonaire Allergique (ABPA)(180). Outre leur capacité à induire Muc5ac et la production de mucus dans les poumons de souris(181), les CCL peuvent aussi interagir avec le mucus par l'intermédiaire d'un domaine de reconnaissance des glucides (Carbohydrate Recognition Domain / CRD), complexifiant le réseau de mucines et augmentant sa cohésivité et son adhésivité. Il a également été démontré que les CCL induisaient la production « d'extracellular traps » (débris extracellulaires d'ADN) par les éosinophiles (EETs) et les neutrophiles (NETs), contribuant ainsi à l'augmentation de l'élasticité et de la viscosité du mucus(182). Une étude portant sur un petit nombre de patients asthmatiques sévères

traités par anti-IL-5 a montré une diminution de la galectin-10 sérique, mais sans observations sur la proportion de CCL dans les expectorations ou le LBA(183). De futures études évaluant l'impact de cette thérapie sur les CCL et la rhéologie du mucus méritent d'être menées.

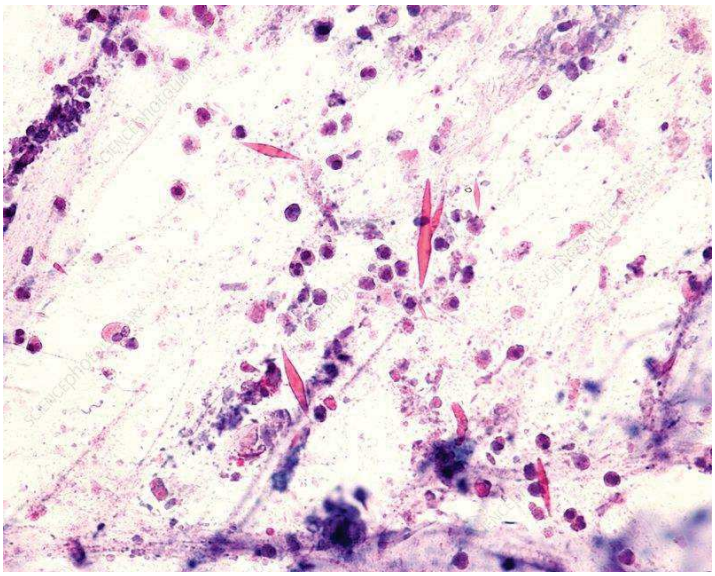


Figure 30. Cristaux de Charcot-Leyden dans un frottis d'expectoration visualisés en microscopie optique

b) *Anti-Interleukine 4/13Ra (Anti-IL-4/13Ra)*

Cet anticorps monoclonal (Dupilumab) cible le récepteur de type II commun à l'IL-4 (IL-4R alpha) et à l'IL-13 (IL-13Ralpha). Lui aussi a montré une efficacité indéniable dans l'asthme sévère, en terme de réduction des exacerbations, d'amélioration du contrôle, de la fonction respiratoire, et de la cortico-dépendance(184). Cette molécule est testée actuellement dans la BPCO dans une étude de phase III (NOTUS NCT04456673). Au vu de ce que nous avons vu précédemment dans le ***chapitre II.***, à savoir l'importance de l'interleukine-13 dans la production mais aussi la sécrétion de mucines, notamment par la voie SPDEF/STAT6, son impact sur la production/sécrétion de mucines est vraisemblable mais peu de données étudiant spécifiquement cela chez l'homme sont à notre disposition (biopsies bronchiques, expectoration ou LBA). Il est toutefois intéressant de noter que des déficits en mucines MUC5AC induits par le Dupilumab (DAMD) ont été décrits dans des troubles oculaires (conjonctivites)(185), suggérant un rôle systémique anti-sécrétoire.

c) *Anti-Thymic Stromal Lymphopoiétin (Anti-TSLP)*

TSLP est une cytokine, une alarmine, dont l'importance dans l'asthme a été documentée à plusieurs reprises. Elle est considérée comme une stratégie thérapeutique extrêmement intéressante dans l'asthme sévère(186–188). Le *Tézépélumab*, qui est le premier anticorps monoclonal anti-TSLP de sa catégorie, est un anticorps monoclonal IgG2λ entièrement humain qui se lie à TSLP, empêche l'interaction avec son récepteur et, par conséquent il inhibe de multiples voies d'aval, dont celles régulant la production d'IL-13 ***(Figure 31.).*** Malheureusement ici aussi peu de données évaluent l'impact de ce médicament directement sur la régulation du mucus. Dans l'étude CASCADE s'intéressant à l'impact de ce médicament sur l'épithélium bronchique issue de patients asthmatiques, le taux d'IL-13 circulant était plus bas chez les patients traités, mais il n'y avait pas de données publiées concernant une éventuelle réversibilité de la métaplasie ou de l'hyperplasie des cellules caliciformes, ou un remodelage des glandes sous-muqueuses(187).

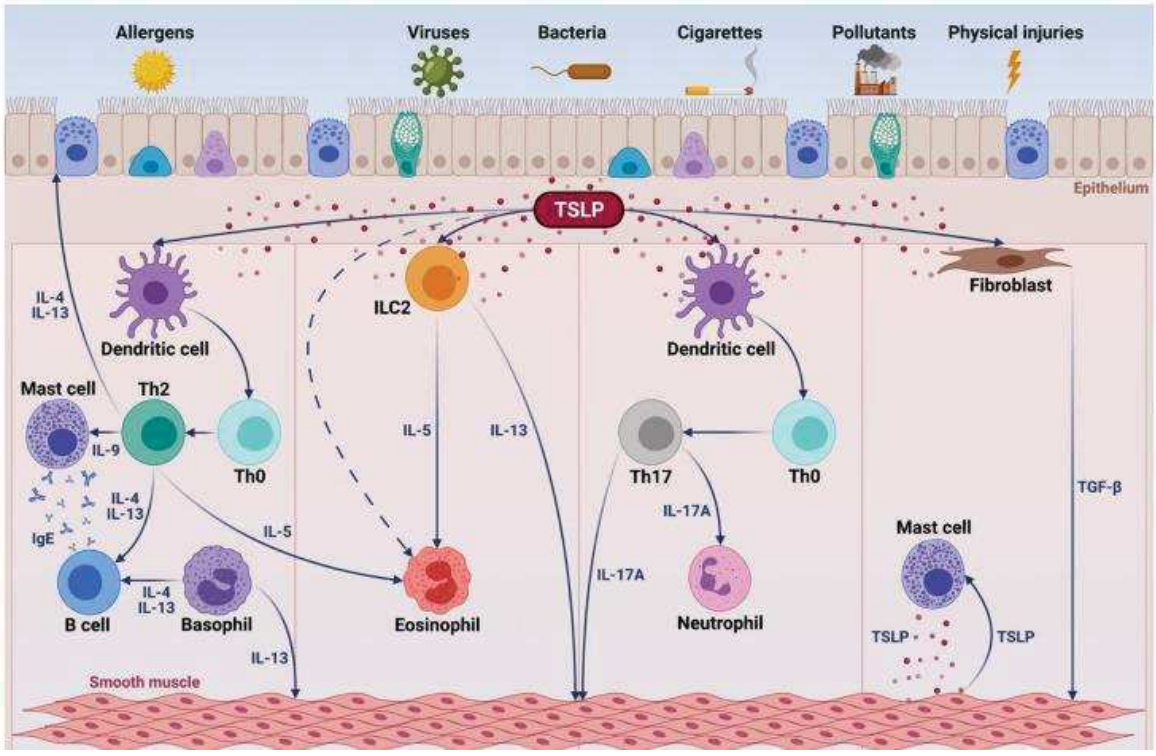


Figure 31. TSLP et son impact sur l'immunité innée et adaptative au niveau de la muqueuse bronchique (189)

6. Macrolides

Les macrolides sont des molécules à propriétés antibiotiques bactériostatiques, qui possèdent des macrocycles de lactone souvent associés à des sucres neutres ou aminés. Elles font partie des inhibiteurs de la synthèse protéique et sont actifs sur les germes intracellulaires. De façon intéressante, certains macrolides (à plus de 14 atomes par cycle), et l'azithromycine en particulier, ont montré leur intérêt clinique dans des études de phase III sur la prévention des exacerbations dans la BPCO(190,191), les bronchectasies non-CF(192,193), et à un moindre degré dans l'asthme (194–197). Ici, au-delà de l'effet antibiotique(198), ce sont surtout d'autres effets qui sont recherchés : diminution de la chimioattraction des neutrophiles(199), augmentation de la phagocytose (200) ou effet anti-inflammatoire par inhibition de l'expression de NF-KappaB ***(Figure 32.)*** (201).

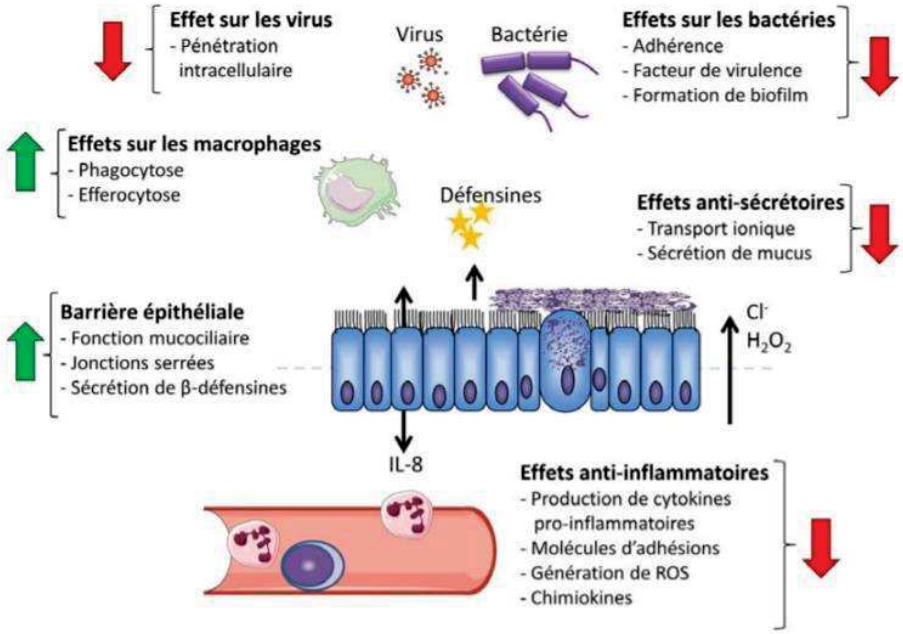


Figure 32. Potentiels effets des macrolides sur l'épithélium respiratoire

L'azithromycine semble avoir aussi la propriété de diminuer la production de mucines (202). Dans le cas de la production de MUC5AC induite par Pseudomonas Aeruginosa, cela pourrait passer par l'inhibition d'une molécule de signal du « quorum-sensing » [N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone (3O-C12-HSL)](203). Dans un modèle de culture en ALI de NHBE, la clarithromycine modulait négativement à la fois l'hyperplasie des cellules caliciformes, la production d'ARNm de MUC5AC mais aussi la sécrétion de sa protéine induites par l'IL-13, vraisemblablement par une action sur le transducteur janus kinase, sur STAT6 mais aussi sur la MAPKinase de l'EGFR(204). L'azithromycine

semble aussi pouvoir freiner l'exocytose de granules de mucines en interférant avec le métabolisme calcique intra-cellulaire (205).

7. Thérapies « mucomodificatrices » non médicamenteuses

a) *Thermoplastie bronchique (TB)*

Cette technique endoscopique, approuvée par les agences du médicaments européenne et américaine, a été développée à des fins thérapeutiques dans l'asthme sévère non contrôlé. Un cathéter délivre de l'énergie thermique (65°C) dans les bronches proximales (calibre entre 3 et 10mm) ***(Figure 33.)*** (206). Son impact principal serait lié à une réduction de la « masse musculaire lisse » bronchique et de son innervation, une réduction drastique du nombre de cellules épithéliales neuroendocrines, et par conséquent à une vraisemblable réduction de l'intensité de l'hyperréactivité bronchique, mais pas seulement(207). Bien que n'ayant pas montré systématiquement d'effet sur l'hyperplasie des cellules caliciformes(208), la thermoplastie semble toutefois entrainer une diminution de l'expression et de la sécrétion de mucines MUC5AC, ainsi que du nombre de cellules IL-13+ chez certains patients asthmatiques sévères, et ce 1 an après la procédure(209).

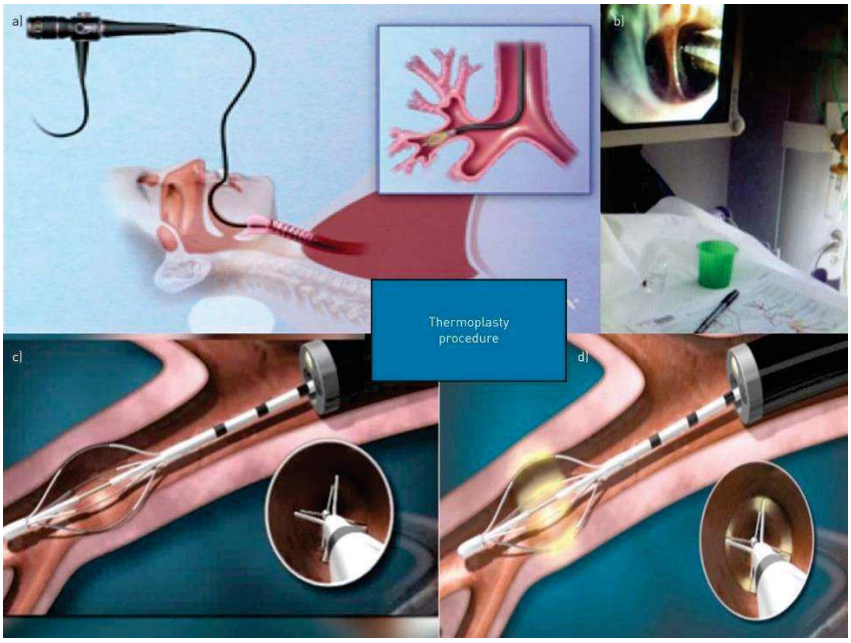


Figure 33. Procédure de thermoplastie bronchique a) La thermoplastie bronchique est réalisée à l'aide d'un bronchoscope b) Un cathéter est inséré dans une bronche proximale c) Le cathéter est ouvert in situ d) Le cathéter délivre une énergie thermique contrôlée (206)

b) *Dénervation bronchique ciblée*

Encore à un stade expérimental (AIRFLOW3 – étude de phase 3 en cours NCT03639051), il s'agit d'une autre technique endoscopique réservée en l'état aux patients BPCO exacerbateurs fréquents. L'hypothèse sous-tendant cette procédure est que la dénervation ciblée permettrait de perturber « l'hyperactivité neurale vagale » et ainsi d'aboutir à une bronchorelaxation, une réduction de la sécrétion de mucus des glandes sous-muqueuses ***(cf. paragraphe I.4.b)*** et une réduction de l'hyperréactivité bronchique (210). D'autres impacts potentiels de la dénervation ciblée comprendraient la perturbation d'autres médiateurs de la sécrétion du mucus et de l'inflammation, tels que les neuropeptides relargués par les cellules neuroendocrines (211). L'efficacité de cette méthode, tant du point de vue physiopathologique, histologique ou clinique, reste encore à démontrer.

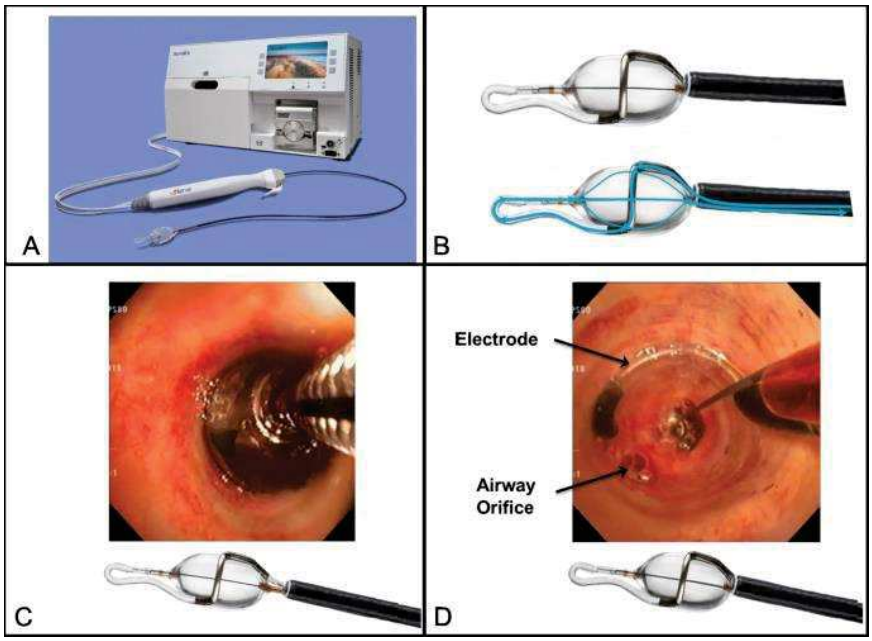


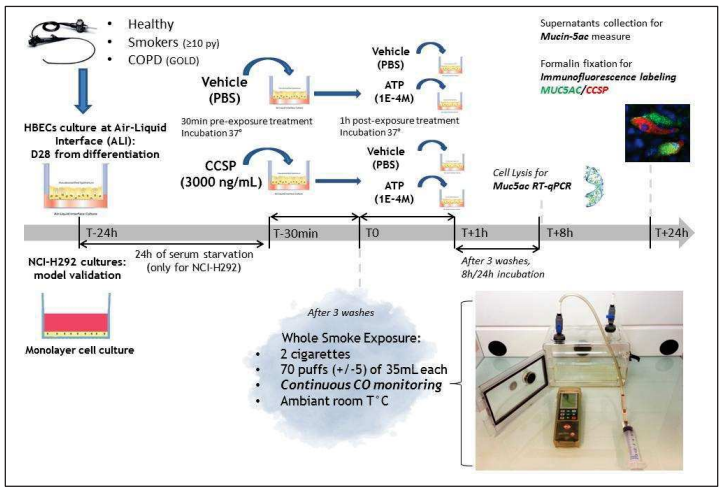
Figure 34. Procédure de dénervation bronchique ciblée : Image de la console Nuvaira avec le cathéter dNerva dans le bronchoscope et le ballon réfrigérant extensible (210)

Bien que l'hyperconcentration de mucus puisse être commune aux pathologies bronchiques obstructives, l'idée de développer une thérapeutique purement mucomodificatrice est probablement réductrice quand on appréhende les physiopathologies distinctes de ces maladies.

La nécessité « d'endotyper » nos patients prend alors tout son sens. Inhiber de façon non sélective la production de mucines lorsque celle-ci ne fait pas défaut pourrait être délétère, tandis qu'inhiber sa sécrétion exposerait possiblement à une accumulation intracellulaire de granules de mucines, à une dysrégulation du transport de fluides, à une déstructuration du réseau de mucines et donc à une perte de son rôle protecteur.

Partie B - Présentation du travail de recherche

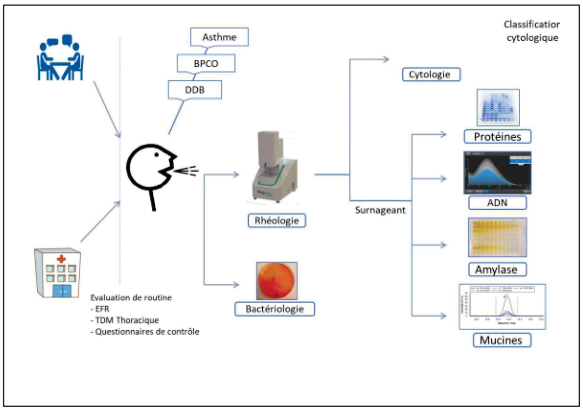
1. Modèle *ex vivo* d'exposition à la fumée de cigarette et étude de la sécrétion de mucines



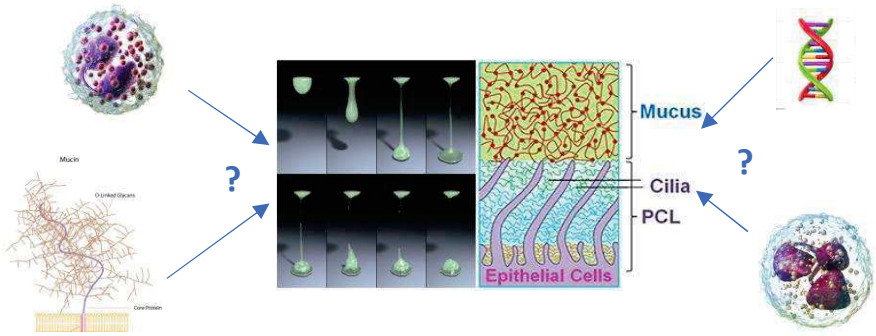
Article 1 : *Effect of Whole Cigarette Smoke exposure and Club Cell Secretory Protein supplementation on MUC5AC release in primary cultures of healthy, smoker and COPD subjects* (soumis à *Int J COPD*)

- Modèle viable ?
- Induction d'une hypersécrétion de mucines ?
- Effet de CCSP ?

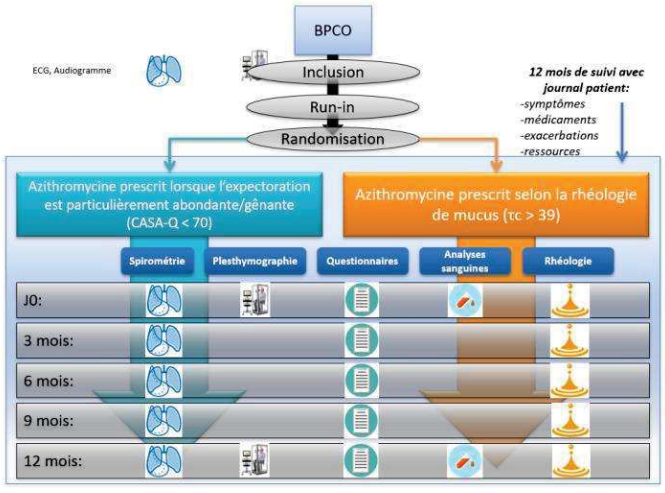
2. Détermination des variables impactant la rhéologie du mucus in vivo



Article 2 : *Rheology predicts sputum eosinophilia in muco-obstructive lung diseases* (soumis à *Chest*)



3. Evaluation d'une stratégie de prescription de muco-modificateur potentiel guidée par la rhéologie



Protocole COPD CaRhe (PHRCI IR GIRCI SOHO 2018) :

Chronic airway disease, mucus rheology and exacerbations: a randomized controlled trial of COPD patients *(évaluation ANSM depuis janvier 2020)*

- Réduction des exacerbations et/ou de leur sévérité ?
- Impact sur la rhéologie du mucus ?
- Détermination d'autres biomarqueurs

I. Article 1 : Effet de l'exposition à la fumée de cigarette et de Club Cell Secretory Protein sur des cultures primaires d'épithélia bronchiques reconstitués *ex vivo* en interface air-liquide (ALI) de patients fumeurs et BPCO

« Effect of Whole Cigarette Smoke exposure and Club Cell Secretory Protein supplementation on MUC5AC release in primary cultures of healthy smoker and COPD subjects » (soumis à "International Journal of COPD")

Objectifs de Thèse

1. DEVELOPPER UN MODELE *EX VIVO* D'EXPOSITION A LA FUMEE DE CIGARETTE PERMETTANT D'EVALUER LA PRODUCTION ET/OU LA SECRETION DE MUCINES

Hypothèses testées

2. LA RECONSTITUTION EX VIVO ET LA CULTURE EN INTERFACE AIR-LIQUIDE D'EPITHELIA BRONCHIQUES OBTENUS A PARTIR DE BIOPSIES DE PATIENTS FUMEURS ET BPCO PERMET D'ETUDIER LA PRODUCTION/SECRETION DE MUCUS ET DE MUCINES

3. CE MODELE PEUT ETRE EXPOSE A LA FUMEE DE CIGARETTE EN PHASE GAZEUSE ET PARTICULAIRE DITE *« WHOLE SMOKE EXPOSURE »*

4. LA PRODUCTION/SECRETION DE MUCINES MUC5AC EST SINGIFICATIVEMENT PERTURBEE PAR L'EXPOSITION A LA FUMEE DE CIGARETTE

5. L'IMPACT DE CETTE EXPOSITION A LA FUMEE DE CIGARETTE POURRAIT ETRE

Effect of Whole Cigarette Smoke exposure and Club Cell Secretory Protein supplementation on MUC5AC release in primary cultures of healthy smoker and COPD subjects

J. Charriot [1], L. Knabe[1, 2], A. Fort-Petit[1], G. Marin[3], N. Molinari[3], AS. Gamez[1], P. Chanez[4], I. Vachier[1], A. Bourdin[1, 2]

1. Department of Respiratory Diseases, CHRU Montpellier, Montpellier, France

2. U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France

3. Department of Medical Information, CHRU Montpellier, Montpellier, France

4. INSERM U600, AP-HM, Aix Marseille University, Marseille, France

Correspondence:

Professor Arnaud Bourdin

Department of Respiratory Diseases

Hôpital Arnaud de Villeneuve

CHU Montpellier

371 Av. Doyen Gaston Giraud

34295 MONTPELLIER Cedex 5, France

Telephone: + 33 4 67 33 61 26

Fax: +33 4 67 63 36 45

E-mail: a-bourdin@chu-montpellier.fr

Author contributions: JC performed the experiments and statistical analyses, interpreted the data and wrote the manuscript. LK and AFP helped perform the experiments. GM and NM provided statistical expertise and helped analyze the data. ASG recruited patients and collected the clinical data. PC and IV participated in the study design, interpreted the data, and provided critical edits of the manuscript. AB designed the study, recruited patients, collected the clinical data, performed statistical analyses, interpreted the data, and provided critical edits of the manuscript. All authors provided critical review of the manuscript and approved its submission.

Abstract word count: 300

Main manuscript word count:2637

Abstract

Background*:* Mucus hypersecretion is the hallmark of small airway occlusion in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Mucin (MUC)5AC has been shown to be upregulated by cigarette smoke in animal models or immortalized cell lines. Serum Club Cell Secretory Protein (CCSP), a predictive biomarker of accelerated lung function decline in the ECLIPSE study, was reduced in COPD patients and also correlated to smoking status. Previous studies have shown that exogenous CCSP supplementation decreased the epithelial release of Interleukin(IL)8 and MUC5AC.

Objectives: To assess a whole cigarette smoke (WCS) exposure model, its effect upon MUC5AC production and secretion and the potential role of CCSP as a therapeutic agent.

Methods: Both primary air-liquid interface (ALI) cultures of Human Bronchial Epithelial Cells (HBECs) from endobronchial biopsies of COPD/Smokers/Healthy subjects, and NCI-H292 cells were exposed to WCS with or without exogenous CCSP preventive treatment then 1h ATP supplementation. MUC5AC and IL8 secretion were assessed by Dot Blot and ELISA respectively at baseline and at 24h, and their production by RTqPCR. Cell cytotoxicity was evaluated by Lactate-Dehydrogenase (LDH) activity.

Results: Intensity of WCS exposure as measured by CO rates was reproducible and WCS exposure significantly increased IL-8 release in NCI-H292 cells ($p<0.02$). In HBECs, MUC5AC secretion was increased in COPD ALI cultures at baseline compared to Healthy and Smokers, regardless of drug or smoke stimulation ($p<0.008$). WCS significantly increased MUC5AC in Smokers ALI cultures ($p<0.05$). 1h ATP exposure significantly induced MUC5AC secretion in *ex vivo* COPD epithelia supernatants ($p<0.001$) and this was attenuated by CCSP

supplementation ($p<0.001$). There was no significant effect of WCS or CCSP on MUC5AC mRNA release.

Conclusions*:* In our reliable WCS exposure model, MUC5AC protein secretion is increased in primary cultures of HBECs from COPD subjects at baseline. CCSP supplementation significantly decreased ATP-induced MUC5AC hypersecretion in WCS-exposed COPD *ex vivo* epithelia supernatants.

Abstract word count: 300

Keywords: COPD, CCSP, SCGB1A1, smokers, cigarette smoke, Mucus, MUC5AC, epithelium, air-liquid interface

Introduction

Airway luminal occlusion is associated with mucus hypersecretion and correlates with the severity of airflow obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) patients (1) and with mortality (2). Mucin(MUC)5ac, one of the most abundant compounds of the mucus gel layer, is a glycoprotein predominantly produced in proximal human airways by surface goblet cells. The regulation of its production is tightly balanced between transcription and secretion; it is also highly modulated by exogenous stimuli (3) such as pathogen agents or tobacco.

Cigarette smoking, which is the main risk factor for developing COPD, has a complex role in mucus accumulation in small airways. Histopathological studies on bronchial biopsies reported airway remodeling in smoker epithelia characterized by goblet cell hypertrophy and hyperplasia (4). It has also been demonstrated that cigarette smoke damaged ciliogenesis (5,6) and was involved in decreased function of *CFTR* (7), thus leading to mucociliary clearance impairment. Important changes also occur at the cellular level. Mice exposed to acrolein (an important constituent of cigarette smoke) developed a persistent mucin production via matrix metalloproteinase (MMP)-9 activation (8). NCI-H292 immortalized cell lines and murine airway cells stimulated with cigarette smoke extract (CSE) induced MUC5AC production through a TNF-α-converting enzyme (TACE)-EGF receptor pathway (9,10). Noteworthy, increased expression of SPDEF in club cells in the conducting airways of transgenic mice caused goblet cell hyperplasia. Dust mite allergen and IL13 exposure induced SPDEF expression and caused goblet cell hyperplasia in the conducting airways *in vivo*, in a process that was dependent upon STAT-6(11).Concerning MUC5AC secretion, ATP is known to be the predominant goblet cell mucin secretagogue in the

airways acting via purinergic $P2Y_2$ receptors (12–14). In a mouse model, ATP neutralization markedly reduced smoke-induced lung inflammation and emphysema (15). More recently, Schamberger et al. demonstrated that CSE-exposed commercial human bronchial epithelial cells (HBECs) cultured at air-liquid interface (ALI) presented altered cellular composition. CSE seemed to affect basal cell differentiation in a post-transcriptional manner thus leading to an increased number of goblet cells (16). Nevertheless, the cellular mechanisms underlying mucins and especially MUC5AC hyper production and secretion in response to cigarette smoke remain unclear.

Club Cell Secretory Protein (CCSP, also known as CC10, CC16 or SCGB1A1) is a homodimeric protein secreted by the non-ciliated bronchiolar club cells (17). It is involved in many respiratory diseases such as COPD, asthma or post-transplantation bronchiolitis (18–21). Serum CCSP level is a predictive biomarker of accelerated lung function decline in the ECLIPSE study (22), and a predictor of lung function and development of COPD across the lifespan(23). Moreover, *CCSP* $^{-/-}$ mice exposed to cigarette smoke developed a COPD-like phenotype with emphysema lesions, goblet cell metaplasia and increased MUC5AC expression, reversible by CCSP supplementation (24). In ALI-cultured Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells, MUC5AC secretion stimulated either by lipopolysaccharide (LPS) or Interleukin (IL)L13 was attenuated by CCSP (25). More interestingly, our team recently found that CCSP exogenous supplementation can reverse CSE-induced IL8-release in *ex vivo* epithelia from COPD patients cultured at ALI (26). Many experiments are now favoring the therapeutic potential of this protein.

In all these experimental studies, smoke exposure was performed using CSE, thus overcoming the effect of the vapor phase. It has already been reported that CSE had

differential *in vivo* effects on the lungs and tracheal epithelium compared to whole cigarette smoke (WCS) exposure (27).

We aimed here to validate a more "realistic" exposure model with WCS. We hypothesized that WCS exposure could increase MUC5AC production of *ex vivo* epithelia cultured at ALI from Healthy subjects, Smokers and COPD patients. Finally, we considered that CCSP supplementation could reverse this overproduction.

Materials and Methods

Subjects

11 subjects (4 patients with COPD, 3 Smokers, and 4 Healthy subjects who had never smoked) were recruited at the Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier, France, in 2013. COPD diagnosis was based upon evidence of nonreversible obstructive airflow FEV1/FVC<0.7, FEV1 improvement after inhaling 200 to 400 mg of albuterol < 12% and 200 mL, and a smoking history of 10 pack-years; and without any evidence for alternative diagnosis according to the best standard of care (ie, no history of any other respiratory disease based on clinical examination or CT scan findings). Smoking status was recorded (active vs weaned). Smokers and healthy subjects had no airflow limitation. At the time of endobronchial biopsies collection, patients were at steady state and free of any exacerbation

for at least 3 months. Bronchoscopy was performed when indicated by a chest physician, usually for peripheral-nodule exploration or other CT scan abnormalities. Bronchoscopy indication in control subjects was checked by the operator before enrollment and confirmed as follows: peripheral nodule (n=3), and CT scan abnormality (n=1; <3cm opacity in the right lower lobe further diagnosed as a benign myofibroblastic tumor). The study protocol was approved by the ethics committee of our institution (2013-A00553-42), and all patients agreed to participate by reading and signing written informed consent forms. All measurements and experiments were performed in a blinded fashion.

Endobronchial Biopsy Specimens

All subjects underwent flexible bronchoscopy, two to three biopsy specimens were collected from each patient by using alligator forceps (Olympus Corp) on a sub segmental bronchus of the left lower lobe, as previously described (28). Briefly, local anesthesia (lidocaine, 1%-5%; maximum dose, 300 mg; AstraZeneca plc) was administered to the nasal and buccal cavity, followed by insertion of a fiber-optic bronchoscope (Olympus BF20; Olympus Corp) into the trachea through the nose.

Human Bronchial Epithelial Cells (HBECs) cultured at air-liquid interface (ALI)

Primary HBECs were obtained from endobronchial biopsies and cultured under ALI conditions, as previously described by Gras et al and Gamez et al(26,29). Briefly, HBECs were mechanically dissociated and suspended in Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM). After seeding in multiwell plates coated with a solution of fibronectin and collagen, cells were expanded in a flask and then plated (250,000 cells per well) on uncoated nucleopore membranes in a 1:1 mixture of BEGM and Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) applied at the basal side only to establish the ALI. Cells were maintained in culture for 28

days to obtain a differentiated cell population with a pseudostratified mucociliary epithelium. All cell cultures were maintained at 37°C under 5% CO_2.

NCI-H292 cell monolayer cultures

NCI-H292 cells, a human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line, were cultured in a 24-well plate with 50×10^3 cells in 2 ml per well. They were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotics at 37°C in a humidified, 5% CO2/95% air, water-jacketed incubator.

Generation of whole cigarette smoke (WCS)

Two Commercial cigarettes (Marlboro®) were smoked by repeated suctions with a 60mL syringe connected to the exposure chamber (Secador F420751002 internal volume 9.91L) through a 3-direction-control valve; exposure was performed according to ISO 3308 smoking regimen (ie, 2 puffs of 35 mL every 60s) (30).

Continuous Carbon Monoxide (CO) rate monitoring

CO ambient rate was continuously monitored using a CO detector (Testo 315-2; Testo SARL) placed inside the exposure chamber to ensure a reproducible intensity of the exposure.

WCS Exposure conditions of NCI-H292 and HBECs cultures and CCSP/ATP supplementation

First, NCI-H292 cells were exposed once or many times at different time points (6, 12, 24 or 48h) to mainstream smoke to select the most appropriate condition. Recombinant human (rh)CCSP was purchased from Biovendor (Brno, Czech Republic). Adenyl triphosphate (ATP) was purchased from Sigma-Aldrich. When the HBECs reached confluence, they were serum-starved for 24h before experiments. At H0, they were treated with rhCCSP or vehicle for

30min and then after exposed or not to WCS. Treatment with ATP or vehicle was then performed for 1h. Cells were thereafter incubated at 37.0°C for 24h. At H24, cells were collected for mRNA. Supernatants were collected for epithelial secretion assays (Figure S1 supplementary data).

Measurement of IL8, MUC5AC and LDH Concentrations

Determinations of the relative values of MUC5AC in supernatants were assessed by Dot Blot assay. 10µl of cell supernatants were spotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with blocking Odyssey buffer for 1h at room temperature. They were incubated with primary antibodies (1:1000 MUC5AC) for 2h and then with secondary fluorescent antibodies for 45min. Positive signals were detected using Odyssey imager. The intensities of the spots were measured with Dot Blot analyzer, an Image J software.

Secreted IL8 and Lactate dehydrogenase (LDH) were quantified in cell supernatants using the IL8 Eli-pair kit (Diaclone) and the cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostic) respectively, according to manufacturer's protocol.

Statistical Analysis

Clinical data were expressed as means±SEM. COPD patients, smokers and control subjects were compared using a Kruskal-Wallis test for quantitative data and a Fisher test for qualitative data. Experimental data were expressed as means±SEM. Paired comparisons were made using Mann-Whitney tests. A mixed effect model was built in order to test the repeated measures when applicable. Data were considered statistically significant at p-value<0.05. All graphical data and statistical analyses were generated with GraphPAD Prism software (Version 6.0). The study size was based upon our preliminary results.

Results

Subject characteristics

Endobronchial biopsies from 4 COPD, 3 Smokers and 4 Healthy subjects successfully grew in ALI cultures and were considered for analysis. Clinical characteristics of the subjects are reported in Table 1. All COPD patients were GOLD stage 2 and most of them were still active smokers. They also had the most important smoking history. Healthy subjects were significantly younger than COPD subjects.

WCS exposure in NCI-H292 and HBEC cultures

Ambiant CO concentrations for NCI-H292 cells and HBECs were 2636±408 ppm and 3347±143 ppm respectively (Figure 1). Regarding the cytotoxicity evaluated by LDH assay in the culture supernatants, no significant difference was observed between exposed and non-exposed cells (Figure 2). IL8 was significantly increased at 24h in response to WCS exposure ($p < 0.02$) (Figure 3).

WCS, rhCCSP and ATP effects on MUC5AC secretion in HBECs of Smokers and COPD patients

After 1h ATP treatment, at baseline, regardless of drug stimulation or WCS exposure, MUC5AC protein was significantly increased in COPD ALI cultures compared to Healthy subjects and Smokers ($p<0.008$ for each comparison). After WCS exposure, MUC5AC secretion significantly increased only in Smoker ALI cultures ($p<0.05$) (Figure 4). ATP increased MUC5AC secretion in WCS-exposed COPD epithelia in the supernatants collected at 24h ($p<0.001$). rhCCSP supplementation decreased MUC5AC secretion in WCS-exposed Smokers epithelia ($p<0.05$) and significantly in WCS exposed COPD ALI cultures ($p<0.001$) (Figure 5).

WCS, rhCCSP and ATP effects on MUC5AC transcription in HBECs of Smokers and COPD patients

ATP stimulation tended to increase MUC5AC transcription in WCS-exposed Healthy and Smoker epithelia whereas no trend was observed in COPD ALI cultures. MUC5AC mRNA levels in COPD epithelia were similar between baseline, WCS exposure and drug stimulation. rhCCSP supplementation failed to decrease WCS-induced MUC5AC overexpression in Healthy subjects and Smokers (mixed-effect model $p=0.85$ for interaction between drug and groups) (Figure 6).

Discussion

In this study, we succeeded to obtain a reliable model of whole cigarette smoke (WCS) exposure with reproducible exposure intensity evaluated by stable ambient CO concentrations. This is the first time that MUC5AC regulation is studied on primary HBECs exposed to the particular and vapor phase of cigarette smoke in the context of COPD. We demonstrated that MUC5AC protein release is increased in primary cultures of HBECs from COPD subjects at baseline. We tested the potential therapeutic role of CCSP by treating WCS-exposed airway epithelium of Healthy subjects, Smokers and COPD patients with exogenous CCSP. CCSP supplementation significantly decreased WCS-induced MUC5AC hypersecretion in ex-vivo COPD epithelia supernatants.

The use of NCI-H292 cells permitted us to develop WCS exposure protocol as working with this cell line is easy and not very expensive. We demonstrated that NCI-H292 cells exposed

to WCS exhibited a low cytotoxicity profile. This allowed us to perform different cytokine and protein measurements. This WCS exposure model was closer to the reality of tobacco smoking aggression because it replicated the chemical and mechanical toxicity of the vapor phase described in the literature (27,31,32). Although the human physiological dimension of airways could not have been reproduced, our experimental “smoking box” still has the interest to consider the potential shear stress induced by turbulences of the gas phase.

With our *ex vivo* ALI culture model of bronchial epithelium, we observed an increased MUC5AC secretion in COPD patients at steady state, which is one of the main feature leading to small airway occlusion in *in vivo* conditions (33). Two months separated sampling from these findings obtained in fully differentiated airway epithelium at the air liquid interface. Thus, this model seems to adequately model the disease as biological changes are maintained and reproduced. WCS exposure led to increased MUC5AC secretion in Smoker epithelia. This tobacco-smoking-induced MUC5AC secretion has already been shown in animal models exposed to WCS (24) or in commercial normal human bronchial epithelial (NHBE) cells with smoke extract (10,34) but never in primary HBECs cultures. Moreover, some of these studies grouped MUC5AC production (cell lysate measurements) and secretion (supernatant measurements) together, whereas they probably represent two distinct mechanisms with their own respective triggers.

In our data, the apparent lack of WCS-induced MUC5AC secretion in COPD epithelia must be carefully interpreted. Indeed, at baseline, the mucin concentration in COPD epithelia was five times more important than in Smokers. This might suggest that the COPD epithelium has already reached its maximum secretory capacity.

Our study design cannot propose a cellular or a molecular pathway for the WCS-triggered MUC5AC secretion. Nonetheless we could hypothesize that chemical or mechanical stress lead to increased concentrations of ATP in the periciliary layer and then to MUC5AC release (12,15,35). Further experiments assessing ATP concentrations in the epithelial supernatants would be relevant.

Preventive treatment with rhCCSP in the WCS-exposed COPD epithelia significantly decreased ATP-induced MUC5AC hypersecretion. Here, we confirm in a model as close to reality as possible the potential role of CCSP in the mucus hypersecretion mechanisms leading to small airway obstruction. This observation is consistent with previous experiments from Tokita et al showing decreased MUC5AC secretion and expression in LPS-exposed NHBE cells cultured at ALI treated with rhCCSP. Unfortunately, our results were not reproducible with MUC5AC mRNA measurement in cell lysates but this might be partly due to a lack of power. The mechanisms underlying the regulation of MUC5AC secretion through a hypothetic CCSP-pathway are unknown. Does CCSP possess its own cell receptor? Does it directly bind to an extracellular compound triggering cigarette smoke-induced inflammation, or even to pro-inflammatory cytokines? These issues are still unsolved.

Several limits of our study support discussion. First, the ALI culture model is a complex technique and need specific expertise. That explains a certain lack of power. It would be of interest to determine predictive factors involved in the success of the ALI culture to improve our technique. Moreover, the collection of the epithelium supernatants and their whole mucus secretion products is challenging because of its adherence to the apical side of the epithelium. The state of the mucus hydration, which can be highly variable, may represent a potential confounding factor and the study of mucus rheology would be relevant. Then, the

usual washes with PBS could by itself constitute a stimulus that may lead to changes in the epithelium secretome. Next, the method firstly used to measure MUC5AC protein had been problematic as our first tests with ELLA-Kit were not contributing, motivating us to use Dot Blot assessment. In addition, we chose to perform a single WCS exposure which may not be representative of the "real life" cigarette smoke chronic exposure, thus overcoming the potential long-term transcriptional modifications that may take part into the development and/or the maintenance of the COPD phenotype. Finally, we did not perform MUC5B measurement but growing bodies of evidence tend to show that this mucin could play a major role in airway defense (36,37).

To conclude, we established a reliable WCS exposure model to assess MUC5AC regulation in COPD *ex vivo* epithelia. We suggest that CCSP has a potential role in mucus hypersecretion leading to small airway occlusion in COPD.

Conflict of Interest:

All authors declare no competing interests or other interests that might be perceived to influence the results and/or discussion reported in this article.

References

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 2004 Jun 24;350(26):2645–53.

2. Hogg JC, Chu FSF, Tan WC, Sin DD, Patel SA, Pare PD, et al. Survival after lung volume reduction in chronic obstructive pulmonary disease: insights from small airway pathology. Am J Respir Crit Care Med. 2007 Sep 1;176(5):454–9.

3. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. N Engl J Med. 2010;363(23):2233–2247.

4. Innes AL. Epithelial Mucin Stores Are Increased in the Large Airways of Smokers With Airflow Obstruction<xref rid="AFF1">[*]</xref> CHEST J. 2006 Oct 1;130(4):1102.

5. Tamashiro E, Xiong G, Anselmo-Lima WT, Kreindler JL, Palmer JN, Cohen NA. Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis. Am J Rhinol Allergy. 2009 Apr;23(2):117–22.

6. Verra F, Escudier E, Lebargy F, Bernaudin JF, De Crémoux H, Bignon J. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Mar;151(3 Pt 1):630–4.

7. Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, Ellis L, Dupuis A, Liao J, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers. Am J Respir Crit Care Med. 2006 May 15;173(10):1139–44.

8. Deshmukh HS, Shaver C, Case LM, Dietsch M, Wesselkamper SC, Hardie WD, et al. Acrolein-activated matrix metalloproteinase 9 contributes to persistent mucin production. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Apr;38(4):446–54.

9. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel P-R, Dao-Pick T, Ueki IF, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol. 2001 Jan 1;280(1):L165–72.

10. Shao MXG, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Aug;287(2):L420-427.

11. Park K-S, Korfhagen TR, Bruno MD, Kitzmiller JA, Wan H, Wert SE, et al. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. J Clin Invest. 2007 Apr;117(4):978–88.

12. Davis CW, Lazarowski E. Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. Respir Physiol Neurobiol. 2008 Nov 30;163(1–3):208–13.

13. Kim KC, Hisatsune A, Kim DJ, Miyata T. Pharmacology of airway goblet cell mucin release. J Pharmacol Sci. 2003 Aug;92(4):301–7.

14. Lazarowski ER, Boucher RC. Purinergic receptors in airway epithelia. Curr Opin Pharmacol. 2009 Jun;9(3):262–7.

15. Cicko S, Lucattelli M, Muller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, et al. Purinergic Receptor Inhibition Prevents the Development of Smoke-Induced Lung Injury and Emphysema. J Immunol. 2010 Jul 1;185(1):688–97.

16. Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. Sci Rep. 2015 Feb 2;5:8163.

17. Knabe L, Fort A, Chanez P, Bourdin A. Club cells and CC16: another “smoking gun”? (With potential bullets against COPD). Eur Respir J. 2015 Jun;45(6):1519–20.

18. Bourdin A, Kotsimbos T, Nguyen K, Vachier I, Mainprice B, Farce M, et al. Non-Invasive Assessment of Small Airway Remodelling in Smokers. COPD J Chronic Obstr Pulm Dis. 2010 Apr;7(2):102–10.

19. Bourdin A, Mifsud NA, Chanez B, McLean C, Chanez P, Snell G, et al. Donor clara cell secretory protein polymorphism is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Transplantation. 2012 Sep 27;94(6):652–8.

20. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, et al. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Jan;163(1):185–94.

21. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Imada A, Hirasawa M, Yamada T, et al. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Sep;160(3):930–3.

22. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, et al. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. N Engl J Med. 2011;365(13):1184–1192.

23. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, Spangenberg A, Stern DA, Morgan WJ, et al. Relation between circulating CC16 concentrations, lung function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective study. Lancet Respir Med. 2015 Aug;3(8):613–20.

24. Laucho-Contreras ME, Polverino F, Gupta K, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, et al. Protective role for club cell secretory protein-16 (CC16) in the development of COPD. Eur Respir J. 2015 Jun;45(6):1544–56.

25. Snyder JC, Reynolds SD, Hollingsworth JW, Li Z, Kaminski N, Stripp BR. Clara cells attenuate the inflammatory response through regulation of macrophage behavior. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Feb;42(2):161–71.

26. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, et al. SUpplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in copd. Chest. 2015 Jun 1;147(6):1467–76.

27. Differential in vivo effects of whole cigarette smoke exposure versus cigarette smoke extract on mouse ciliated tracheal epithelium. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2015 Sep 24]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/16754475

28. Jeffery P, Holgate S, Wenzel S, Endobronchial Biopsy Workshop. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Sep 15;168(6 Pt 2):S1-17.

29. Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. J Allergy Clin Immunol. 2012 May;129(5):1259–1266.e1.

30. WHO | Standard operating procedure for intense smoking of cigarettes [Internet]. WHO. [cited 2015 Oct 2]. Available from: http://www.who.int/tobacco/publications/prod_regulation/sop_smoking_cigarettes_1/en/

31. Talikka M, Kostadinova R, Xiang Y, Mathis C, Sewer A, Majeed S, et al. The response of human nasal and bronchial organotypic tissue cultures to repeated whole cigarette smoke exposure. Int J Toxicol. 2014 Dec;33(6):506–17.

32. Bakand S, Hayes A. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010 Apr;61(2):76–85.

33. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, et al. Small-Airway Obstruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. N Engl J Med. 2011 Oct 26;365(17):1567–75.

34. Shao MXG, Nadel JA. Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Proc Natl Acad Sci. 2005 Jan 18;102(3):767–72.

35. Kim KC, Zheng QX, Van-Seuningen I. Involvement of a signal transduction mechanism in ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1993 Feb;8(2):121–5.

36. Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ. MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Nov 15;178(10):1033–9.

37. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. Nature. 2014 Jan 16;505(7483):412–6.

Figure Legends

Figure 1. Carbon Monoxide rates in response to whole cigarette smoke exposure, in ppm. Scatter plots are displaying median, plots represent each measure.

Figure 2. NCI-H292 cells viability at baseline, h6, h12, h24, h36 and h48. LDH assay. Values are expressed as mean with SEM, and compared to Triton 1%.

Figure 3. NCI-H292 cells IL8 secretion by ELISA, mean with SD.

Figure 4. MUC5AC Protein Intensity in ALI cultures supernatants at Baseline (1h after WCS or sham exposure) assessed by Dot Blot and expressed as mean with SEM.

Figure 5. MUC5AC Protein Intensity in ALI cultures supernatant at 24h assessed by Dot Blot and expressed as Fold Increase Exposed/NonExposed, mean with SEM. The different drug conditions are represented in the X-Axis (PBS, ATP 1h post-exposure, CCSP 30min pre-exposure then ATP 1h post-exposure).

Figure 6. MUC5AC mRNA level of expression in ALI cultures cell lysats at 24h, assessed by RT-qPCR and expressed as Fold Increase Exposed/NonExposed, mean with SEM. The different drug conditions are represented in the X-Axis (PBS, ATP 1h post-exposure, CCSP 30min pre-exposure then ATP 1h post-exposure).

Table 1. [a]Subject baseline characteristics.

	Healthy	Smokers	COPD	p-value
n	4	3	4	NA
Age, years	40±8.0	60±1.9	67±2.6	0.0009
Gender [n (%male)]	2(50)	2(66.7)	4(100)	0.2729
Smoking history, pack years	1.5±0.9	22±4.4	41±8.3	0.0016[b]
Smoking status [n (%weaned>1year)]	4(100)	1(33)	1(25)	0.0711
FEV1, %th	98±3.5	85±8.2	71±3.0	0.0173[b]
FEV1/FVC	84±5	91±14.7	65±1.6	0.0147[b]

[a]Data are expressed as means ±SEM

[b] COPD patients, Smokers and Healthy subjects were compared using a Kruskal-Wallis test for quantitative data and a Fisher test for qualitative data. with $p < 0.05$ being significant

Definition of abbreviations: FEV1, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity

Figures

Figure 1.

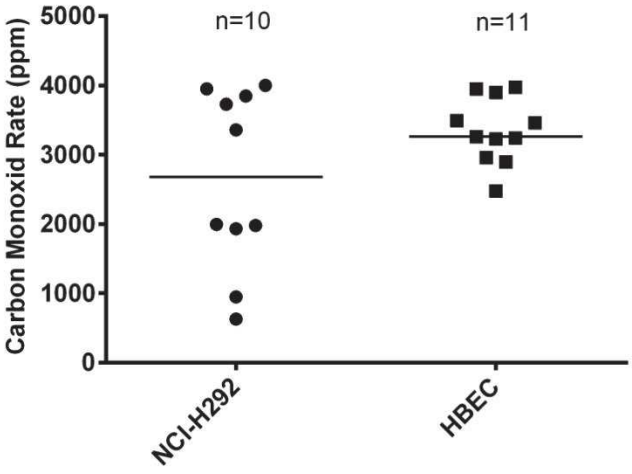


Figure 2.

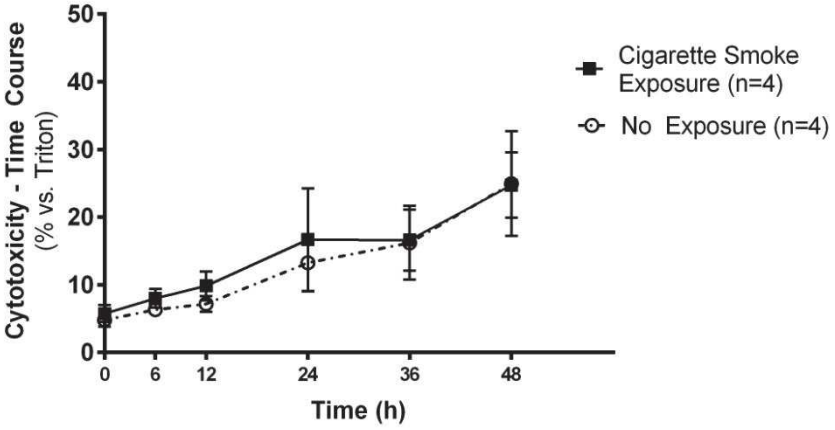


Figure 3.

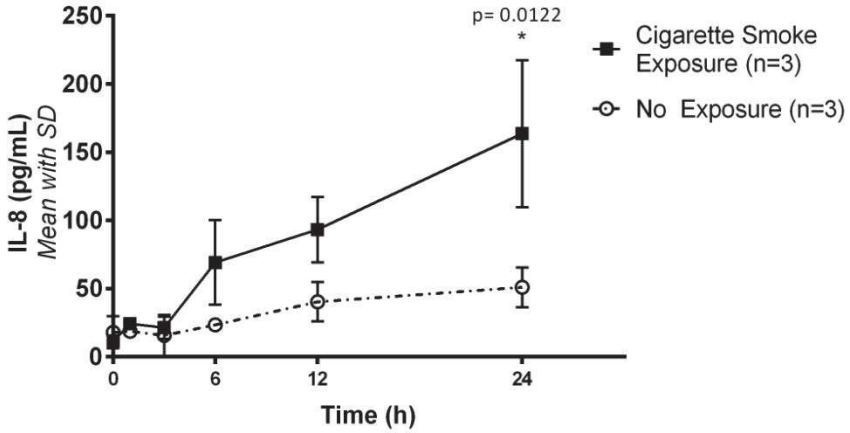


Figure 4.

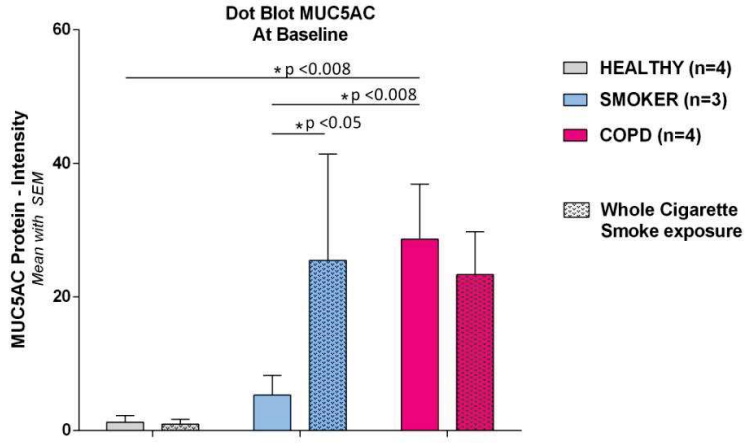


Figure 5.

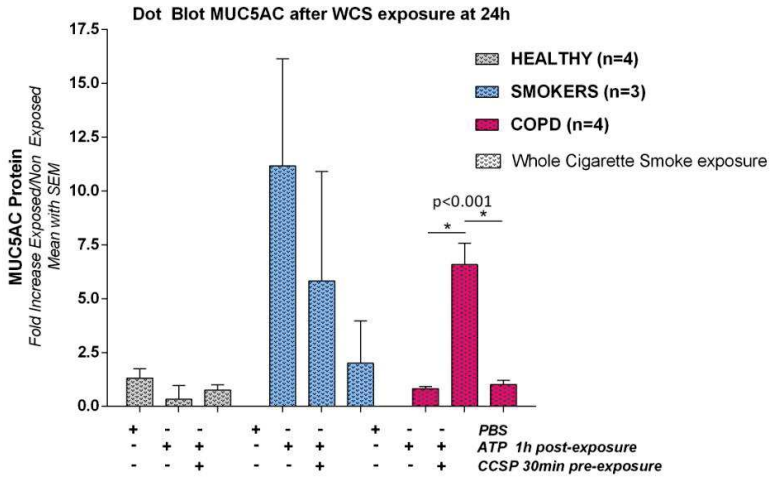
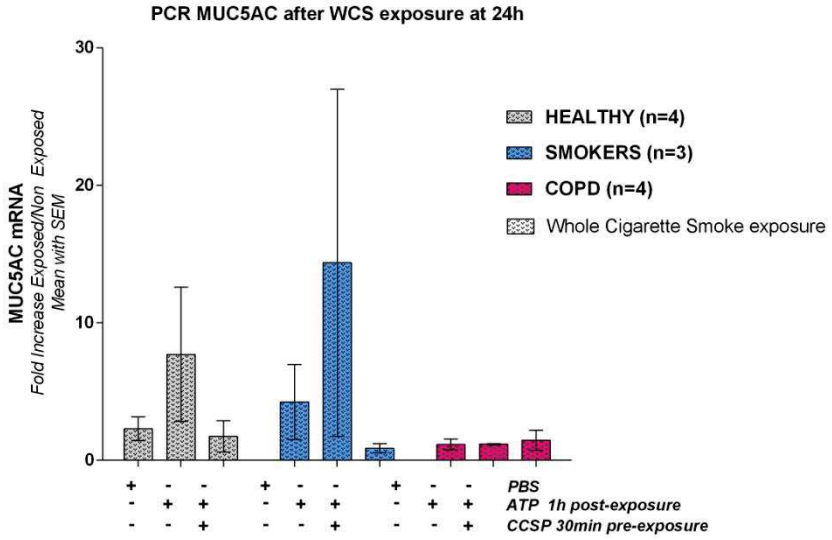
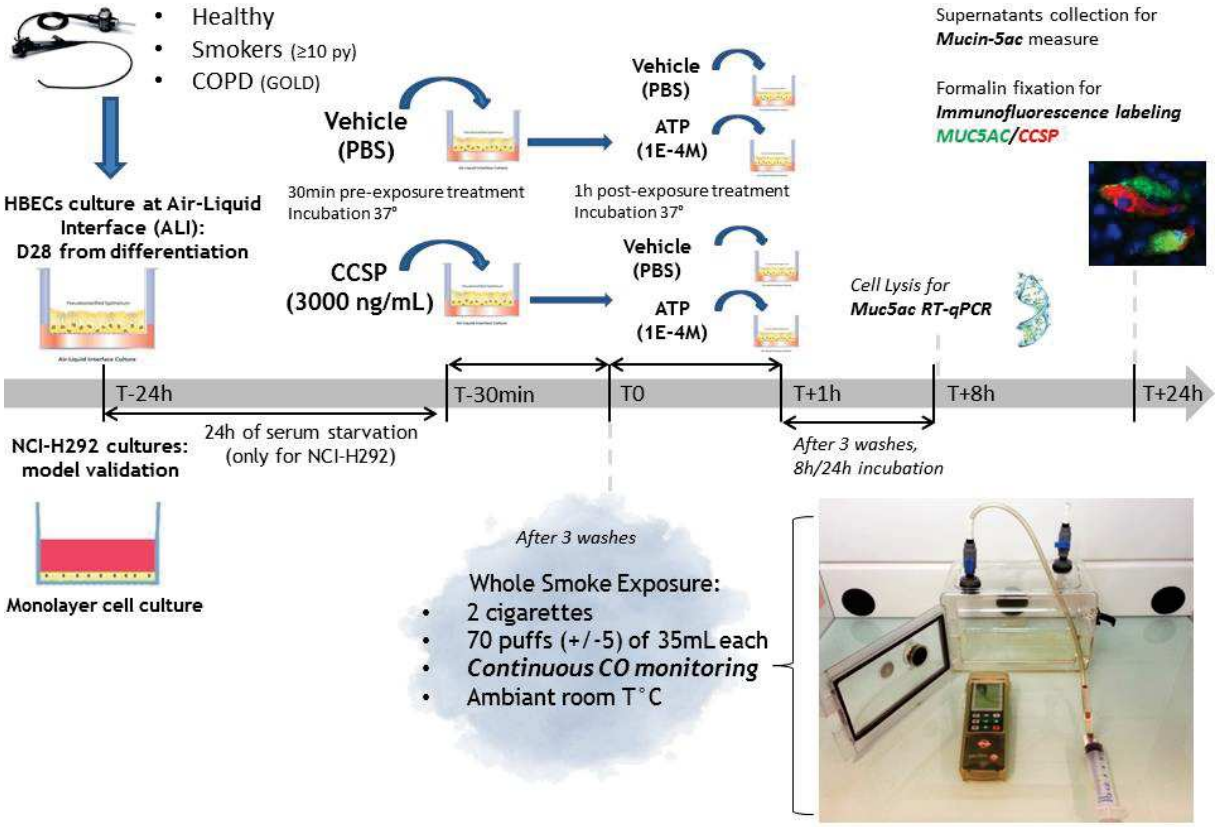


Figure 6.



Supplementary Data

Figure S1.



Effect of whole cigarette smoke exposure and Club Cell Secretory Protein on Muc5ac production in human bronchial epithelial cell primary cultures at air-liquid interface of COPD, Smoker and Healthy patients.

Charriot J[1], Knabe L[1,2], Fort-Petit A[1], Marin G[3], Molinari N[3], Gamez A-S[1], Chanez P[4], Vachier I[1], Bourdin A[1,2]

[1]Department of respiratory diseases, CHRU Montpellier, France; [2]U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, Montpellier University, Montpellier, France;
[3]Department of Medical Information, CHRU Montpellier, France; [4]INSERM U600, AP-HM, Aix Marseille University, Marseille, France

Poster ERS 2016

Rationale & Objectives

Mucus hypersecretion is one of main pathophysiological mechanisms of COPD. It has been demonstrated that Muc5ac was upregulated by Cigarette Smoke Extract (CSE) in NCI-H292 cells. Moreover, Club Cell Secretory Protein (CCSP) expression was lower in lung sections and bronchoalveolar lavage fluid of COPD patients. Our team showed that CCSP supplementation reduced CSE-induced IL-8 secretion of Human Bronchial Epithelial Cells (HBEC) cultivated in air-liquid interface (ALI) obtained from COPD patients*. The use of Whole Cigarette Smoke (WCS) would be more relevant but it has not been clearly studied for air-liquid interface cultures.

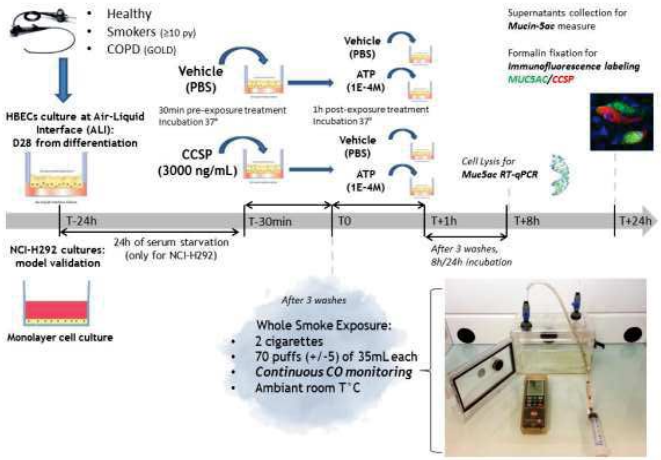
A.S. Gamez, Chest, 2014

Aim of the study:

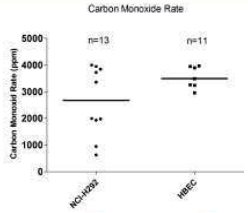
Our aim is to investigate:

- The effect of WCS on Muc5ac production in NCI-H292 cultures and in pseudostratified human ALI cultures obtained from bronchial biopsies of COPD patients.
- The potential role of CCSP in these models.

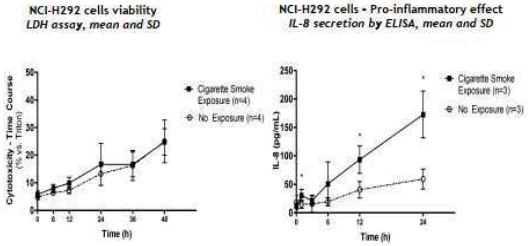
Materials & Methods



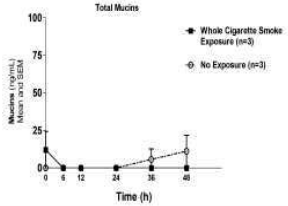
Results



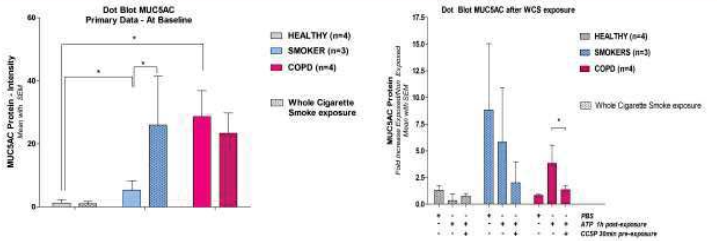
1. Carbon Monoxide rates in response to whole cigarette smoke exposure are reproducible.



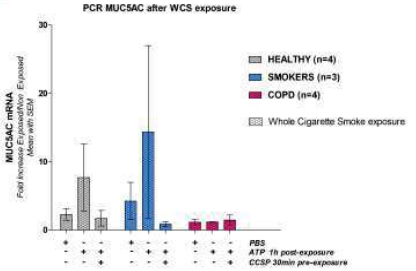
2. No cytotoxicity was observed and IL-8 secretion was significantly increased in NCI-H292 cells exposed to WCS.
   - ➢ Our WCS exposure model was reliable as it combined a pro-inflammatory effect and a low cell mortality.



3. Total Mucin assessment in NCI-H292 supernatants using ELLA-Kit was not relevant, both in exposed and non-exposed conditions.
   - ➢ To avoid this technical problem, Dot Blots were used in further experiments.



4. Muc5ac secretion was increased in Smokers and COPD ALI cultures, regardless of drug stimulation.
   After WCS exposure, Muc5ac secretion increased in Smokers.
   ATP stimulation tended to increase Muc5ac secretion in WCS-exposed COPD culture.
   CCSP supplementation decreased muc5ac secretion in WCS-exposed Smokers and significantly in WCS-exposed COPD.



5. ATP stimulation tended to increase Muc5ac transcription in WCS-exposed Healthy and Smokers but not in COPD.
   CCSP supplementation tended to decrease this effect.

Conclusion

- Intensity of WCS exposure was reproducible and WCS exposure significantly increased IL-8 release in NCI-H292.
- Muc5ac was increased in COPD ALI cultures at baseline.
- WCS induced high muc5ac release in ALI supernatants of Smokers.
- 1h ATP exposure failed to significantly induce muc5ac release.
- CCSP supplementation effect was not constant and should be further confirmed.

II. Discussion

1. Modèle d'exposition à la fumée de cigarette phase gazeuse et particulaire

Dans cette étude, nous avons réussi à obtenir un modèle fiable d'exposition à la fumée de cigarette « entière » (Whole Cigarette Smoke = WCS) avec une intensité d'exposition reproductible évaluée par des concentrations ambiantes stables de CO. Nous avons démontré que la libération de la protéine MUC5AC est augmentée dans les cultures primaires de cellules bronchiques humaines (HBECs) provenant de sujets BPCO. Nous avons ensuite testé le rôle thérapeutique potentiel de la protéine CCSP en traitant les épithélia exposés à la WCS de sujets sains, de fumeurs et de patients BPCO avec de la protéine CCSP exogène. La supplémentation en CCSP a diminué de manière significative l'hypersécrétion de MUC5AC induite par la WCS dans les surnageants d'épithéliums de BPCO ex-vivo.

Ce modèle d'exposition à la fumée de cigarette dans son ensemble, et non pas seulement à une solution de fumée de cigarette, était plus proche de la réalité de l'agression tabagique car il reproduisait la toxicité chimique et mécanique de la phase vapeur décrite dans la littérature. Bien que la dimension physiologique humaine des voies respiratoires n'ait pu être reproduite, notre " boîte à fumer " expérimentale présente aussi l'intérêt de prendre en compte le potentiel stress de cisaillement induit par les turbulences de la phase gazeuse.

2. Hypersécrétion de mucines MUC5AC à *baseline* par les épithélia de BPCO

Avec notre modèle de culture *ex vivo* d'épithélium bronchique, nous avons observé une augmentation de la sécrétion de MUC5AC chez les patients atteints de BPCO à l'état stable, ce qui est l'une des principales caractéristiques conduisant à l'occlusion des petites voies aériennes dans des conditions *in vivo*. Ainsi, ce modèle semble modéliser adéquatement la maladie puisque les changements biologiques sont maintenus et reproduits. L'exposition à la WCS a entraîné une augmentation de la sécrétion de MUC5AC par les épithélia des fumeurs. Cette sécrétion de MUC5AC induite par la fumée de cigarette a déjà été montrée dans des modèles animaux exposés à la WCS ou dans des cultures de cellules bronchiques humaines normales (NHBE) commerciales avec un extrait de fumée, mais jamais dans des cultures primaires de HBECs. De plus, certaines de ces études ont regroupé la production (mesures du lysat cellulaire) et la sécrétion (mesures du surnageant) de MUC5AC, alors qu'elles représentent deux mécanismes distincts et deux voies distinctes (212,213).

Dans nos données, l'absence apparente de sécrétion de MUC5AC induite par le WCS dans les épithéliums de la BPCO doit être interprétée avec précaution. En effet, à l'état de base, la concentration de mucines dans les épithélia de BPCO était cinq fois plus importante que chez les Fumeurs. Ceci pourrait suggérer que l'épithélium de la BPCO a déjà atteint sa capacité sécrétoire maximale, ou bien sa capacité de production maximale, ou qu'une exposition de courte durée ne permet pas de reconstituer les stocks intra-cellulaires de mucines MUC5AC suffisamment rapidement.

3. CCSP diminue l'hypersécrétion de MU5AC induite par l'ATP

Le traitement préventif par rhCCSP dans les épithéliums de BPCO exposés à la WCS a significativement diminué l'hypersécrétion de MUC5AC induite par l'ATP. Nous confirmons ici, dans un modèle aussi proche de la réalité que possible, le rôle potentiel de la CCSP dans les mécanismes d'hypersécrétion de mucus conduisant à l'obstruction des petites voies aériennes. Cette observation est cohérente avec les expériences précédentes de Tokita et al montrant une diminution de la sécrétion et de l'expression de MUC5AC dans les cellules NHBE exposées au LPS et cultivées lors d'un ALI traité avec la rhCCSP(214). Malheureusement, nos résultats n'étaient pas reproductibles avec la mesure de l'ARNm de MUC5AC dans les lysats cellulaires mais cela pourrait être dû en partie à un manque de puissance. De plus, la courte durée de l'exposition n'a encore une fois peut-être pas laisser le temps à la machinerie cellulaire de produire de l'ARNm de MUC5AC.

4. Limites

La conception de notre étude ne permet pas non plus de proposer une voie de signalisation complémentaire à celle que nous avons détaillé précédemment ***(Partie A - paragraphe II.1.b.i.)*** pour la sécrétion de MUC5AC déclenchée par la WCS. Néanmoins, nous pourrions émettre l'hypothèse que le stress chimique ou mécanique induit par la phase gazeuse entraîne une augmentation des concentrations d'ATP dans la couche périciliaire, puis la libération de MUC5AC. D'autres expériences évaluant les concentrations d'ATP dans les surnageants épithéliaux seraient pertinentes.

Plusieurs autres limites de notre étude méritent d'être discutées. Tout d'abord, le modèle de culture ALI est une technique complexe qui nécessite une expertise spécifique. Cela explique un manque de puissance certain. De plus, la collecte des surnageants d'épithélium et de l'ensemble

des produits de sécrétion du mucus est difficile en raison de son adhérence à la face apicale de l'épithélium. L'état d'hydratation du mucus, qui peut être très variable, peut représenter un facteur de confusion potentiel et l'étude de la rhéologie du mucus dans le surnageant serait pertinente.

Ensuite, la méthode utilisée dans un premier temps pour mesurer la protéine MUC5AC s'est avérée problématique, nos premiers tests avec ELLA-Kit n'ayant pas été contributifs, ce qui nous a motivé à utiliser l'évaluation par Dot Blot. De plus, nous avons choisi de réaliser une seule exposition à la WCS, qui n'est pas forcément représentative de l'exposition chronique à la fumée de cigarette dans la " vraie vie ", ce qui permet d'éviter les modifications transcriptionnelles potentielles à long terme qui peuvent participer au développement et/ou au maintien du phénotype de la BPCO. Enfin, nous n'avons pas effectué de mesure de la MUC5B bien que nous ayons vu qu'elle joue un rôle majeur car son taux était indétectable en ELISA, point que nous avons détaillé dans ***la Partie A - Chapitre III.***

En conclusion, nous avons établi un modèle fiable d'exposition à la WCS pour évaluer la régulation de MUC5AC dans les épithéliums ex vivo de patients BPCO. Nous suggérons que la WCS a un rôle potentiel dans l'hypersécrétion de mucus menant à l'occlusion des petites voies aériennes dans la BPCO et qu'une supplémentation en CCSP pourrait atténuer ce trait pathologique.

III. Article 2 : L'éosinophilie est prédite par la rhéologie des expectorations dans les pathologies obstructives bronchiques.

Rheology predicts sputum eosinophilia in muco-obstructive lung diseases (soumis à "Chest")

Objectifs de Thèse

1. DETERMINER LES VARIABLES INFLUENCANT LA RHEOLOGIE DES EXPECTORATIONS ET DU MUCUS DANS LES PATHOLOGIES « MUCO-OBSTRUCTIVES »: ASTHME, BPCO, BRONCHECTASIES NON-CF.

2. A PARTIR DES PARAMETRES RHEOLOGIQUES EVALUES DANS CES PATHOLOGIES, DETERMINER UN SEUIL A PARTIR DUQUEL CE MUCUS PEUT ETRE CONSIDERE COMME INTRINSEQUEMENT PATHOLOGIQUE

Hypothèses testées

1. LA RHEOLOGIE DES EXPECTORATIONS EST UN OUTILS PERMETTANT D'ENDOTYPER LES PATHOLOGIES OBSTRUCTIVES BRONCHIQUES EN ROUTINE CLINIQUE

2. LES MUCINES SECRETEES SONT LES PRINCIPAUX DETERMINANTS DE LA VISCOELASTICITE DU MUCUS DANS LES VOIES AERIENNES, QUELQUE SOIT LA PATHOLOGIE SOUS-JACENTE

3. IL EXISTE UNE RELATION ENTRE LA RHEOLOGIE DU MUCUS ET LE TYPE D'INFLAMMATION DETERMINE DANS L'EXPECTORATION (EOSINOPHILIQUE, NEUTROPHILIQUE, ETC…)

Abstract word count (max 300): 254

Manuscript word count (max 3200): 2880

Rheology predicts sputum eosinophilia in patients with muco-obstructive lung diseases

Short running head (max 50 characters):

Rheology predicts sputum eosinophilia

Authors

Mathilde Volpato [1], MD m-volpato@chu-montpellier.fr
Jerome Vialaret [2], PhD j-vialaret@chu-montpellier.fr
Christophe Hirtz [2], PhD christophe.hirtz@umontpellier.fr
Aurélie Petit [1,3], PhD aurelie.fort@inserm.fr
Carey Suehs [1,4], PhD careysuehs@protonmail.com
Jérémy Patarin [6], PhD patarin@rheonova.fr
Eric Matzner-Lober [7], PhD Eric.Matzner-Lober@ensae.fr
Isabelle Vachier [3], PhD isabelle.vachier@medbiomed.fr
Nicolas Molinari [4,5], PhD nicolas.molinari@inserm.fr
Arnaud Bourdin [1,8], MD, PhD a-bourdin@chu-montpellier.fr
Jeremy Charriot [1,8], MD j-charriot@chu-montpellier.fr

Affiliations

[1]Department of Respiratory Diseases, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France
[2]Clinical Proteomics Platform, LBPC, IRMB, CHU Montpellier, Montpellier University, Montpellier, France
[3]Medecine Biologie Meditérrannée
[4]Department of Medical Information, Montpellier University Hospitals, La Colombière Hospital, Montpellier Cedex, France
[5]IMAG, CNRS, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France
[6] Rheonova, domaine universitaire, 1270 rue de la piscine, 38400 Saint Martin d'Hères, France
[7]Continuing Education ENSAE-ENSAI (CEPE), Rennes University 2, Rennes, France
[8]PhyMedExp INSERM U1046, Montpellier, France

Corresponding author:

Jérémy Charriot, Department of Respiratory Diseases, Montpellier University Hospital, Arnaud de Villeneuve Hospital, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud – 34295 Montpellier Cedex, France

email: j-charriot@chu-montpellier.fr

Conflicts of interest

Dr. Suehs reports grants from Astra Zeneca, outside the submitted work.

Dr Patarin is a full-time employee of Rheonova. Rheonova designed and built the rheometer used in this study.

Pr. Molinari reports personal fees from Astra Zeneca, grants from GSK, outside the submitted work.

Pr. Bourdin reports grants, personal fees, non-financial support and other from Astra Zeneca, grants, personal fees and other from GSK, grants, personal fees, non-financial support and other from Boeringher Ingelheim, personal fees, non-financial support and other from Novartis, personal fees and other from Teva, personal fees and other from Regeneron, personal fees, non-financial support and other from Chiesi Farmaceuticals, personal fees, non-financial support and other from Actelion, other from Gilead, personal fees and non-financial support from Roche, outside the submitted work.

The remaining authors (MV, JV, CH, AP, EML, IV, JC) have no conflicts of interest to disclose.

Funding

This study was funded by a grant from the APARD (*Association pour l'Assistance et la Réhabilitation à Domicile*, Montpellier, France) Endowment Fund and conducted by the study sponsor (University Hospitals of Montpellier, Montpellier, France). This study included a master's dissertation by Dr. Mathilde Volpato, an employee of Medecine Biologie Meditérrannée (Montpellier, France).

Prior abstract submission

European Respiratory Journal, 25 September 2021.

Abbreviations

BMI = body mass index;

CASA-Q = cough and sputum assessment questionnaire;

COPD = chronic obstructive pulmonary disease;

FDR = false discovery rate;

FEV1 = forced expiratory volume in 1 second;

FVC = forced vital capacity;

GERD = gastroesophageal reflux disease;

ICU = intensive care unit;

MUC5AC = Mucin 5AC

MUC5B = Mucin 5B

NCFB = non-cystic fibrosis bronchiectasis

NCFB = non-cystic fibrosis bronchiectasis;

RV = residual volume;

<280 character social media quote

In asthma, COPD and non-cystic fibrosis bronchiectasis, sputum rheology parameters are positively correlated with Mucin 5a content. Additionally, the critical stress threshold from sputum rheology predicts sputum eosinophilia >1.25%.

Take home points

Study question

To determine biological variables influencing sputum rheology in patients with muco-obstructive lung diseases.

Results

Sputum rheology parameters are correlated with mucin content and the critical stress threshold predicts sputum eosinophilia >1.25%.

Interpretation

In muco-obstructive lung diseases, rheology predicts sputum eosinophilia and is correlated with mucin concentrations, regardless of the underlying disease.

Abstract:

Background

Mucus is known to play a pathogenic role in muco-obstructive lung diseases, but little is known about the determinants of mucus rheology. The purpose of this study is to determine which sputum components influence sputum rheology in patients with muco-obstructive lung diseases.

Methods

We performed a cross sectional prospective cohort study. Spontaneous sputum was collected from consecutive patients with muco-obstructive lung diseases. Sputum rheology was assessed using the Rheomuco® rheometer (Rheonova, Grenoble); the elastic modulus G', viscous modulus G'', and the critical stress threshold σc were recorded. Key quantitative and qualitative biological sputum components were determined by cytology, nucleic acid amplification tests and mass spectrometry.

Results

48 patients were included from January to August 2019. Among them, 10 had asthma, 14 COPD and 24 non-CF bronchiectasis (NCFB). The critical stress threshold σc predicted a sputum eosinophilia superior to 1.25% with 89.19% accuracy (AUC=0.8762). G' and G'' are positively correlated with MUC5AC protein concentration ((rho = .361; *P* = .013) and (rho = .335; *P* = .021), respectively). σc was positively correlated with sputum eosinophilia (rho = .394; *P* = .012), MUC5B (rho = 0.552; *P* < .001) and total protein (rho = 0.490; *P* < .001) concentrations. G' and G'' were significantly higher in asthma patients (G'=14.49[7.18-25.26]Pa, G''=3.0[2.16-5.38]Pa) compared to COPD (G'=5.01[2.94-6.48]Pa, *P*=.010; G''=1.45[1.16-1.94]Pa, *P*=.006) and to NCFB (G'=4.99[1.49-10.49]Pa, *P*=.003; G''=1.46[0.71-2.47]Pa, *P*=.002).

Conclusion

In muco-obstructive lung diseases, rheology predicts sputum eosinophilia and is correlated with mucin concentrations, regardless of the underlying disease.

Clinical Trial Registration (registrar, website, and registration number), where applicable

NCT04081740

Keywords

asthma, COPD, eosinophil, mucins, non-CF bronchiectasis

Introduction

Mucus plugging is known to play a critical, pathogenic role in fatal asthma episodes,[1] in the progression of COPD,[2–4] and in outcomes in non-cystic fibrosis bronchiectasis (NCFB).[5] In the clinical setting, chronic bronchitis is a frequent cause for concern for patients and responsible for considerable handicap.[6–11] The pathophysiology of this symptom is probably more complex than the mere consequence of goblet cell hyperplasia alone, though mucus hyperproduction is a key feature reported in most muco-obstructive diseases.[12–17]

Mucus covers the apical surface of the airway epithelium and represents the first barrier with the environment. Produced by both epithelial goblet cells and submucosal glands, mucus is composed of 98% water and 2% protein. The latter components are mostly composed of mucins (primarily MUC5AC and MUC5B[18]), which confer a viscoelastic gel behavior.[19]

Certain rheological properties of mucus, such as viscosity and elasticity, may actively contribute towards airway plugging. The amount of force required to initiate flow in a viscoelastic gel, i.e. the critical stress threshold, is also a key rheology parameter. Surprisingly, the biological components determining these properties remain largely unclear and debated. Recently, Rubin et al. demonstrated that mucus rheology was a better predictor of antibiotic treatment success in cystic fibrosis exacerbations of bronchiectasis when compared to classic bacteriology and antibiograms from respiratory samples.[20] In addition, Patarin et a. showed that sputum rheology might be a useful marker for discriminating between different types of chronic airway diseases,[21] but no relationship with sputum content has been established to explain these observations. The ratio of mucins MUC5AC/MUC5B in mucus seems to be one important factor,[22] as well as eosinophils whose survival has been shown to be favored in MUC5B-deficient sputum through lesser interactions with Siglec-F (Sialic acid-binding, immunoglobulin-like lectin) that normally induces eosinophils apoptosis.[23]

In the present study, we aimed to assess the contribution of eosinophil and mucin content to mucus rheology from patients with asthma, COPD and NCFB.

Methods

Patients

All consecutive patients attending the outpatient clinic in the Respiratory Diseases Department of the Montpellier University Hospitals (Montpellier, France) who met eligibility criteria were prospectively enrolled between September and December 2019. Adults aged 18 or more with a confirmed diagnosis of asthma, COPD or NCFB according to international guidelines,[24–26] were eligible if they were able to spontaneously produce sputum.

Sputum analysis

A spontaneous sputum sample was collected for each individual patient. All samples were rigorously processed following the same procedure as previously described[21]. Within 2 hours of collection, rheology parameters were measured, and then cytology assessments were performed (see following paragraphs). The sputum supernatant was subsequently frozen and stored at -80°C. In parallel, a part of the sample was sent to routine bacterial direct examination and culture. The sputum flow chart is described in the supplementary appendix (e-Figure 1).

Rheology

Rheology was assessed on 720µl of one fresh sputum sample, as previously published by Patarin et al.[21] Briefly, after gentle vortexing at low velocity for one minute, rheometric analysis was performed using the Rheomuco® rheometer (Rheonova, Grenoble, France) at 37°C with an oscillatory frequency of 1Hz and an increasing strain. Measurements of the elastic modulus (G'; Pa), the viscous modulus (G''; Pa) in the visco-elastic linear domain and the critical stress threshold (σc) were obtained.

Cytology

Preliminary data suggested that total cellular counts or cytological classification were not affected by prior rheological analysis (e-Table 1). Subsequently, the sputum was treated with dithiothreitol (DTT) according to standard procedures.[27] The sample quality was then assessed (as squamous cells are an indicator of saliva content/contamination, a squamous cell count <20% of total cell count was required). Sputum samples were classified according to conventionally recognized categories.[28] Briefly, sputum samples with normal neutrophil (<61%) and eosinophil (<1.9%) counts were considered as paucigranulocytic. Sputum samples with normal neutrophil counts and raised eosinophil counts (≥2%) were considered as eosinophilic, and sputum samples with raised neutrophil counts (≥61%) and normal eosinophil counts were considered as neutrophilic. Finally, those samples with both raised neutrophil and eosinophil counts were considered as mixed granulocytic. Supernatants were then stored at -80°C for further assessment.

Total DNA, protein and mucin concentrations, protein identification and α-amylase activity

Frozen supernatants from sputum samples were thawed at room temperature. DNA was extracted (QIAamp DNA Micro Kit) and then quantified with spectrophotometry (NanoDroponeC). Total protein concentration was assessed using colorimetry (RC DC kit (BIO-RAD®)) at 690 nm. Tandem mass spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) was performed to quantify both MUC5AC and MUC5B protein concentrations according to previously described techniques, using the LC-MRM method.[29] Peptide sequences were selected according to previous reports.[29] Because *Pseudomonas sp.* can cleave mucins and thus impair their detection,[30] we screened and identified peptide sequences at both the N- and C-terminal parts of MUC5B and MUC5AC. Protein identification was performed by high resolution mass spectrometry (HRMS) on Data-Dependent Acquisition. The entire detailed

protocol is described in the supplementary material. α-amylase activity was measured using a colorimetric assay (Abcam® ab102523) at 405 nm every other minute during one hour (TECAN Infinite® 200 PRO) as a second quality check to assess salivary contamination.

Ethics

This study was approved by the local Institutional Review Board (CHU de Montpellier RECHMPL19_0430, #2019_IRB-MTP_09-10) and registered on Clinicaltrials.gov (NCT04081740). In accordance with French regulations for observational studies, verbal consent was required and patients could participate as long as they were correctly informed and did not oppose the data analysis.

Statistics

Descriptive statistics are provided as medians followed by their interquartile ranges for quantitative variables, and as numbers (%) for qualitative variables. Pairwise comparisons between groups were performed using false discovery rate (FDR)-corrected Conover's tests or Fisher's exact tests. Multivariable, stepwise regression was then performed to explain sputum rheology parameters (separate models for G', G" and σc) as a function of sputum components. Data were scaled prior to modeling and the models with the smallest Akaike Information Criterion from among forward and backward stepwise procedures were retained. To determine the predictive capacity of rheology to predict sputum eosinophilia, we constructed a Receiver Operating Characteristic curve to discriminate between high (≥1.25%) and low (<1.25%) sputum eosinophilia. The latter threshold (1.25%) was previously published by Hastie et al . and based on 827 patients from the SPIROMICS cohort[31]. The receiver operating curve and associated statistics (Youden's threshold, area under the curve, accuracy, sensitivity and specificity) were computed for σc as a predictor of sputum eosinophil percentage ≥1.25% via

logistic regression. All computations were performed using the R statistical programming environment.[32]

Results

Study population

Fifty-eight patients were eligible for the study. Among them, forty-eight patients were able to produce sputum and were included from September to December, 2019 (Figure 1). Ten patients were included in the asthma group, fourteen in the COPD group and twenty-four in the NCFB group, and the associated descriptive statistics are provided in Table 1. The median annual number of exacerbations in the previous year was 2 [interquartile range: 1-4] without significant differences between groups. Median FEV1 (%predicted) was significantly lower in the COPD group (FEV1 = 28% [22.75-33.25]) compared to the asthma group (FEV1 = 75% [57-78]($P <$ .001)) and the NCFB group (FEV1=55.5% [40-79]($P <$ .001)). Among patients with data for complete blood counts sampled in the past week (n=35), median blood eosinophilia was 210 cells/mm^3 [140-260] and 43.9% of them had ≥300 eosinophils/mm^3 within the past year. Smoking history was significantly more reported in the COPD (93%) than in the asthma (40%) and the NCFB (30%) groups. All patients with asthma and NCFB reported chronic bronchitis, whereas only 64% of patients with COPD did. Twenty-five patients (52%) were hospitalized for a severe acute exacerbation at inclusion, with no significant differences between groups (Table 1).

Rheology

The elastic and the viscous moduli were significantly higher in the asthma group (G'=14.49 [7.18-25.26] Pa, G''=3 [2.16-5.38] Pa) versus the COPD group (G'=5.01 [2.94-6.48]; G''=1.45 [1.16-1.94] Pa) and versus the NCFB group (G'=4.99 [1.49-10.49] and G''=1.46 [0.71-2.47] Pa) (Figures 2a et 2b). No significant between-group differences were observed for critical yield

stress σc (Figure 2c). Descriptive statistics are also listed in the supplementary material (e-Table 2). No significant differences were found between sputum samples collected at steady state in comparison with sputum collected during an exacerbation (e-Figure 2).

Sputum components

Descriptive statistics for sputum components are presented in Table 2. Total cellular count was higher in the NCFB group than in the asthma and COPD groups (respectively 3.66 [1.95-6.92] versus 1.25 [0.82-2.17] (P = .025) and 0.42 [0.1-1.05](P < .001)), with a predominance of neutrophils in all three groups (median percentage of sputum neutrophils = 89.62% [82.75-93.75]). Sputum eosinophil percentages were higher in the asthma group (1.02 [0-2.62]%) compared to the COPD (0.25 [0-3.12]%) and the NCFB (0 [0-0.25]%) groups, although differences were not significant (Table 2).

Greater concentrations of DNA were found in the NCFB group (916.4 [386.28-1293] ng/µl), with significant differences in comparison to the asthma (104.75 [21.85 – 419.22]; P < .001) and COPD group (30.1 [17.1-161.48] ng/µl; P < .001). MUC5B concentrations were significantly higher in both the COPD and asthma groups (respectively 90.55 [57.85-132.82] fmol/µl) and 79.75 [53.28-98.4] fmol/µl) than in the NCFB group (44.6 [26.8-66.7] fmol/µl, P = .006 and P =.027). Asthma and COPD patients exhibited higher MUC5AC concentrations (respectively 62.25 [22.95 to 171.7] fmol/µl and 41.3 [40.4 to 91.8] fmol/µl) than patients in the non-CF bronchiectasis group (35.7 [26.85 to 55.45] fmol/µl) (Table 2). Proteomic analysis showed differential patterns among groups: in COPD and asthma samples, MUC5B and MUC5AC proteins were identified in the top 10 of the protein list, whereas in the NCFB samples, MUC5AB and MUC5AC proteins were identified, but in lower amounts (e-Table 3).

Relating sputum components to rheology

Spearman's correlation tests confirm that G' and G'' are positively correlated with MUC5AC protein concentration ((rho = .361; P = .013) and (rho = .335; P = .021), respectively). σc was positively correlated with sputum eosinophilia (rho = .394; P = .012), MUC5B (rho = 0.552; P < .001) and Protein (rho = 0.490; P < .001) concentrations.

Multiple regression analyses demonstrate that protein content is a highly significant positive determinant of all three rheological parameters, along with MUC5AC (Table 3). MUC5B and the percentage eosinophils also have significant, positive contributions to σc. The percentage neutrophils, on the other hand, is significantly associated with decreasing G' and G'' (and near-significantly so for σc). Similarly, the percentage squamous cells is also negatively correlated with all three rheological parameters, but reaches significance only for σc. Finally, there is a tendency for DNA to be negatively associated with G'' (Table 3).

According to logistic regression, σc predicted sputum eosinophilia superior to 1.25% (β = .0218 ± .0090, P = .015; intercept = -2.6013 ± 0.7296, P < .001); the associated receiver operating curve is presented in Figure 3 and determined 89.19% accuracy (85.71% sensitivity, 93.33% specificity). The area under the curve (AUC) was .8762.

Discussion

In this study, we provide evidence for the first time that: i) simple sputum rheology at the bedside can be confidently related to sputum cytological and mucin content; ii) the viscoelastic properties of sputum are mostly driven by protein and mucin (MUC5AC in particular) content as compared to other tested components; (iii) the critical stress threshold (σc) at which sputum is forced to flow like a fluid (rather than aggregating more like a solid) is further determined by MUC5B and sputum eosinophilia; (iv) σc is predictive of a sputum eosinophilia superior to 1.25% (the latter being a cut-off associated with a more severe COPD phenotype).[31]

In this study, multivariate models evidenced for the first time what was intuitively known but never previously demonstrated at the bedside: the main determinant of the viscoelastic properties of sputum are the mucins, and in particular, MUC5AC, whose concentrations have been rigorously assessed with mass spectrometry. This may have therapeutic implications in itself, but we feel that future research should also delve deeper into the specificities of each underlying condition. In particular, we demonstrated that the relative "rheological weight" of mucins in NCFB seems less important than in other conditions, likely due to the involvement of inflammatory cells and in particular eosinophils. In contrast to what has been previously published,[21] patients with asthma have the highest elastic and viscous moduli here, compared to patients with COPD. This can be explained by the higher severity of asthmatic subjects in our study.

As concerns rheology-targeting treatments, one should keep in mind that MUC5AC and MUC5B are highly complex glycoproteins and the promoter of their related encoding genes is a carrier of a very high number and variety of regulation sites.[33] Targeting MUC5AC for treatment is complex and most previous attempts have failed to achieve this aim[34]. Perhaps the EXPEDITION trial assessing the effect of Dupilumab on airway inflammation in patients with asthma could give us some answers (NCT02573233). In vivo and in vitro, very few molecules are able to reduce the viscoelastic behavior of sputum.[35,36] However, other sputum components may be targeted. For example, DNase was successfully marketed in cystic fibrosis.[37] Similarly targeting eosinophils in sputum should be achievable via monoclonal antibodies (mAbs) such as anti-Interleukine 5/5R or Anti-Interleukine 4R/13R, though the impacts of the latter on sputum content are currently under-reported. From our observations, we may also reasonably hypothesize that the presence of eosinophil-derived elements such as Charcot-Leyden crystals or Eosinophil Extra-cellular Traps (EETs)[38,39] could be involved. As a consequence, targeting Charcot-Leyden Crystals with Galectin10 antibodies could be an option.[40] Another option

would be to change cell fate during epithelial differentiation in order to prevent goblet cell hyperplasia; this could be successfully achieved by Notch pathway interference via anti-Jagged antibodies.[41–43]

Upcoming trials include the "COPD CARhE" study (Chronic Airway Disease, Mucus Rheology and Exacerbations: a Randomized Controlled Trial of COPD Patients, NCT04339270), which will juxtapose symptom-based versus rheology-based azithromycin strategies. Indeed, azithromycin has been shown to reduce exacerbations in asthma, COPD, and NCFB.[44–46] Our hypothesis is that this treatment success could be due to the mucus modifying properties of this macrolide.[47,48] Rheology, which is correlated to the mucin content of mucus, could thus objectively guide the prescription of this antibiotic.

One of our main findings is the accuracy of the critical stress σc for predicting sputum eosinophilia superior to 1.25%. This biomarker might be a promising non-invasive decision-making tool in the care pathway. Indeed, sputum eosinophilia has been shown to be closely related to COPD severity in terms of future exacerbations,[31] to be a reliable biomarker of reduction of exacerbations in patients with moderate to severe asthma[49] and may identify a subgroup of patients in NCFB who could benefit from a biologic "anti-T2" therapy.[50] As a reflection of airway eosinophilia, rheology could thus help the physician to rapidly phenotype their patients, appreciate their adherence to anti-inflammatory therapies or identify patients refractory to their latest biologic treatment.

Due to its pragmatic design, the main limitation of this study is that a significant proportion of patients (10 over 58) were not able to produce spontaneous sputum and were excluded. Although this might represent a lack of power for pairwise group comparisons, the good predictive value of sputum eosinophilia by rheology would not have been affected by this issue. The quality criteria for sputum samples could be another limitation and an obstacle to routine use. In our study, we used a classic quality standard for sputum (a squamous cell count <20%

of total cell count) and added a measure of α-amylase activity to exclude salivary contamination as previously published.[29] Contamination was observed, was modest, and importantly, was equally distributed amongst the strata, indicating it did not bias our results, which is consistent with previous reports.[21]

At last, one could object to the absence of a control group. Patarin et al. have previously reported data about the performance of rheology to discriminate between patients with muco-obstructive lung diseases and healthy subjects.[21] As a consequence, it would not have been ethical to perform further procedures in this category of patients. Moreover, the aim of our study was to assess the performance of rheology to predict sputum content.

Interpretation

Sputum rheology is driven primarily by mucins and eosinophils in asthma, COPD and NCFB, and accurately predicts sputum eosinophilia. Given the recent technological advances rendering on-site rheology quite feasible in the clinic, rheology-based diagnosis and therapeutic strategies can now be tested.

Acknowledgements

Guarantor statement

Jeremy Charriot is the guarantor for this manuscript, and takes responsibility for the content of the manuscript, including the data and analysis.

Author contributions

Mathilde Volpato, Jeremy Charriot and Aurelie Petit performed the cytology, protein assays and rheological analysis of the samples. Arnaud Bourdin, Isabelle Vachier and Jeremy Charriot participated in the design of the study. Jerome Vialaret and Christophe Hirtz performed the mass spectrometry measurements. Nicolas Molinari, Eric Matzner-Lober and Carey Suehs

performed the statistical analyses. Jeremy Patarin gave counsel and expertise about the rheological analysis. All the authors equally contributed to the writing of the manuscript.

Financial disclosures

This study was funded by a grant from the APARD (*Association pour l'Assistance et la Réhabilitation à Domicile*, Montpellier, France) Endowment Fund and conducted by the study sponsor (University Hospitals of Montpellier, Montpellier, France). This study included a master's dissertation by Dr. Mathilde Volpato, an employee of Medecine Biologie Meditérrannée (Montpellier, France).

Role of the sponsors

This study was investigator driven. The study funders/sponsors had no decisional role in study design, data acquisition, analysis, interpretation, or writing.

References

1. Dunican EM, Watchorn DC, Fahy JV. Autopsy and Imaging Studies of Mucus in Asthma. Lessons Learned about Disease Mechanisms and the Role of Mucus in Airflow Obstruction. *Annals ATS* 2018;15(Supplement_3):S184–S191.

2. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992;101(4):916–921.

3. Hogg JC, Chu FSF, Tan WC, et al. Survival after Lung Volume Reduction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Insights from Small Airway Pathology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007;176(5):454–459.

4. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350(26):2645–2653.

5. Ramsey K, Radicioni G, Hill D, et al. Airways mucus pathogenesis in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *European Respiratory Journal* [Internet] 2018 [cited 2021 Oct 23];52(suppl 62). Available from: https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl_62/PA5049

6. Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;153(5):1530–1535.

7. Burgel P-R, Nesme-Meyer P, Chanez P, et al. Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subjects. *Chest* 2009;135(4):975–982.

8. Accordini S, Corsico AG, Calciano L, et al. The impact of asthma, chronic bronchitis and allergic rhinitis on all-cause hospitalizations and limitations in daily activities: a population-based observational study. *BMC Pulm Med* 2015;15:10.

9. Meek PM, Petersen H, Washko GR, et al. Chronic Bronchitis Is Associated With Worse Symptoms and Quality of Life Than Chronic Airflow Obstruction. *Chest* 2015;148(2):408–416.

10. Oca MM de, Halbert RJ, Lopez MV, et al. The chronic bronchitis phenotype in subjects with and without COPD: the PLATINO study. *Eur Respir J* 2012;40(1):28–36.

11. Lahousse L, Seys LJM, Joos GF, Franco OH, Stricker BH, Brusselle GG. Epidemiology and impact of chronic bronchitis in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2017;50(2).

12. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):517–523.

13. Innes AL, Woodruff PG, Ferrando RE, et al. Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. *Chest* 2006;130(4):1102–1108.

14. Groneberg DA, Eynott PR, Oates T, et al. Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med* 2002;96(2):81–86.

15. Burgel P-R, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 2007;62(2):153–161.

16. Chen Z-G, Li Y-Y, Wang Z-N, et al. Aberrant epithelial remodeling with impairment of cilia architecture in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Thorac Dis* 2018;10(3):1753–1764.

17. Ramsey KA, Chen ACH, Radicioni G, et al. Airway Mucus Hyperconcentration in Non–Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;201(6):661–670.

18. Okuda K, Chen G, Subramani DB, et al. Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199(6):715–727.

19. Boucher RC. Muco-Obstructive Lung Diseases. *N Engl J Med* 2019;380(20):1941–1953.

20. Ma JT, Tang C, Kang L, Voynow JA, Rubin BK. Cystic Fibrosis Sputum Rheology Correlates With Both Acute and Longitudinal Changes in Lung Function. *Chest* 2018;154(2):370–377.

21. Patarin J, Ghiringhelli É, Darsy G, et al. Rheological analysis of sputum from patients with chronic bronchial diseases. *Scientific Reports* 2020;10(1):15685.

22. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194(10):1296–1299.

23. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis - PubMed [Internet]. [cited 2021 Oct 22];Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25497369/

24. 2020 GINA Main Report [Internet]. Global Initiative for Asthma - GINA. [cited 2020 May 25];Available from: https://ginasthma.org/gina-reports/

25. Gold Reports for Personal Use [Internet]. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. [cited 2020 May 25];Available from: https://goldcopd.org/gold-reports/

26. Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, et al. European Respiratory Society guidelines for the management of adult bronchiectasis. *European Respiratory Journal* [Internet] 2017 [cited 2020 May 25];50(3). Available from: https://erj.ersjournals.com/content/50/3/1700629

27. Leader of the Working Group: A. Efthimiadis, A. Spanevello, Members of the Working Group:, Hamid Q, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *European Respiratory Journal* 2002;20(Supplement 37):19S – 23s.

28. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: A distinct clinical and pathologic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007;119(5):1043–1052.

29. Kesimer M, Ford AA, Ceppe A, et al. Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis. *N Engl J Med* 2017;377(10):911–922.

30. Henderson AG, Ehre C, Button B, et al. Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J Clin Invest* 2014;124(7):3047–3060.

31. Hastie AT, Martinez FJ, Curtis JL, et al. Association of sputum and blood eosinophil concentrations with clinical measures of COPD severity: an analysis of the SPIROMICS cohort. *The Lancet Respiratory Medicine* 2017;5(12):956–967.

32. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021. Available from: https://www.R-project.org/

33. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of airway mucin gene expression. *Annu Rev Physiol* 2008;70:405–429.

34. Ha EVS, Rogers DF. Novel Therapies to Inhibit Mucus Synthesis and Secretion in Airway Hypersecretory Diseases. *PHA* 2016;97(1–2):84–100.

35. Rheology of Cystic Fibrosis Sputum after in vitro Treatment with Hypertonic Saline Alone and in Combination with Recombinant Human Deoxyribonuclease I | American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine [Internet]. [cited 2020 May 26];Available from: https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/ajrccm.156.1.9512074

36. Tamaoki J, Takeyama K, Tagaya E, Konno K. Effect of clarithromycin on sputum production and its rheological properties in chronic respiratory tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39(8):1688–1690.

37. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *PNAS* 1990;87(23):9188–9192.

38. Dworski R, Simon H-U, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011;127(5):1260–1266.

39. Hwang CS, Park SC, Cho H-J, Park D-J, Yoon J-H, Kim C-H. Eosinophil extracellular trap formation is closely associated with disease severity in chronic rhinosinusitis regardless of nasal polyp status. *Scientific Reports* 2019;9(1):1–8.

40. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science* [Internet] 2019 [cited 2020 Jan 24];364(6442). Available from: https://science.sciencemag.org/content/364/6442/eaaw4295

41. Phillips J e., Davis S, Werner J, et al. Anti-Jagged1 Antibody AMG 430 Reduces Airway Mucus in Mouse Models of Obstructive Pulmonary Disease [Internet]. In: B63. ANIMAL MODELS OF COPD. American Thoracic Society; 2019 [cited 2020 May 26]. p. A3839–A3839.Available from: https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1_MeetingAbstracts.A3839

42. Gough NR. Converting mucus-making cells into mucus-clearing cells. *Sci Signal* 2015;8(406):ec362–ec362.

43. Lafkas D, Shelton A, Chiu C, et al. Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature* 2015;528(7580):127–131.

44. Albert RK, Connett J, Bailey WC, et al. Azithromycin for Prevention of Exacerbations of COPD. *New England Journal of Medicine* 2011;365(8):689–698.

45. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax* 2013;68(4):322–329.

46. Wong C, Jayaram L, Karalus N, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis (EMBRACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2012;380(9842):660–667.

47. Tanabe T, Kanoh S, Tsushima K, Yamazaki Y, Kubo K, Rubin BK. Clarithromycin inhibits interleukin-13-induced goblet cell hyperplasia in human airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45(5):1075–1083.

48. Lu S, Liu H, Farley JM. Macrolide antibiotics inhibit mucus secretion and calcium entry in Swine airway submucosal mucous gland cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;336(1):178–187.

49. Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9347):1715–1721.

50. Davison J, Johnson G, Jiwa K, et al. P112 Deeper phenotyping of non CF bronchiectasis through sputum differential counts. *Thorax* 2013;68(Suppl 3):A125–A125.

Tables

Table 1. Population characteristics for the total population and each disease group (asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and non-cystic fibrosis bronchiectasis (NCFB). Sample sizes (N) and descriptive statistics (median (inter-quartile) for quantitative variables and number (%) for qualitative variables) are provided. *P* values indicate false discovery rate (FDR) corrected, non-parametric Conover test results for pairwise comparisons (for quantitative variables), or FDR-corrected pairwise Fischer's tests (for qualitative variables). *P*-values <0.05 are indicated in bold.

	N	Total (N=48)	Asthma (N=10)	COPD (N=14)	NCFB (N=24)	*P*-values		
						Asthma vs COPD	*Asthma vs NCFB*	*COPD vs NCFB*
Age (yr)	48	64 (51.25-71)	61 (50.25-64)	67.5 (58.75-69)	64 (34-71)	.440	.750	.440
Sex (% female)	48	25 (52.08%)	8 (80%)	4 (28.57%)	13 (54.17%)	.108	.251	.251
BMI (kg/m^2)	48	22.22 (20.02-25.62)	24.73 (21.56-28.07)	21.38 (17.89-23.93)	22.22 (20.02-25.05)	.200	.320	.380
Smoking status (% ever smoker)	47	24 (51.06%)	4 (40%)	13 (92.86%)	7 (30.43%)	**.013**	.692	**< .001**
Active (%)	24	6 (25%)	2 (50%)	4 (31%)	0 (0%)	.999	.120	**.041**
Mean pack-years	17	37 (20-50)	20 (9.5-35)	40 (38.5-52.5)	20 (8.75-35)	.120	.860	.100
Steady state vs exacerbation (% exacerbation)	48	25 (52.08%)	5 (50%)	5 (35.71%)	15 (62.5%)	.704	.704	.536
Blood eosinophilia								
cells/mm^3 in the prior week	35	210 (140-260)	230 (100-250)	210 (170-230)	190 (160 -310)	.88	.88	.88
≥300 cells/mm^3 in the prior year (%)	41	18 (43.9%)	5 (55.56%)	5 (35.71%)	8 (44.44%)	.532	.532	.999
Lung function								
FEV1 (% predicted)	44	46.5 (33-73.5)	75 (57-78)	28 (22.75-33.25)	55.5 (40-79)	**< .001**	.140	**< .001**
FVC (% predicted)	42	75 (57.75-89.75)	89 (79-100)	72 (47-76)	72 (57-95)	**.042**	.085	.320
FEV1/FVC ratio	42	0.59 (0.4-0.69)	0.58 (0.52-0.75)	0.33 (0.29-0.42)	0.67 (0.59-0.7)	**.001**	.694	**< .001**
RV (% predicted)	28	168.5 (131.5-214.47)	--	218.9 (188-301)	138.5 (103.75-153.75)	**--**	--	**< .001**
Comorbidities								
Chronic rhinosinusitis (%)	45	25 (55.56%)	9 (90%)	1 (9.09%)	15 (62.5%)	**.001**	.215	**.006**
with nasal polyps (%)	45	4 (8.7%)	4 (44.44%)	0 (0%)	0 (0%)	**.021**	**.011**	.999
Atopy* (%)	47	11 (23.4%)	6 (66.67%)	1 (7.14%)	4 (16.67%)	**.015**	**.016**	.633
GERD (treated for) (%)	48	18 (37.5%)	5 (50%)	5 (35.71%)	8 (33.33%)	.999	.999	.999
Exacerbations								
Number in past 12 months	46	2 (1 to 4)	2 (1 to 3)	3 (1 to 4)	2.0 (1.5 to 3.5)	.900	.900	.900
≥2 in past 12 months (%)	46	32 (69.57%)	6 (66.67%)	9 (64.29%)	17 (73.91%)	.999	.999	.999
Prior hospitalization (%)	46	31 (67.39%)	6 (60%)	10 (76.92%)	15 (65.22%)	.999	.999	.999
Prior ICU (%)	48	14 (29.17%)	3 (30%)	5 (35.71%)	6 (25%)	.999	.999	.999

*Atopy is defined as positive skin prick tests or specific IgE to one or more inhaled allergens

BMI = body mass index; CASA-Q = cough and sputum assessment questionnaire; FEV1 = forced expiratory volume in 1 second; FVC = forced vital capacity; GERD = gastroesophageal reflux disease; ICU = intensive care unit; RV = residual volume.

Table 2. Sputum components for the total population and each disease group (asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and non-cystic fibrosis bronchiectasis (NCFB). Sample sizes (N) and descriptive statistics (median (inter-quartile) for quantitative variables and number (%) for qualitative variables) are provided. *P* values indicate false discovery rate (FDR) corrected, non-parametric Conover test results for pairwise comparisons (for quantitative variables), or FDR-corrected pairwise Fischer's tests (for qualitative variables). *P*-values <0.05 are indicated in bold.

	Total (n=48)	Asthma (n=10)	COPD (n=14)	NCFB (n=24)	*P*-values		
					*A*sthma vs COPD	*Asthma* vs NCFB	*COPD vs NCFB*
Cell counts							
Total cellular count ($\times 10^6$/g)	1.56 (0.71 to 4.01)	1.25 (0.82 to 2.17)	0.42 (0.1 to 1.05)	3.66 (1.95 to 6.92)	**.034**	**.025**	**< .001**
Neutrophil count ($\times 10^6$/g)	193.83 (85.96 to 405.15)	114.78 (54.58 to 186.11)	84.44 (59 to 97.92)	320.99 (177.13 to 675.81)	.522	**.016**	**.004**
Eosinophil count ($\times 10^6$/g)	0.06 (0 to 2.61)	0.99 (0 to 2.21)	0.32 (0 to 3.26)	0 (0 to 1.78)	.920	.790	.790
Cell percentages							
Sputum neutrophilia (%)	89.62 (82.75 to 93.75)	85 (77.94 to 88.74)	81.5 (73.12 to 92.38)	92 (89.06 to 96.1)	.945	**.043**	**.043**
Sputum eosinophilia (%)	0.12 (0 to 0.56)	1.02 (0 to 2.62)	0.25 (0 to 3.12)	0 (0 to 0.25)	.750	.400	.400
Squamous cells (%)	1.25 (0.25 to 7.88)	1.25 (0.75 to 2.75)	50.38 (2.25 to 90)	0.38 (0 to 2.12)	.100	.174	**< .001**
Classifications							
Neutrophilic (%)	29 (63.04%)	4 (44.44%)	4 (30.77%)	21 (87.5%)	.662	**.030**	**.002**
Eosinophilic (%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)			
Mixed granulocytic (%)	6 (13.04%)	2 (22.22%)	3 (23.08)	1 (4.17%)	.999	.261	.261
Paucigranulocytic (%)	2 (4.35%)	1 (11.11%)	0(0%)	1 (4.17%)	.716	.716	.999
Squamous (%)	9 (19.57%)	2 (22.22%)	6 (46.15)	1 (4.17%)	.380	.261	**.013**
DNA and proteins							
DNA (ng/µL)	317.95 (31.62 to 836.8)	104.75 (21.85 to 419.22)	30.1 (17.1 to 161.48)	916.4 (386.28 to 1293)	.249	**< .001**	**< .001**
Proteins (mg/mL)	20.36 (11.96 to 30.71)	18.04 (14.6 to 30.22)	20.71 (10.62 to 23.75)	23.57 (11.96 to 35.72)	.660	.660	.660
MUC5AC (fmol/µL)	40.75 (26.3 to 82.1)	62.25 (22.95 to 171.7)	41.3 (40.4 to 91.8)	35.7 (26.85 to 55.45)	.958	**< .001**	**< .001**
MUC5B (fmol/µL)	64(32.75 to 89.05)	79.75 (53.28 to 98.4)	90.55 (57.85 to 132.82)	44.6 (26.8 to 66.7)	.677	**.027**	**.006**
α-amylase activity (mU/mL)	842.96 (462.8 to 2601.27)	1904.76 (685.12 to 2639.77)	804.59 (290.96 to 3794.99)	810.46 (524.12 to 1845.5)	.770	.770	.770

.

Table 3. Multivariable regression results for explaining sputum rheology parameters (G', G'' and σc) as a function of sputum components. Only the best models minimizing the Akaike Information Criterion are presented (from among forward and backward stepwise procedures). Standardized coefficients and associated standard errors are presented so as to facilitate coefficient comparisons. P-values in bold indicate variables with significant contributions to a model.

Variable	Standardized		*P*-value
	Coefficient	Standard error	
Model 1: Variables predicting the elastic modulus (G' in Pa) of sputum samples Adjusted r^2 = .8791; *P* < .001			
Proteins (mg/mL)	.3829	.0587	**< .001**
MUC5AC (fmol/µL)	.6439	.0886	**< .001**
Sputum neutrophilia (%)	-.2504	.0958	**.014**
Sputum eosinophilia (%)	.0939	.0604	.130
Squamous cells (%)	-.1450	.0715	.051
Model 2: Variables predicting the viscous modulus (G'' in Pa) of sputum samples Adjusted r^2 = .7513; *P* < .001			
Proteins (mg/mL)	.6561	.1108	**< .001**
DNA (ng/µL)	-.2375	.1197	.056
MUC5AC (fmol/µL)	.3768	.1279	**.006**
Sputum neutrophilia (%)	-.3242	.1372	**.024**
Squamous cells (%)	-.2047	.1047	**.**059
Model 3: Variables predicting the critical stress threshold (σc in Pa) of sputum samples Adjusted r^2 = .8058; *P* < .001			
Proteins (mg/mL)	.3611	.0754	**< .001**
MUC5AC (fmol/µL)	.2555	.1125	**.030**
MUC5B (fmol/µL)	.2517	.0937	**.011**
Sputum neutrophilia (%)	-.2281	.1251	.078
Sputum eosinophilia (%)	.3484	.0862	**.000**
Squamous cells (%)	-.2339	.0907	**.015**

Figure 1. The study flowchart.

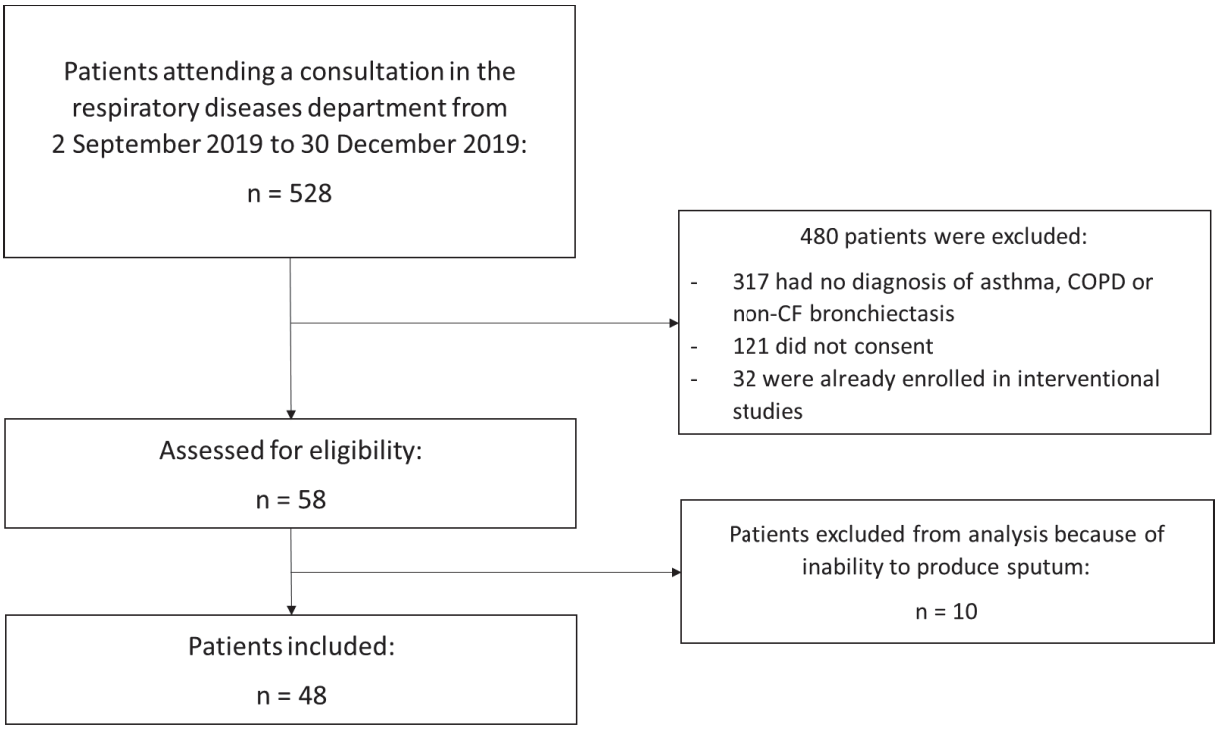


Figure 2. Boxplots demonstrating the distributions of (A) the elastic modulus (G'; Pa), (B) the viscous modulus (G''; Pa) and (C) the critical stress threshold (σc; Pa) for three disease groups (asthma in red, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in green and non-cystic fibrosis bronchiectasis (NCFB) in blue). Medians, interquartile intervals, and ranges are indicated by horizontal lines, boxes and whiskers, respectively. *P* values indicate non-parametric Conover tests for pairwise comparisons that remain significant after a false discovery rate correction.

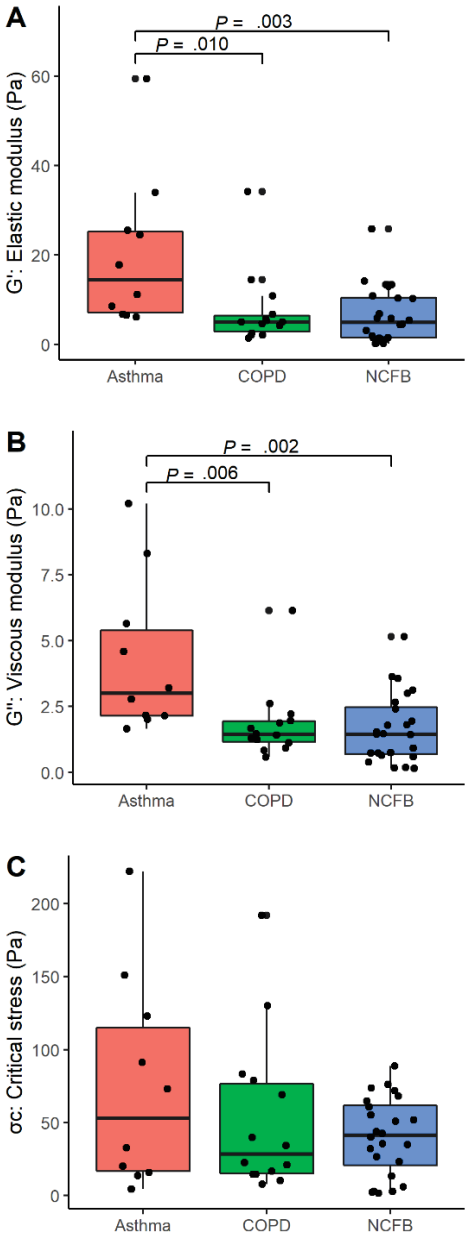
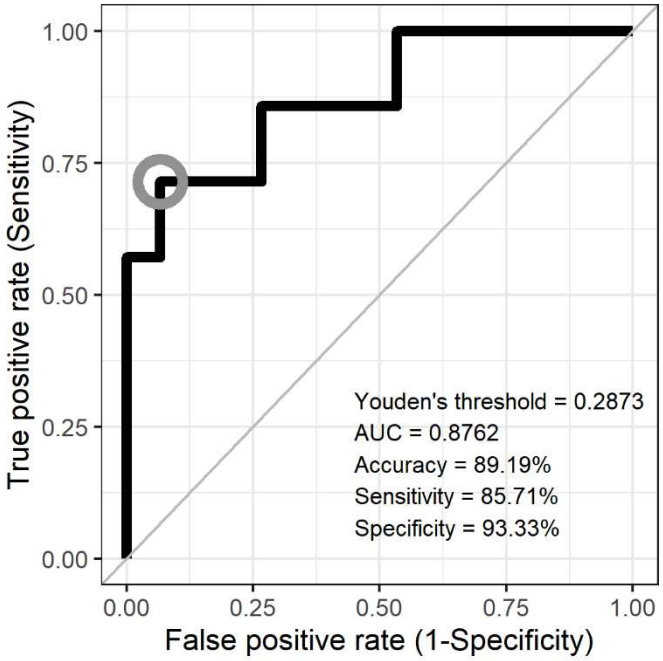


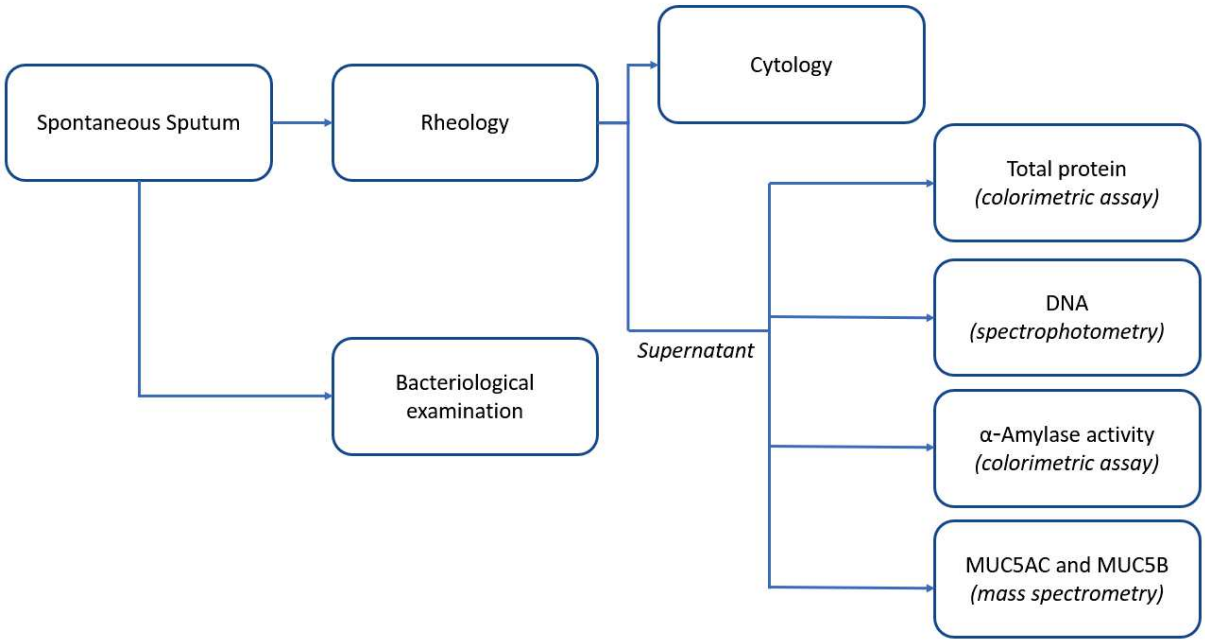
Figure 3. The receiver operation characteristic (ROC) curve for the prediction of high versus low sputum eosinophilia using the critical stress threshold (σc in Pa) as a predictor in logistic regression. The grey circle indicates Youden's best threshold.



Rheology predicts sputum eosinophilia in patients with muco-obstructive lung diseases

Mathilde Volpato, MD; Jerome Vialaret, PhD; Christophe Hirtz, PhD; Aurélie Petit, PhD; Carey Suehs, PhD; Jérémy Patarin, PhD; Eric Matzner-Lober, PhD; Isabelle Vachier, PhD; Nicolas Molinari, PhD; Arnaud Bourdin, MD, PhD; Jeremy Charriot, MD

Online supplement



e-Figure 1] The sputum flow chart.

e-Table 1] Impact of rheological assay on sputum total cellular count and cytology classification

	Total cell count/g(.10^6)	**squamous cells-percent**	**classification**	**neutrophil percent**	**macrophage percent**	**eosinophil percent**	**lymphocyte percent**	**epithelial cells percent**
S1	3.03	0.5	neutrophilic	92	8	0	0	0
S1'	2.26	3	neutrophilic	92	7	1	0	0
S2	0.36	6	neutrophilic	94	4	0	2	0
S2'	0.36	6	neutrophilic	82	8	0	9	0
S3	0.38	38	neutrophilic	68	28	0	4	0
S3'	1.05	21.5	neutrophilic	83	16	0	1	0
S4	3.59	0	neutrophilic	96	4	0	0	0
S4'	2.97	0	neutrophilic	97.5	2	0.5	0	0
S5	4.51	0	mixed	92.75	2	5.25	0	0
S5'	3.04	0	mixed	93.5	2.5	3.5	0.5	0

S1, S2, S3, S4, S5 cytological examinations have been performed directly after sputum collection.

S1', S2', S3', S4', S5' cytological examinations have been performed after rheological measures.

Supplementary methods : Mass spectrometry analysis

Mass Spectrometry analysis

Sample composition

Pool 1 and 2(DDB)

4 Non-CF Bronchiectasis, 3 COPD, and 2 Asthma samples were analyzed in HRMS analysis

Sample Preparation

60 µg of proteins from sputum to each sample were denatured with 75µL of Trifluoroethanol. Samples were reduced by adding DTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) to a final concentration of 14 mM for 45 minutes at 60 degree Celsius. After reduction, samples were alkylated with iodoacetamide (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) at a final concentration of 40 mM for 30 minutes at 37°C in the dark. Samples were diluted with 750 µL of 25 mM ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 1 µg modified trypsin (proteomics grade, Promega, Madison, USA) was added to samples, and then incubated 22 h at 37°C. Digestion was stopped by adding 10µL of pure formic acid (FA). Samples were vacuum concentrated before peptide clean-up on AssayMap BRAVO (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) with C18 tips. Tips were primed with 70% acetonitrile (ACN)/0.1% FA, equilibrated with 0.1% FA and sample was loaded. Clean-up was performed with washes with 0.1% FA before an elution by 70% ACN/0.1% FA. Peptide elution were vacuum dried (Labconco , Kansas, USA). Acetonitrile, formic acid and waters are from Biosolve (Dieuze, France)

Quantitation of MUC5B and MUC5AC by LC-MRM method

Digested peptides were resolubilized in 35 µL 0.1 % formic acid water containing heavy peptides.

Four heavy labelled peptide internal standards corresponding to different regions of MUC5B and MUC5AC protein sequence were purchased at 5 pmol/µL ± 5% with purity >97% (HeavyPeptides AQUA Ultimate; Thermo Fisher, Ulm, Germany): MUC5B Nter (LTPLQFGNLQK); MUC5B Cter (TWLVPDSR); MUC5AC Nter (AEDAPGVPLR); MUC5AC Cter (SLIIQQQGCSSSEPVR).

The four peptides were mixed and spiked into the sample's digests at a final concentration of 100 fmol/µL for SLIIQQQGCSSSEPVR; 50 fmol/µL for AEDAPGVPLR; 250 fmol/µL for LTPLQFGNLQK and TWLVPDSR. For the Non-CF Bronchiectasis samples, AEDAPGVPLR and LTPLQFGNLQK were spiked at a concentration 100 times lower than the previous solution.

15µL were injected in duplicate on LC-MS system (LC-40 Nexera – MS TQ 8060, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). For liquid chromatography, samples were loaded on AdvanceBio Peptide Plus column (2.1 × 150 mm, 2.7 µm) (Agilent Technologies, Les Ulis, France) maintained at 50 °C. The separation was performed by a gradient of two mobile phase composed of 0.1% FA (Phase A) and ACN (Phase B) on 35 min run with a non-linear gradient of 2 to 13% of phase B in 27.5min at a flow rate of 400 µL/min. The column was then washed for 2 min with 90% solvent B and re-equilibrated for 5 min with 2% solvent B. Liquid chromatography was coupled to the MS analyser through an ESI interface. The ESI source was set as follows: DL: 150°C, heat block: 250°C, interface: 400°C, nebulizer gas: 2 l/min, drying gas: 5 l/min, heating gas: 15 l/min. The MS analysis operated in scheluded MRM mode with a range of Dwell Time of 34 to 197 ms. Quadrupole resolution was Unit to Q1 and Q3. Collision energies (CE) were optimized for all the peptide transitions of interest.

Peptide	Transition	Collision Energy
AEDAPGVPLR	512.8000>824.4500	-22.0
AEDAPGVPLR	512.8000>709.4500	-23.0
AEDAPGVPLR	**512.8000>638.4000**	-19.0
AEDAPGVPLR	512.8000>541.3500	-27.0
AEDAPGVPLR	512.8000>385.2500	-19.0
AEDAPGVPLR	512.8000>319.7000	-20.0
AEDAPGVPLR	517.8000>834.5000	-22.0
AEDAPGVPLR	517.8000>719.4500	-23.0
AEDAPGVPLR	**517.8000>648.4000**	-19.0
AEDAPGVPLR	517.8000>551.3500	-27.0
AEDAPGVPLR	517.8000>395.2500	-19.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	597.0000>978.4500	-25.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	**597.0000>761.4000**	-24.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	597.0000>674.3500	-22.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	597.0000>587.3500	-22.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	597.0000>500.3000	-22.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	597.0000>555.3500	-17.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	600.3500>988.4500	-25.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	**600.3500>771.4000**	-24.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	600.3500>684.4000	-22.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	600.3500>597.3500	-22.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	600.3500>510.3000	-22.0
SLIIQQQGCSSSEPVR	600.3500>555.3500	-17.0
TWLVPDSR	**487.3000>686.4000**	-18.0
TWLVPDSR	487.3000>573.3000	-20.0
TWLVPDSR	487.3000>474.2500	-18.0
TWLVPDSR	487.3000>377.2000	-28.0
TWLVPDSR	**492.3000>696.4000**	-18.0
TWLVPDSR	492.3000>583.3000	-20.0
TWLVPDSR	492.3000>484.2500	-18.0
TWLVPDSR	492.3000>387.2000	-28.0
LTPLQFGNLQK	633.9000>1052.6000	-23.0
LTPLQFGNLQK	633.9000>955.5500	-27.0
LTPLQFGNLQK	633.9000>842.4500	-25.0
LTPLQFGNLQK	633.9000>714.4000	-24.0

LTPLQFGNLQK	633.9000>567.3500	-28.0
LTPLQFGNLQK	**633.9000>526.8000**	-17.0
LTPLQFGNLQK	629.8613>1044.6000	-23.0
LTPLQFGNLQK	629.9000>947.5500	-27.0
LTPLQFGNLQK	629.9000>834.4500	-25.0
LTPLQFGNLQK	629.9000>706.4000	-24.0
LTPLQFGNLQK	629.9000>559.3000	-28.0
LTPLQFGNLQK	**629.9000>522.8000**	-17.0

Raw data obtained were processed using Skyline software (version v20.1).

For each peptide, the transition ratio between the corresponding endogenous and internal standard peak areas of each precursor (MS) and each product ions (MS/MS) was calculated. Transitions in bold were used to quantification. A 9-point calibration curves were performed in triplicate with variable quantity of light standards peptide and a fixed quantity of heavy standards peptides. The same fixed quantity of heavy standards was spiked in patient's samples.

Peptide	Protein	Position	Calibration range (fmol/µL)	Heavy peptide spiked (fmol/µL)
AEDAPGVPLR	MUC5AC	Nter (1431-1440)	50 - 0.195	50
SLIIQQQGCSSSEPVR	MUC5AC	Cter (5538-5553)	160 - 0.625	160
LTPLQFGNLQK	MUC5B	Nter (226-236)	100 - 0.391	100
TWLVPDSR	MUC5B	Cter (5586-5593)	100 - 0.391	100

Peptide	Protein	Position	Calibration range to Non-CF Bronchiectasis samples (fmol/µL)	Heavy peptide spiked (fmol/µL)
AEDAPGVPLR	MUC5AC	Nter (1431-1440)	0.5 - 0.00195	0.5
SLIIQQQGCSSSEPVR	MUC5AC	Cter (5538-5553)	160 - 0.625	160
LTPLQFGNLQK	MUC5B	Nter (226-236)	1 - 0.00391	1
TWLVPDSR	MUC5B	Cter (5586-5593)	100 - 0.391	100

Protein identification by HRMS

To perform protein identification analysis, digest samples were resuspended in 10µL of 2% acetonitrile and 0.1% formic acid, and 7µL of samples were injected on nanoElute (Bruker). NanoFlow LC was coupled to QTOF MS instrument (Impact II, Bruker Daltonics) through captive spray ion source (1200V, dry gas: 3 l/min at 150°C) operating with nanobooster (0.2 Bar of Nitrogen boiling in acetonitrile). In the LC part, samples were desalted and pre-

concentrated on-line on a PepMap u-precolumn (300 µm x 5 mm, C18 PepMap 100, 5 µm, 100 Angstrom). To perform separation, peptides were transfered to analytical column (75 µm x 500 mm; Acclaim Pepmap RSLC, C18, 2µm, 100 Angström). A gradient consisting of 5-26% B for 192 min and 90% B for 10 min (A = 0.1% formic acid, 2% acetonitrile in water; B = 0.1% formic acid in acetonitrile) at 400 nL/min, 50°C, was used to elute peptides from the reverse-phase column.

To identify peptides, data dependent acquisition (DDA) was performed with a lock-mass as internal calibrator (m/z 1222, Hexakis (1H, 1H, 4H-hexafluorobutyloxy) phosphazine). Using Instant Expertise software (Bruker Daltonics), the most intense ions per cycle of 3 seconds were selected and then active exclusion was used (after 1 spectrum for 2 minutes unless the precursor ion exhibited intensity higher of 3 times than the previous scan).

Peptide identification

All MS/MS spectra were searched against the Nextprot database (2018-01-17) to identify proteins from Homo Sapiens by using the Mascot v 2.6.0 algorithm (Matrix Science, http://www.matrixscience.com/) with the following settings: (1) enzyme: trypsin, (2) variable modifications: oxidation (M) and deamidated (N,Q), (3) fixed modifications: carbamidomethyl (C), (4) missed cleavages: 2, (5) instrument type CID: ESI-QUAD-TOF, (6) peptide tolerance: 10.0 ppm, (7) MS/MS tolerance: 0.05 Da, (8) peptide charge: 1+, 2+ and 3+, (9) mass: monoisotopic, (10) C13: 1, (11) minimum peptide length: 5, (12) peptide decoy: ON, (13) adjust FDR [%]: 1, (14) percolator: on, (15) ions score cut-off: 12, (16) ions score threshold for significant peptide IDs: 12.

RESULTS

Analytical performance based on the calibration curve

Two series of calibration curves (Non-CF Bronchiectasis and Asthma/COPD) were used because the Non-CF Bronchiectasis samples exhibited a lower signal intensity for two peptides and the quantity of heavy and light peptides had to be adjusted. LOQ was defined as 10 times the signal-to-noise ratio on LC-MRM data (PMID: 23561579) (Table xx).

Peptide	Protein	Position	Calibration range (fmol/µL)	Calculated LLOQ (fmol/µL)	Linear Equation	R^2
AEDAPGVPLR	MUC5AC	Nter (1431-1440)	50 - 0.195	0.2016	y = 0.682x + 0.0028	0.9998
SLIIQQQGCSSSEPVR	MUC5AC	Cter (5538-5553)	100 - 0.391	2.0325	y = 0.9937x + 0.0099	0.9938
LTPLQFGNLQK	MUC5B	Nter (226-236)	250 - 0.977	0.5152	y = 1.2177x - 0.0004	0.9998
TWLVPDSR	MUC5B	Cter (5586-5593)	250 - 0.977	0.2032	y = 1.7045x - 0.0007	0.9996

Peptide	Protein	Position	Calibration range (fmol/µL)	Calculated LLOQ (fmol/µL)	Linear Equation	R^2
AEDAPGVPLR	MUC5AC	Nter (1431-1440)	0.5 - 0.00195	0.0068	y = 0.7432x - 0.0076	0.9792
SLIIQQQGCSSSEPVR	MUC5AC	Cter (5538-5553)	160 - 0.625	2.0785	y = 1.511x - 0.0119	0.9987
LTPLQFGNLQK	MUC5B	Nter (226-236)	1 - 0.00391	0.0396	y = 1.4651x - 0.0213	0.9731

TWLVPDSR	MUC5B	Cter (5586-5593)	100 - 0.391	0.3706	y = 1.3662x - 0.0041	0.9998

Linear equation was obtained for each quantified peptide with an R square > 0.97.

Pool samples (Pool 1 and Pool2-DDB) were prepared in duplicate and analyzed in duplicate at 6 different time point.

Peptide	Protein	Position	Repetability CV (%)	Reproductibility CV (%)
AEDAPGVPLR	MUC5AC	Nter (1431-1440)	8.0	16.2
SLIIQQQGCSSSEPVR	MUC5AC	Cter (5538-5553)	4.4	12.4
LTPLQFGNLQK	MUC5B	Nter (226-236)	2.8	8.4
TWLVPDSR	MUC5B	Cter (5586-5593)	0.6	15.3

Peptide	Protein	Position	Repetability CV (%)	Reproductibility CV (%)
AEDAPGVPLR	MUC5AC	Nter (1431-1440)	13.9	28.3
SLIIQQQGCSSSEPVR	MUC5AC	Cter (5538-5553)	7.8	16.7
LTPLQFGNLQK	MUC5B	Nter (226-236)	16.7	24.5
TWLVPDSR	MUC5B	Cter (5586-5593)	0.7	17.0

All the validation tests shown CV below 20% corresponding to the maximum tolerance in the guidelines (« Guideline on bioanalytical method validation » de l'European Medecines Agency (EMA), édité le 21 Juillet 2011 (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**)) excepted for the reproducibility test in pool2-DDB to the peptide AEDAPGVPLR and LTPLQFGNLQK. This can be explained by the very low amount close to the LOQ to these two peptides in DDB samples.

Protein identification

Three type of samples were analyzed using HRMS to evaluate the sample composition and to characterize Mucin-5B and Mucin-5AC.

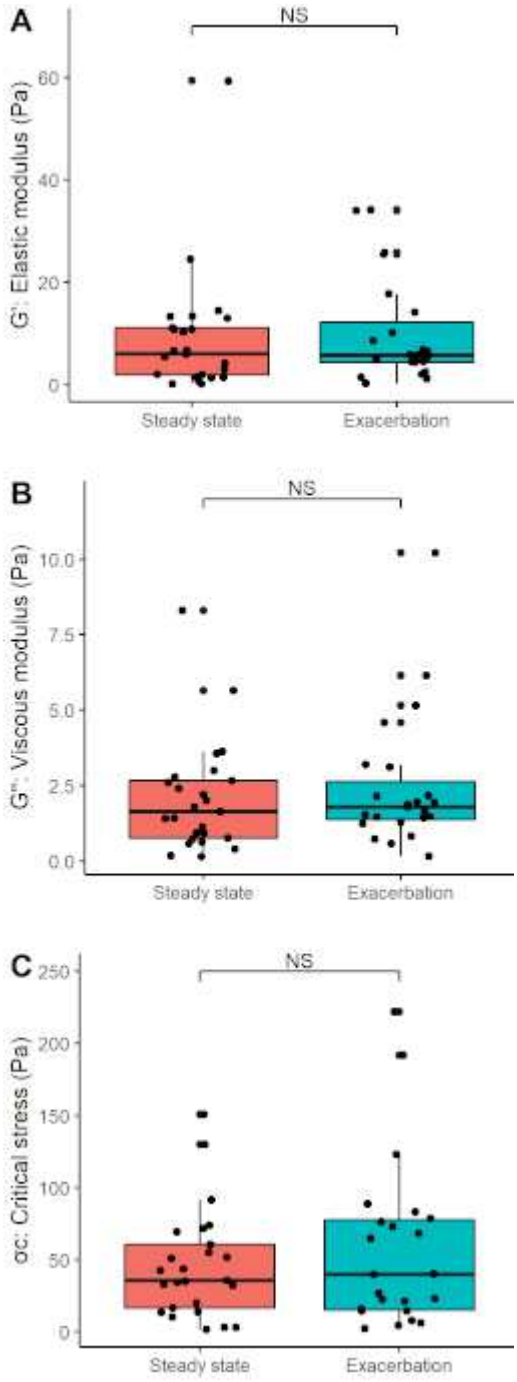
In COPD and Asthma samples, Mucin-5B and Mucin-5AC were identified in the top 10 of the protein ID list. This result means that they are predominant in these samples.

In the Non-CF Bronchiectasis samples, Mucin-5B and Mucin-5AC were identified but in lower amount. (cf. Proteins list).

Mucin characterization was performed by comparing the list identified peptides based on the protein sequence (Figure 2). For the three pathologies, COPD, Asthma and Non-CF Bronchiectasis samples, mucin peptides were identified in the N-termini and C-termini part of the Mucin-5B and Mucin-5AC.

e-Table 2] Rheology parameters for the total population and each disease group (asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and non-cystic fibrosis bronchiectasis (NCFB). Sample sizes (N) and descriptive statistics (median (inter-quartile)) are provided. *P* values indicate false discovery rate (FDR) corrected, non-parametric Conover test results for pairwise comparisons. *P*-values <0.05 are indicated in bold.

Parameter	Total (n=48)	Asthma (n=10)	COPD (n=14)	NCFB (n=24)	*P*-values		
					*A*sthma vs COPD	*Asthma* vs NCFB	*COPD vs NCFB*
Elastic modulus (G' in Pa)	5.9 (2.42-11.62)	14.49 (7.18-25.26)	5.01 (2.94-6.48)	4.99 (1.49-10.49)	**.010**	**.003**	.703
Viscous modulus (G'' in Pa)	1.73 (0.93-2.7)	3 (2.16-5.38)	1.45 (1.16-1.94)	1.46 (0.71-2.47)	**.006**	**.002**	.763
Critical stress threshold (σc in Pa)	37.6 (15.4-72.12)	52.9 (16.8-115.1)	28.35 (15.03-76.4)	41.25 (20.75-61.7)	.76	.76	0.80



e-Figure 2] Sputum rheology parameters at steady state and during exacerbation (pooled analysis). (A) Elastic modulus G', (B) Viscous modulus G'', (C) Critical stress σc.

e-Table 3] Proteins identified in sputum by high resolution mass spectrometry (HRMS).

Rank	Asthma			Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)			Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis (NCFB)		
	Protein name	Isoform	% relative	Protein name	Isoform	% relative	Protein name	Isoform	% relative
1	Mucin-5AC	Iso 1	12.15	Mucin-5B	Iso 1	13.68	Lactotransferrin	Iso 1	9.35
2	Serum albumin	Iso 1	8.98	Mucin-5AC	Iso 1	15.32	Serum albumin	Iso 1	10.84
3	Mucin-5B	Iso 1	9.25	IgGFc-binding protein	Iso 1	11.76	Complement C3	Iso 1	9.16
4	Complement C3	Iso 1	9.39	Lactotransferrin	Iso 1	8.76	Fibrinogen beta chain	Iso 1	4.49
5	Serotransferrin	Iso 1	6.63	Alpha-amylase 1	Iso 1	5.47	Plastin-2	Iso 1	4.86
6	Polymeric immunoglobulin receptor	Iso 1	5.25	Polymeric immunoglobulin receptor	Iso 1	4.79	Serotransferrin	Iso 1	5.61
7	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Iso 1	3.04	Serum albumin	Iso 1	5.61	Matrix metalloproteinase-9	Iso 1	4.30
8	Actin, cytoplasmic 2	Iso 1	4.01	BPI fold-containing family B member	Iso 1	4.10	Alpha-2-macroglobulin	Iso 1	5.23
9	BPI fold-containing family B member	Iso 1	3.73	Lysozyme C	Iso 1	2.87	Alpha-enolase	alpha-enolase	3.93
10	Immunoglobulin heavy constant gamma1	Iso 1	3.04	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Iso 1	2.74	Haptoglobin	Iso 1	4.11
11	Matrix metalloproteinase-9	Iso 1	4.28	Complement C3	Iso 1	4.24	Alpha-1-antitrypsin	Iso 1	3.55
12	Alpha-2-macroglobulin	Iso 1	4.56	Serotransferrin	Iso 1	3.28	Leukocyte elastase inhibitor	Iso 1	3.93
13	Lysozyme C	Iso 1	3.18	Immunoglobulin kappa constant	Iso 1	1.37	Fibrinogen gamma chain	Gamma-A	3.55
14	Plastin-2	Iso 1	3.87	Zinc-alpha-2-glycoprotein	Iso 1	2.33	Annexin A1	Iso 1	3.36
15	Haptoglobin	Iso 1	3.31	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Iso 1	2.19	Alpha-amylase 1	Iso 1	3.93
16	Alpha-1-antitrypsin isoform I	Iso 1	3.59	Antileukoproteinase	Iso 1	2.33	Catalase	Iso 1	3.55
17	Fibrinogen beta chain	Iso 1	2.76	Cystatin-SN	Iso 1	1.50	Mucin-5B	Iso 1	3.74
18	Alpha-enolase	alpha-enolase	3.04	Keratin, type II cytoskeletal 1	Iso 1	2.19	Fructose-biophosphate aldolase A	Iso 1	3.18
19	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Iso 1	2.76	Galectin-3-binding protein	Iso 1	2.19	Annexin A3	Iso 1	3.36
20	Annexin A1	Iso 1	3.18	Prolactin-inducible protein	Iso 1	1.50	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Iso 1	2.62
21				Alpha-1-antichymotrypsin	Iso 1	1.78	BPI fold-containing family B member 1	Iso 1	3.36

Biological determinants of sputum rheology in chronic airway diseases

M. Volpato [1,2], J. Vialaret [3], C. Hirtz [3], A. Petit [2], M. Jory [5], C. Suehs [1,4], J. Patarin[6], E. Matzner-Lober [7], I. Vachier [1], N. Molinari [4], A. Bourdin [1,2], J. Charriot [1,2]

1 - Service des Maladies Respiratoires, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France; 2 -PhyMedExp INSERM U1046, Montpellier, France; 3 - Laboratoire de biochimie, plateforme de protéomique Clinique (PPC); IRMB, CHU Saint-Eloi, Montpellier, France; 4 - Département d'Information Médicale, CHU La Colombière, Montpellier, France; 5 - UMR 5221 CNRS, Laboratoire Charles Coulomb (L2C), Montpellier, France; 6 – Rheonova (Grenoble); 7 - Continuing Education ENSAE-ENSAI (CEPE), Rennes University 2, Rennes, France

Introduction

Background

Chronic bronchitis, is a major cause of concern and a real handicap for patients with chronic airway diseases. Mucus hyperproduction and mucus plugs are key pathophysiological features of these diseases. However, the intrinsic role played by the different components of sputum (mucins, saliva, epithelial cell debris, inflammatory cells, DNA, bacteria and fungi, for example) is far from being fully elucidated. Although goblet cell hyperplasia is a feature reported in most muco-obstructive lung diseases, it might not be the only cause of chronic bronchitis.

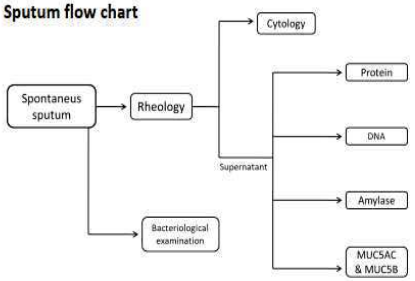
Both viscosity and elasticity are biophysical properties of mucus supposed to actively participate to mucus plugging. Surprisingly, the biological component underlying these biophysical properties remain largely unclear and debated. Rheometers can easily measure these variables. Rheology rheology could serve as a new clinical tool to assess sputum composition in clinical practice.

Objectives

In the present study we aimed to assess the relative contribution of the different sputum components in its rheological properties, G' being the elastic modulus, G'' the viscous modulus and τC the critical stress value. For this purpose, we assessed both biological and rheological properties of spontaneous sputum samples provided by fully characterized patients with chronic airway diseases.

Methods

Sputum flow chart



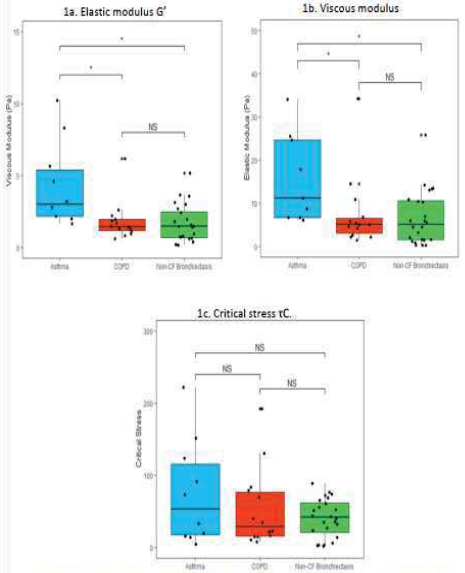
Sputum Rheology with Rheomuco® rheometer



We performed a non-interventional clinical study. Spontaneous sputum was collected from consecutive asthma, COPD, and non-CF bronchiectasis patients. Patients answered the Cough and Sputum Assessment Questionnaire (CASA-Q). Sputum rheology was assessed using the Rheomuco® rheometer (Rheonova, Grenoble); the elastic modulus G', viscous modulus G'', and critical stress τC were recorded. Key quantitative and qualitative biological sputum components were determined by cytology, nucleic acid amplification tests and mass spectrometry.

Results 1/2

Figure 1. Rheological parameters according to chronic airways diseases :



48 patients were included from January to August 2019. Among them, 10 had asthma, 14 COPD and 24 non-CF bronchiectasis. G' and G'' were significantly different in asthma patients (G'=14.49[7.18-25.26]Pa, G''=3.0[2.16-5.38]Pa) compared to COPD (G'=5.01[2.94-6.48]Pa, G''=1.45[1.16-1.94]Pa, p<0.05) and to non-CF bronchiectasis (G'=4.99[1.49-10.49]Pa, G''=1.46[0.71-2.47]Pa, p<0.05) **(Figure 1.)**

Results 2/2

Table 1. : Contributors to rheology

1a. Stepwise Multiple Linear Regression of Elastic Modulus (G')

	Coefficient	Standard Error	*p*- value
(Intercept)	18.8178793	7.1821565	.01318
Neutrophils (percent)	-0.2394938	0.0782808	.00438
Protein concentration	0.2721719	0.0849189	.00299
MUC5AC protein concentration	0.0781792	0.0141633	.98e-06
Amylase	-0.0004624	0.0002188	.04226

Adjusted r^2=0.7733 , p :4.977e-11

1b. Stepwise Multiple Linear Regression of Viscous Modulus (G'')

	Coefficient	Standard Error	p value
(Intercept)	2.306e+00	1.181e+00	0.0596
Neutrophils (percent)	-2.830e-02	1.307e-02	0.0379
Protein concentration	6.985e-02	1.410e-02	2.27e-05
MUC5AC protein concentration	1.467e-02	2.289e-03	3.32e-07
Amylase	-7.522e-05	3.559e-05	0.0424
Total cell count	-4.951e-02	3.283e-02	0.1414

Adjusted r^2=0.8188, p : 5.549e-12

1c. Stepwise Multiple Linear Regression of Viscous Modulus (τC)

	Coefficient	Standard Error	p value
(Intercept)	1.346e+01	9.765e+00	0.177824
Eosinophil (percent)	6.873e+00	3.063e+00	0.032139
Proteins	1.388e+00	3.503e-01	0.000375
MUC5B	2.320e-01	9.856e-02	0.025103
MUC5AC	2.930e-01	4.904e-02	1.32e-06
Amylase	-2.410e-03	8.672e-04	0.009165
Total cell count	-1.242e+00	8.784e-01	0.167967

Adjusted r^2=0.8261, p : 1.157e-11

G' and G'' were positively correlated with MUC5AC protein concentration ((r^2=0. 77, p<.001) and (r^2=0.819, p<.001) respectively). τC was positively correlated with sputum eosinophilia (r^2=0.826, p=0.032), MUC5AC (r^2=0.826, p=<.001) and MUC5B (r^2=0.826, p=0.025) protein concentrations (Table 1.). CASA-Q was poorly but significantly correlated with τC (r^2=0.131, p=0.03) (data not shown).

Conclusion: Sputum rheology assessment is routinely feasible and simple in patients with chronic airway diseases and is better correlated with mucin concentrations and sputum eosinophilia than with symptoms regardless of the underlying disease.

Poster ERS 2020

IV. Discussion

Dans cette étude, nous fournissons des preuves que :

1) la rhéologie des expectorations des patients atteints d'asthme, de BPCO et de bronchectasies non-CF est liée à la cytologie et aux contenus en mucines des expectorations.

2) les propriétés viscoélastiques des expectorations sont principalement déterminées par le contenu en éosinophiles et en mucines (MUC5AC en particulier), par comparaison aux autres composants.

3) la mesure de la contrainte critique Tau-c est prédictive d'une éosinophilie de l'expectoration supérieure à 1. 25% quelle que soit la maladie sous-jacente, seuil qui s'est avéré être associé à un phénotype plus sévère dans la BPCO (215).

1. Propriétés viscoélastiques de l'expectoration et contenu en mucine

À ce jour, il n'existe pas de données établissant une corrélation entre les concentrations de mucines et les paramètres rhéologiques des expectorations de patients atteints de maladies pulmonaires muco-obstructives. Dans cette étude, des modèles multivariés ont permis d'identifier ce qui était intuitif mais n'avait jamais été mis en évidence: dans les maladies dites muco-obstructives le principal déterminant des propriétés viscoélastiques des expectorations sont les mucines, et en particulier MUC5AC, dont les concentrations ont été rigoureusement évaluées ici par spectrométrie de masse.

Cela peut avoir des implications thérapeutiques en soi, mais nous pensons que les recherches futures devraient également approfondir les spécificités de chaque pathologie. En ce qui concerne les traitements ciblant la rhéologie, il faut garder à l'esprit que MUC5AC et MUC5B sont des glycoprotéines très complexes et que le promoteur de leurs gènes codants est porteur d'un nombre et d'une variété très élevés de sites de régulation(21). Le ciblage spécifique de MUC5AC peut donc s'avérer complexe, et la plupart des tentatives précédentes n'ont pas réussi à atteindre cet objectif. In vivo et in vitro, très peu de molécules sont capables d'impacter significativement le comportement viscoélastique des expectorations comme nous l'avons vu précédemment ***(Partie A - chapitre IV.7).***

2. Relation entre le stress critique Tau-c et l'éosinophilie de l'expectoration

L'un de nos principaux résultats est la précision du stress critique Tau-c pour prédire une éosinophilie de l'expectoration supérieure à 1,25%. Ce biomarqueur pourrait être un outil décisionnel non invasif prometteur dans le parcours de soins et donc aider le médecin à phénotyper rapidement ses patients, à apprécier leur adhésion aux thérapies « anti-inflammatoires » ou à identifier les patients réfractaires aux derniers traitements biologiques. De plus, cette étude nous a permis de définir une valeur médiane de la contrainte critique des expectorations chez les patients BPCO dont nous nous sommes servis pour élaborer le protocole de recherche présenté ci-après ***(COPD CaRhe cf. Partie B-Chapitre V).***

3. Rhéologie de l'expectoration, caractéristiques cliniques et résultats de la HRCT

D'autres analyses non reportées dans l'article précédent ont été effectuées. Nous nous sommes ainsi intéressés aux caractéristiques cliniques des patients à travers une évaluation objective standardisée de la bronchite chronique par le questionnaire « Cough AND Sputum Assessment Questionnaire » (CASA-Q). Nous nous sommes aussi intéressés au lien potentiel entre rhéologie et fonction respiratoire (VEMS) ainsi qu'avec le « mucus score » établi par analyse des données tomodensitométriques thoraciques et développé par l'équipe de Dunican(216) ***(Figure 35.).***

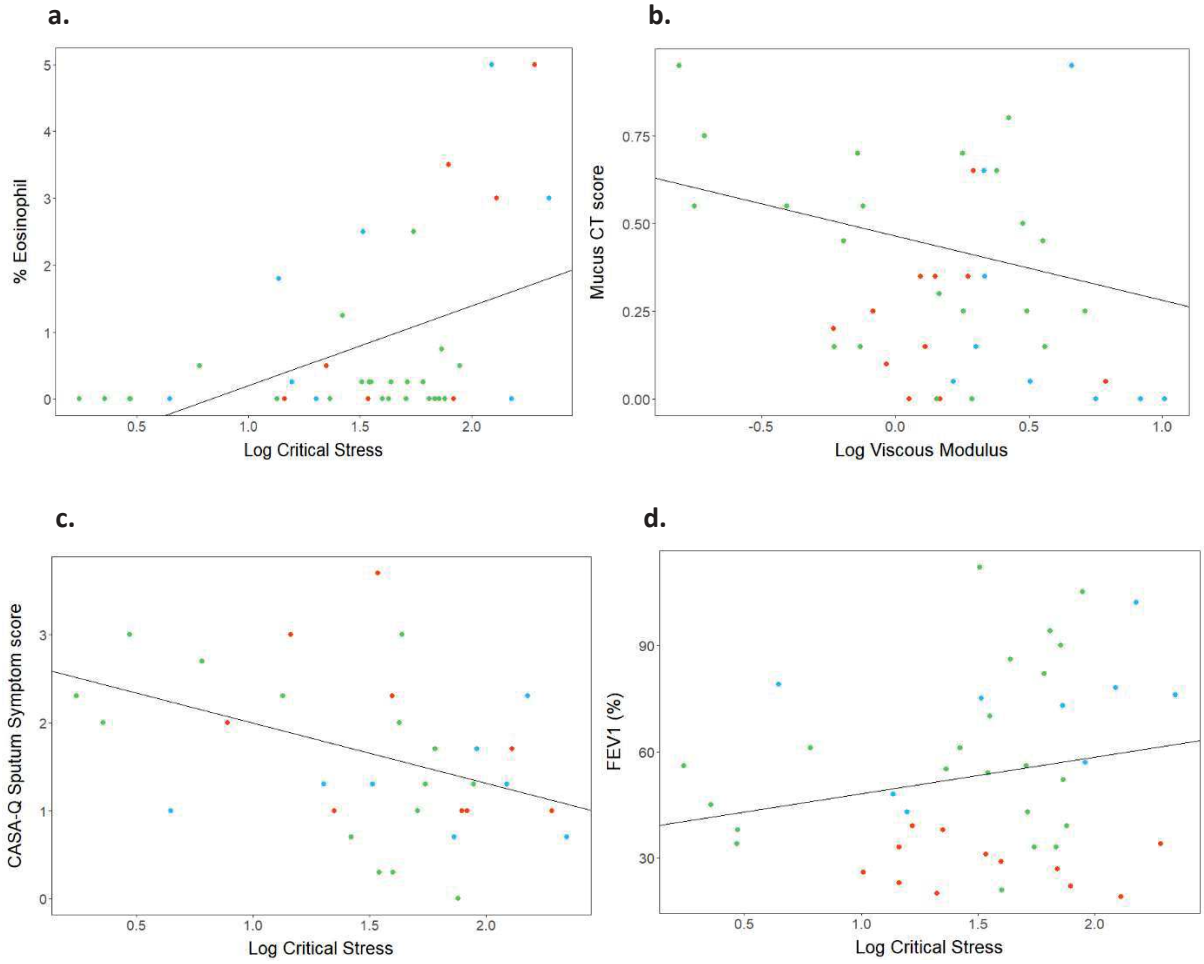


*Figure 35. Corrélations entre la rhéologie et **a.** L'éosinophilie dans les expectorations **b.** mucus score tomodensitométrique (R^2 ajusté: 0.122 p-value: 0.01442), **c.** score CASA-Q (R^2 ajusté: 0.1305 p-value: 0.03065) et **d.** VEMS (FEV1) (R^2-ajusté: 0.02072 p-value: 0.1768). Points bleus: asthme, points rouges: BPCO, points verts: bronchectasies non-CF*

Il est intéressant de noter que certaines variables rhéologiques (représentées ici, critical stress=Tau-C et Viscous modulus= G'') sont partiellement associées au mucus score ou au VEMS. Il est vrai que ces corrélations sont faibles, mais compte tenu de la nature exploratoire des données et de l'hétérogénéité de la population incluse, nous pensons que ces résultats restent pertinentes, en particulier compte tenu des démonstrations précédentes d'absence d'association entre la plainte clinique et un endotype mucosécrétant (116).

4. Limites

Nous ne reviendrons pas sur toutes les limites décrites dans l'article précédent, si ce n'est la principale, à savoir qu'en raison de sa conception pragmatique, une proportion significative de patients (10 sur 58) n'ont pas été en mesure de produire des expectorations spontanées et ont été exclus. Bien que cela puisse représenter un manque de puissance pour notre analyse des différences inter-groupes, la bonne valeur prédictive de l'éosinophilie dans l'expectoration par la rhéologie n'aurait pas été affectée par ce problème. Dans le protocole COPD CaRhe développé ci-après, nous avons donc décidé de réaliser systématiquement des expectorations induites afin de maximiser la rentabilité de l'expectoration.

Une autre limite pourrait être celle de la reproductibilité des mesures rhéologiques au sein d'un même échantillon. Nous l'avons vérifiée dans notre centre, toutefois sur un faible échantillonnage, afin de confirmer les données déjà publiées par Patarin et al.(158) ***(Figure 36.).***

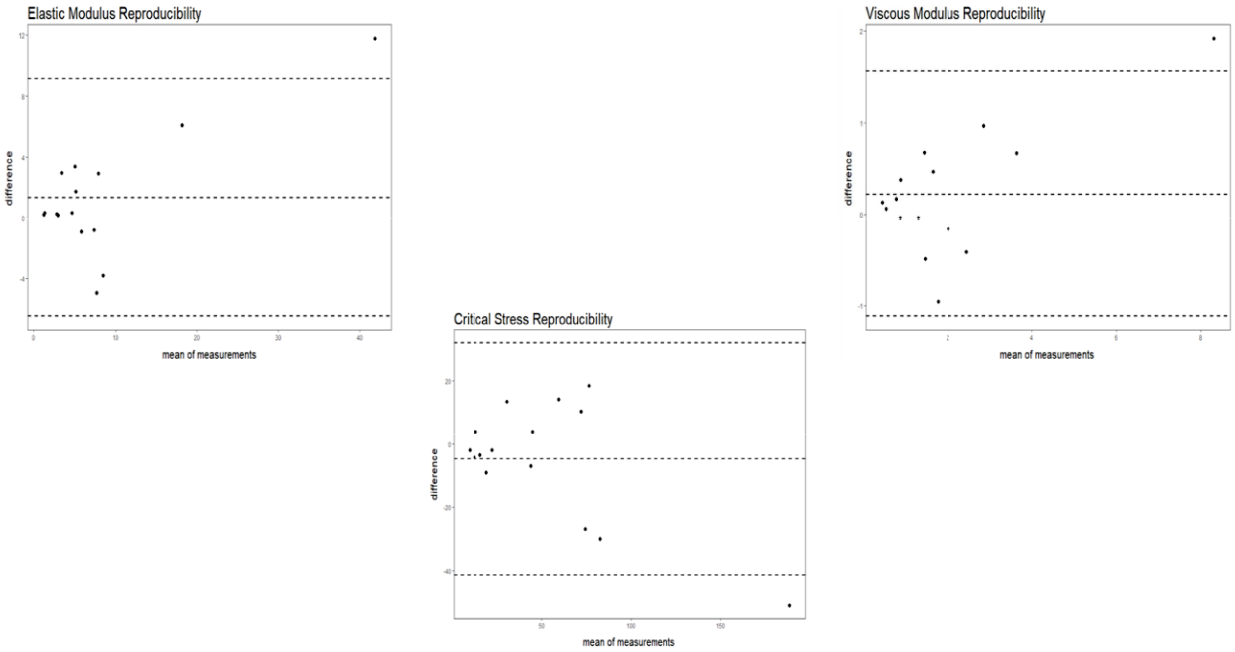
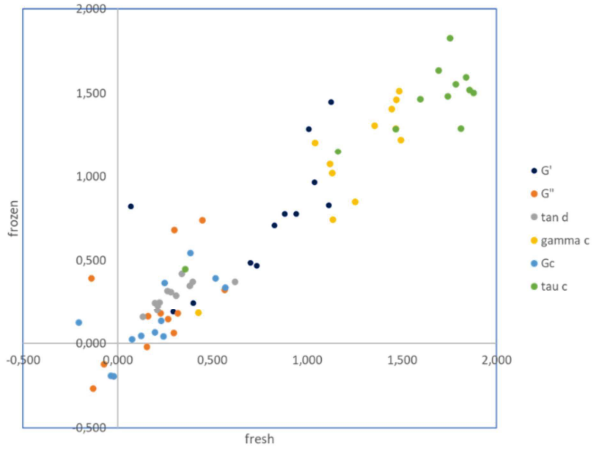


Figure 36. Reproductibilité des mesures rhéologiques (Modulus élastique G', Module visqueux G'', et contrainte critique Tau-C) "intra-échantillon"

Enfin, à des fins exploratoires, nous nous sommes assurés de l'absence d'impact significatif d'un cycle congélation (-80°C dans les 2h après prélèvement) / décongélation (température ambiante) ***(Figure 37).*** Ces observations nous permettent par ex. de différer l'analyse rhéologique des échantillons si nécessaire.



Sample	G'-before	G'-after	CV- G'	G''-before	G''-after	CV-G''	τc-before	τc-after	CV-τc
S1	7,16	4,45	33,09	0,81	0,68	11,80	57,40	32,20	39,77
S2	1,79	1,17	29,47	0,54	0,49	7,12	34,90	24,30	25,32
S3	0,57	4,63	110,63	0,42	1,61	83,24	1,44	2,25	31,04
S4	9,15	2,41	82,36	2,41	1,02	57,41	60,30	29,00	49,57
S5	8,94	18,78	50,20	1,75	0,04	135,75	50,60	29,10	38,15
S6	3,79	3,07	14,81	1,25	0,90	23,09	25,10	15,60	33,01
S7	4,52	3,46	18,76	1,03	0,90	9,26	48,20	56,50	11,21
S8	6,96	13,12	43,41	1,25	3,16	61,50	52,90	16,00	75,74
S9	3,89	1,92	47,80	1,40	0,71	46,08	11,20	11,40	1,25
S10	3,10	1,98	31,14	0,84	0,61	23,13	40,50	35,50	9,30
S11	1,36	0,81	35,70	0,50	0,38	18,70	47,00	24,10	45,55
S12	5,85	4,15	24,06	1,17	0,91	17,79	63,80	25,70	60,20
		Mean CV	**43,45**		**Mean CV**	**41,24**		**Mean CV**	**35,01**

Figure 37. S1, S2, Sx...S12 échantillons et leurs données rhéologiques(G', G'', Tau-C) avant et après congélation. A. Représentation Graphique et B. Valeurs absolues

5. Perspectives

La rhéologie de l'expectoration est principalement alimentée par les mucines et les éosinophiles dans l'asthme, la BPCO et les bronchectasies non-CF, et permet de prédire avec précision l'éosinophilie de l'expectoration. Compte tenu des récentes avancées technologiques qui rendent la rhéologie sur site tout à fait réalisable en clinique, il est désormais possible de tester des stratégies diagnostiques et thérapeutiques basées sur la rhéologie. C'est ce que nous développerons dans le chapitre suivant.

V. « COPD » CaRhe : Chronic airway disease, mucus rheology and exacerbations: a randomized controlled trial of COPD patients

- Protocole déposé à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé (ANSM) le 24 Janvier 2020 N°EudraCT : 2019-004182-41
- Financement dans le cadre du PHRC Inter-Région GIRCI-SOHO 2018
- Dans un soucis de clarté, les parties concernant les aspects pharmacovigilance et règlementaire du protocole n'ont pas été rapportées dans ce manuscrit.

Objectifs de Thèse

1. INTEGRER LA MESURE DE LA RHEOLOGIE DES EXPECTORATIONS DANS UNE STRATEGIE DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE EN PRATIQUE CLINIQUE

Hypothèses testées

1. UNE STRATEGIE DE PRESCRIPTION D'AZITHROMYINE GUIDEE PAR LA RHEOLOGIE PERMET DE REDUIRE LE TAUX ANNUEL D'EXACERBATIONS CHEZ LES PATIENTS BPCO

2. UNE TELLE STRATEGIE PERMET DE REDUIRE LA SEVERITE DES EXACERBATIONS ET LA CONSOMMATION DE MEDICAMENTS

3. IL EXISTE UN LIEN ENTRE L'EVOLUTION DES SYMPTOMES, LA RHEOLOGIE DE L'EXPECTORATION, ET LA FONCTION PULMONAIRE (MESURES REPETEES TOUS LES TROIS MOIS)

4. UNE TELLE STRATEGIE PERMET UNE AMELIORATION DE LA QUALITE DE VIE

Maladie chronique des voies respiratoires, rhéologie du mucus et exacerbations : un essai contrôlé randomisé chez les patients atteints de BPCO

Chronic airway disease, mucus rheology and exacerbations: a randomized controlled trial of COPD patients

COPD-CARhE

PROTOCOLE DE RECHERCHE INTERVENTIONNELLE

IMPLIQUANT LA PERSONNE HUMAINE

Catégorie 1

Version 5 du 21 Avril 2021 – Soumission PHRC Inter-régional GIRCI SOHO 2018

UF7774

Investigateur coordonnateur :

Dr Jeremy CHARRIOT

Chef de clinique en pneumologie, Département de Maladies Respiratoires

Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **2**
1. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE **3**
1.1 ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES 3
1.1.1. Introduction générale sur la BPCO *3*
1.1.2. Expectoration chronique *4*
1.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE ET RESULTATS ATTENDUS 5
1.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES 5
1.4. RAPPORT BENEFICE / RISQUE 5
1.5. RETOMBEES ATTENDUES 6
2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE **6**
2.1. OBJECTIF PRINCIPAL 6
2.2. OBJECTIFS SECONDAIRES 6
3. CRITERES DE JUGEMENT **6**
3.1. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL 6
3.2. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES 7
4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE **8**
4.1. SCHEMA DE LA RECHERCHE 8
4.2. METHODES POUR LA RANDOMISATION ET L'AVEUGLE 10
5. POPULATION ET CRITERES D'ELIGIBILITE **11**
5.1. CADRE GENERAL ET POPULATION 11
5.2. CRITERES D'INCLUSION 12
5.3. CRITERES DE NON INCLUSION 12
5.4. CRITERES DE SORTIE D'ETUDE 12
5.5. FAISABILITE ET MODALITES DE RECRUTEMENT 13
6. INTERVENTIONS **13**
6.1. INTERVENTIONS 13
6.1.1. L'intervention expérimentale *13*
6.1.2. L'intervention comparateur *14*
6.1.3. Le médicament : azithromycine *14*
6.2. HTTP://BASE-DONNEES-PUBLIQUE.MEDICAMENTS.GOUV.FR/CIRCUIT DU MATERIEL POUR LA RHEOLOGIE 14
7. TRAITEMENTS ET PROCEDURES ASSOCIE(E)S **15**
7.1. TRAITEMENTS/PROCEDURES ASSOCIE(E)S AUTORISE(E)S 15
7.2. TRAITEMENTS/PROCEDURES ASSOCIE(E)S INTERDIT(E)S 15
8. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE **15**
8.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE 15
8.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT 16
8.3. PRISE EN CHARGE D'UNE EXACERBATION DE BPCO: 17
9. ASPECTS STATISTIQUES **17**
9.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE 17
9.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES 17
9.3. ANALYSE DE LA SECURITE 18
10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **19**

Liste des abréviations

AECOPD : exacerbations aiguës de BPCO

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

CARhE : Chronic airway disease, mucus rheology and exacerbations

CASA-Q : Cough and Sputum Assessment Questionnaire

CAT : COPD Assessment Test

CCSP : Club Cell Secretory Protein

COPD : chronic obstructive pulmonary disease

CPP : Comité de Protection des personnes

CPT : Capacité pulmonaire totale

CRF : Capacité résiduelle fonctionnelle

CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse Events

CVF : Capacité vitale forcée

ECG : électrocardiogramme

eCRF : electronic Case Report Form

EIG : Effet Indésirable Grave

EIGI : Effet Indésirable Grave Inattendu

EMA : European Medicines Agency

EQ-5D-DL : The Euroqol 5 level questionnaire (https://euroqol.org/eq-5d-instruments/eq-5d-5l-about/)

ET : écart-type

EvI : Evènement Indésirable

EvIG : Evènement Indésirable Grave

FDA : Food and Drug Administration

ICMJE : International Committee of Medical Journal Editors

ICS : inhaled corticosteroids

IMG : interruption médicale de grossesse

IVG : interruption volontaire de grossesse

LABA : long acting β2 agonist

OCS : oral corticosteroids

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SABA : short acting β2 agonist

SF-36 : the 36 item short form questionnaire (https://www.rand.org/health/surveys_tools/mos/36-item-short-form.html)

SGRQ : St George Respiratory Questionnaire

SNOT-22 : 22 item Sino Nasal Outcome Test

SUSAR : Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction

TRC : Technicien de Recherche Clinique

URCE : Unité de Recherche Clinique & Epidémiologie, CHU Montpellier

VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde

VR : Volume résiduel

1. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE

1.1 ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

1.1.1. INTRODUCTION GENERALE SUR LA BPCO

La broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie chronique dévastatrice et actuellement irréversible qui affecte environ 10 à 13% de la population européenne (Adeloye et al. 2015 ; Terzikhan et al. 2016). Sa prévalence et son incidence sont en augmentation (Adeloye et al.

2015; Burgel et al. 2018). En France, les admissions à l'hôpital pour exacerbations aiguës de BPCO (AECOPD) ont augmenté de 15,48% entre 2007 et 2012, et celles en Unité de Soins Intensifs de 41,78% (Molinari et al. 2016). À noter que le pourcentage de femmes atteintes est en forte augmentation (Burgel et al. 2018; Molinari et al. 2016; Terzikhan et al. 2016).

La BPCO n'est pas un événement stochastique, mais le résultat d'un déclin pulmonaire progressif. La fonction pulmonaire de base, notamment celle évaluée pendant la jeunesse, est par conséquent un déterminant particulièrement fort (Lytras et al. 2018) de cette maladie. Au-delà de la sensibilité innée de chacun envers le tabac, ce dernier reste le principal facteur causal de la BPCO. Cependant, certaines expositions professionnelles (p.ex. poussières biologiques, fumées, pesticides) ou environnementales (ex. milieu urbain versus rural, pollution automobile / industrielle) sont désormais davantage reconnues en tant que facteurs de risque à part entière de développer une BPCO (Adeloye et al. 2015; Lytras et al. 2018). La BPCO est classiquement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (Terzikhan et al. 2016), mais les récentes études épidémiologiques suggèrent que les femmes les plus susceptibles de développer cette maladie sont celles exposées professionnellement ou de par leur environnement (Schikowski et al. 2014 ; Svanes et al. 2018). Dans l'étude de Rotterdam, la proportion de femmes non fumeuses ayant une BPCO était de 27,2%, contre seulement 7,3% chez les hommes (Terzikhan et al. 2016).

En France, plus de 8% des patients hospitalisés pour une AECOPD décèdent durant leur séjour. La durée médiane de ces séjours peut atteindre un maximum de 14 jours, selon la sévérité de base de la maladie (Molinari et al. 2015). Des variations saisonnières significatives sont aussi objectivées avec des taux de mortalité s'élevant à 24% pour les patients admis en soins intensifs durant la période automno-hivernale, observation probablement liée à la recrudescence des infections virales (grippe, rhinovirus, VRS, etc…) durant ces saisons (Molinari et al. 2015).

Entre 2007 et 2012 en France, le coût total des hospitalisations pour AECOPD est passé de 602 à 678 millions d'euros (soit une hausse de + 12,6%), malgré la baisse de l'enveloppe de remboursement allouée par l'Etat français. Le coût moyen d'un séjour hospitalier pour AECOPD en 2012 a varié entre 3632 € et 9243 €, selon la sévérité de la maladie (Molinari et al. 2016).

1.1.2. EXPECTORATION CHRONIQUE

Schématiquement, la toux chronique, les expectorations et la dyspnée caractérisent cliniquement la BPCO. Les expectorations sont classiquement attribuées à une production excessive de mucus dans le tractus respiratoire. Celle-ci est la conséquence d'une modification de l'épithélium des voies aériennes, à savoir notamment une hyperplasie des cellules caliciformes productrices de mucus (Hogg et al. 2004). On estime même aujourd'hui que cette hyperproduction de mucus joue un rôle majeur dans l'obstruction des voies aériennes distales (bronchioles), obstruction qui se compliquera d'une destruction alvéolaire, l'emphysème (McDonough et al. 2011). Si la production de mucus est classique dans les exacerbations, ce symptôme persiste sous la forme chronique (la bronchite chronique est définie par la présence de toux et d'expectorations durant 3 mois consécutifs pendant deux années au moins) chez un peu plus de la moitié des patients, avec une signification plutôt péjorative même si ce point reste controversé (Lahousse et al. 2017; Kim and Criner 2013). Cet excès de mucus est responsable d'une expectoration chronique qui constitue une dimension considérable du fardeau porté par les patients dans cette maladie. Or, en ce moment, en France, il n'existe pas de traitement remboursé par l'assurance maladie ciblant spécifiquement ce symptôme, par manque de preuve ou d'efficacité le plus souvent.

Depuis longtemps (cf Anthonisen et al. 1987), plusieurs éléments sont analysés dans une expectoration pour déterminer le caractère stable ou « en exacerbation » de la BPCO, dont son volume, sa couleur, sa purulence par exemple. De multiples composants varient dans cette expectoration, indépendamment de la qualité intrinsèque du mucus (Kesimer et al. 2017) produit par l'épithélium : germes, débris cellulaires épithéliaux, polynucléaires et autres cellules inflammatoires. Ces modifications sont susceptibles de moduler la rhéologie du mucus (Fahy and Dickey 2010).

Le mucus est un composant viscoélastique complexe constitué essentiellement d'eau, d'ions, et de protéines dont certaines, les mucines (MUC5AC et MUC5B étant les plus représentées), peuvent moduler les propriétés biologiques et biophysiques du mucus.

L'hyperplasie et la métaplasie des cellules caliciformes seraient donc le *primum movens* de l'expectoration chronique (Saetta et al. 2000). Celles-ci s'expliquent en partie par une production accrue de certaines cytokines (IL4/IL13, etc…) et médiateurs d'origine épithélial ou systémique (Boucherat et al. 2013). De manière intéressante, il a récemment été démontré que l'azithromycine pouvait diminuer le chimiotactisme des neutrophiles dans les voies respiratoires basses (O'Reilly et al. 2013), améliorer la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires (Hodge et al. 2008) et réduire certains marqueurs de l'inflammation systémique. Mais de manière tout aussi convaincante, il a été démontré que l'azithromycine pouvait inhiber l'hypersécrétion de mucus par les cellules épithéliales des voies aériennes (Shimizu and Shimizu 2012), ce qui pourrait expliquer que ce macrolide engendre une diminution des exacerbations. En effet, en clinique, l'utilisation d'azithromycine au long cours à posologie réduite (250 mg/j ou 500 mg 3 fois par semaine) permet une réduction significative de la fréquence des exacerbations, respectivement de 27% et 42% dans deux larges essais contrôlés randomisés en double aveugle contre placebo (Albert et al. 2011). Par conséquent l'azithromycine est désormais proposée dans les recommandations internationales et françaises comme un outil thérapeutique de la prévention des exacerbations, en complément de la prise en charge standard optimale (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2019, M. Zysman et al. Société Pneumologique de Langue Française (SPLF) 2016). Toutefois le lien physiopathologique entre l'administration d'azithromycine et la réduction des exacerbations de BPCO n'est pas établi. Cependant, comme les macrolides sont pourvoyeurs d'effets indésirables peu fréquents mais significatifs (e.g. des surdités ; troubles de la conduction cardiaque) et peuvent accentuer les résistances microbiennes, les prescriptions de ce type de molécule doivent être correctement ciblées.

1.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE ET RESULTATS ATTENDUS

Actuellement, l'azithromycine est une molécule importante de l'arsenal thérapeutique disponible dans la BPCO et reste régulièrement prescrite au cours d'une prise en charge standard (Uzun et al. 2014, GOLD 2019 COPD), bien que les sociétés savantes suggèrent que son initiation se fasse en secteur de soins spécialisé. Toutefois, la population de patients atteints de BPCO recevant de l'azithromycine (ou des macrolides en général) est mal définie et loin d'être spécifiquement « ciblée ». Nous émettons l'hypothèse que la sélection objective d'une sous-population de patients atteints de BPCO en fonction d'une rhéologie altérée ou non de leur mucus (donnée à présent facilement quantifiable en l'espace de quelques minutes), fournirait un algorithme thérapeutique plus efficace que la prise en charge standard actuelle.

1.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES

Afin de démontrer l'intérêt de guider la prescription médicamenteuse d'azithromycine en s'aidant d'un critère objectif, nous proposons une étude contrôlée randomisée en aveugle. L'aveugle sera en effet assuré car même si le clinicien aura connaissance de la prescription ou non d'azithromycine, il ne connaitra pas la raison de cette éventuelle prescription (guidée par les symptômes via le questionnaire CASA-Q ou guidée par la rhéologie du mucus, cf section randomisation 6.2).

1.4. RAPPORT BENEFICE / RISQUE

La prise en charge standard actuelle implique la prescription d'azithromycine selon un critère imprécis et subjectif : la sévérité des symptômes (dont la toux et l'expectoration) évaluée par le clinicien prenant en charge le patient (« bras comparateur standardisé »). En comparaison, dans le « bras expérimental » de notre étude, la prescription ou non d'azithromycine sera asservie à un critère

objectif et reproductible : la rhéologie de mucus. Dans les deux bras, les risques courus par les patients sont ceux :

- liés à la prise d'azithromycine, et
- liés à un suivi plus intense que la routine. Ce suivi comprend des évaluations de la fonction pulmonaire (pléthysmographie/spiromètrie) plus fréquemment que la prise en charge standard, ainsi que des questionnaires validés et des analyses sanguines.

1.5. RETOMBEES ATTENDUES

La toux et l'expectoration chronique sont des symptômes encore mal compris et particulièrement mal pris en charge actuellement. Tous les médicaments supposés « mucolytiques » ont perdu leur remboursement par manque d'efficacité, et on peut raisonnablement penser que ces symptômes, si invalidants soient-ils, doivent surtout être considérés comme des mécanismes d'adaptation potentiellement nécessaires et protecteurs. Cela reste débattu, la présence de bouchons muqueux dans les voies aériennes distales des patients souffrant de BPCO semblant être responsables de la progression de la maladie. Moduler finement cette caractéristique de manière supervisée semble donc du plus grand intérêt. Ainsi, cette étude vise à améliorer les soins aux patients en ciblant de manière plus pertinente ceux susceptibles de bénéficier d'un traitement par macrolides. Cette personnalisation du traitement devrait réduire les taux d'exacerbation (et les symptômes en général) et l'utilisation subséquente des ressources de santé en comparaison avec la prise en charge standard. Inversement, une utilisation non-nécessaire des antibiotiques serait également évitée.

2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

2.1. OBJECTIF PRINCIPAL

L'objectif principal de cet essai est de comparer les taux d'exacerbation sur 12 mois de suivi entre un groupe de patients atteint de BPCO traité selon une prise en charge standardisée (azithromycine prescrite en cas d'expectorations sévères selon le score CASA-Q, bras comparateur standardisé) et un groupe similaire dans lequel l'azithromycine est prescrite en fonction de la rhéologie du mucus (bras expérimental).

2.2. OBJECTIFS SECONDAIRES

Les objectifs secondaires sont de comparer entre les 2 bras :

- les taux d'exacerbation selon leur sévérité (observées pendant toute la durée de l'étude) ;
- l'évolution des symptômes, de la rhéologie de l'expectoration, et de la fonction pulmonaire (mesures répétées tous les trois mois);
- la consommation de médicaments et les évènements indésirables (suivi pendant toute la durée de l'étude);
- les trajectoires de patients pendant le suivi ;
- l'amélioration clinique globale en fin d'étude et l'évolution de la qualité de vie (mesures répétées tous les 3 mois) ;
- l'évolution de biomarqueurs d'intérêt (état de base versus la fin de l'étude).

3. CRITERES DE JUGEMENT

3.1. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Le critère de jugement principal est le nombre d'exacerbations sur les 12 mois du suivi.

Une exacerbation est définie selon les recommandations françaises (Jouneau et al. 2017) comme un « événement aigu caractérisé par une aggravation des symptômes respiratoires (notamment la toux, l'expectoration et la dyspnée) au-delà des variations quotidiennes et conduisant à une modification thérapeutique : soit une simple augmentation de la prise des bronchodilatateurs (dans ce cas, une durée supérieure à 24 heures est requise pour parler d'exacerbation) soit l'ajout d'un traitement supplémentaire (antibiothérapie et/ou corticothérapie orale). »

3.2. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES

Seront recueillis pendant toute la durée de l'étude **le nombre d'exacerbations et leur sévérité** (définitions selon les recommandations françaises (Jouneau et al. 2017) :

- Légère (augmentation des symptômes contrôlée sans nouveau traitement),
- Modérée (requérant une antibiothérapie et/ou une corticothérapie),
- Sévère (nécessitant une hospitalisation).

L'évolution des symptômes sera évaluée tous les trois mois :

- échelles visuelles analogiques pour évaluer la dyspnée, la toux et la production d'expectorations ;
- questionnaires validés : CAT, SNOT22, CASA-Q

La rhéologie de l'expectoration sera mesurée via le dispositif Rheomuco par une personne désignée (non-impliquée dans l'étude pour préserver l'aveugle) tous les trois mois. Les valeurs suivantes seront recueillies :

- module d'élasticité du mucus (G'),
- le module visqueux (G''),
- le rapport G''/G',
- la contrainte critique τc.

En complément à la rhéologie, les données bactériologiques de l'expectoration seront recueillies lorsque réalisées en routine.

La fonction pulmonaire sera évaluée tous les trois mois par spirométrie. Les mesures pré- et post-bronchodilatateurs suivantes seront recueillies. Une plethysmographie sera réalisée à l'inclusion à M0 et en fin d'étude à M12 :

- Volume expiratoire maximal par seconde (VEMS ; litres et valeur prédite),
- Capacité vitale forcée (FVC ; litres et valeur prédite),
- L'indice de Tiffeneau (VEMS/FVC ; %),
- Volume résiduel (VR ; litres et valeur prédite),
- Capacité résiduelle fonctionnelle (CRF ; litres et valeur prédite)
- Capacité pulmonaire totale (CPT ; litres et valeur prédite),
- VR/CPT (%)

La consommation de médicaments sera recueillie via un journal patient pendant toute la durée de l'étude. Une attention particulière sera portée sur les médicaments spécifiques de la BPCO (SABA, LABA, ICS, OCS, azithromycine, autres antibiotiques).

La sécurité des patients sera assurée via un recueil des **évènements indésirables** pendant toute la durée de l'étude (voir section 11).

Les **trajectoires des patients** seront tracées pendant toute la durée de l'étude sur le journal patient. Il s'agit de recueillir les épisodes d'exacerbation et/ou les hospitalisations, ainsi que les symptômes/traitements associés. Ces données fourniront les données suivantes :

- Le nombre de jours cumulés avec symptômes et/ou exacerbation et/ou hospitalisation.
- Le nombre de jours en vie et sans symptômes et/ou exacerbations et/ou hospitalisations.

L'amélioration clinique est cotée via un système de points de 0 à 3 en fin d'étude. Les points sont ajoutés comme suit :

- +1 point : pas plus d'une exacerbation sans hospitalisation pendant les 52 semaines de suivi ;
- +1 point : gain >100mL du VEMS pré-bronchodilatateurs à la 52e semaine par rapport à l'état de base ;
- +1 point : variation du score CAT au cours des 52 semaines d'observation > 2.

L'état de santé général et la qualité de vie liée à la santé seront quantifiés tous les trois mois via les questionnaires validés suivants :

- SF-36,
- EQ-5D-5L,
- St-George's Respiratory Questionnaire.

Les biomarqueurs d'intérêt seront évalués à l'état de base et en fin d'étude. Il s'agit de :

- Numération sanguine complète, y compris neutrophilie, éosinophilie,
- *Serum Club cell secretory protein* (CCSP ; ng/ml).
- Bactériologie dans l'expectoration

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

4.1. SCHEMA DE LA RECHERCHE

Il s'agit d'un essai thérapeutique randomisé, en 2 groupes parallèles (36 vs 36) comparant un groupe de patients traités selon une prise en charge standardisée (prescription d'azithromycine lorsque l'expectoration est particulièrement abondante et/ou gênante selon le patient (CASA-Q sputum symptoms score < 70)) versus un groupe similaire de patients dans lequel la prescription d'azithromycine est asservie à la rhéologie du mucus (si τc > 39) (voir Figure 6-1). Les seuils choisis de 70 pour le CASA-Q et de 39 pour le τc correspondent aux médianes attendues de ces variables dans notre population d'intérêt. Nous aurons ainsi des effectifs équilibrés dans les deux bras en termes de nombre de sujets traités.

NB :

- Le CASA-Q est un questionnaire validé en français permettant de coter la toux et les expectorations ainsi que leurs impacts respectifs sur la qualité de vie. Son utilisation permettra ainsi une homogénéisation entre les différents centres du « best standard of care » actuel dans la BPCO. En effet, selon les recommandations nationales (SPLF) et internationales (GOLD COPD) en vigueur, la prescription d'azithromycine est conditionnée à la libre appréciation subjective, par le spécialiste, du caractère invalidant des symptômes respiratoires, dont la toux et les expectorations. Ces symptômes seront ici évalués par le CASA-Q (Monz et al. 2010; Crawford et al. 2008; Monz et al. 2010; Deslee et al. 2016; Tagaya et al. 2016).
- Pour la variable « contrainte critique τc » le seuil de 39 a été déterminé grâce à une étude ancillaire préalablement réalisée par notre équipe («Biological Determinants of Sputum

Rheology in Chronic Airway Diseases » ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04081740), ayant inclus 48 patients dont 14 BPCO.

--INCLUSION--

Les patients sont d'abord examinés au cours d'une visite de routine. Après un premier contrôle d'éligibilité et le recueil de l'intérêt pour l'étude exprimé par le patient, une visite d'inclusion spécifique est mise en œuvre.

L'investigateur recueille le consentement libre, éclairé et écrit du participant avant la réalisation de tout examen clinique ou paraclinique nécessité par la recherche. Un ECG, un audiogramme et une pléthysmographie avec spirométrie sont effectués. Un échantillon de mucus est recueilli afin d'évaluer le volume et la rhéologie. L'éligibilité est confirmée (sinon sortie d'étude, screen failure). La fiche de fin d'essai sera complétée pour tout patient sorti de l'étude.

--RUN-IN--

Les patients sont surveillés pendant 2 semaines. S'ils sont instables malgré la prise de leur traitement d'entretien recommandé, ou non-observants, ils sont sortis de l'étude.

--RANDOMISATION (J0)--

Après un run-in réussi, les patients sont randomisés. Le module de randomisation (inclus dans l'eCRF), applique une stratification sur le centre, ainsi qu'un algorithme de prescription propre à chaque bras. Les prescriptions ou non d'azithromycine, seront ainsi réalisées selon la sévérité des symptômes liés aux expectorations dans le bras comparateur standardisé, et selon une altération de la rhéologie du mucus dans le bras expérimental.

--SUIVI--

Les patients sont réévalués tous les 3 mois pendant 1 an. La fonction pulmonaire (spirométrie), les analyses de l'expectoration, les questionnaires et les événements indésirables sont évalués à chaque visite. Les analyses sanguines (hémogramme et CCSP) et la pléthysmographie sont effectuées en début d'étude et à 52 semaines. Les symptômes et les exacerbations font l'objet d'un suivi spécifique via un journal patient, de même que la consommation de médicaments et/ou de ressources de santé.

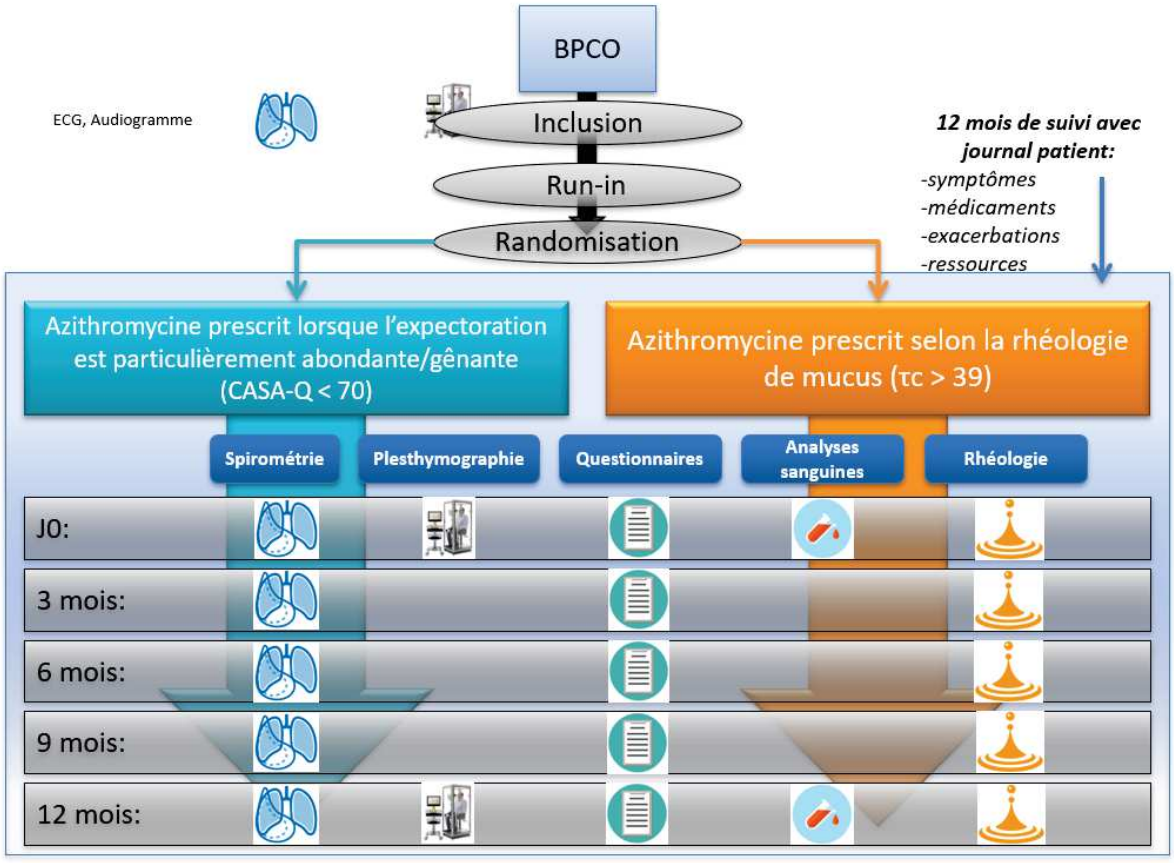


Figure 6-1 Schéma général de l'étude

4.2. METHODES POUR LA RANDOMISATION ET L'AVEUGLE

Afin d'optimiser la comparabilité des groupes, une randomisation par bloc de taille aléatoire sera utilisée pour affecter les patients dans les groupes de traitement en utilisant un ratio d'allocation 1 : 1. Du fait de la taille de l'échantillon, la stratification ne sera faite que sur le centre. Les autres variables d'intérêt (e.g. le nombre d'exacerbations dans les 12 mois avant l'inclusion, le sexe, le traitement de fond, la présence d'un reflux gastrique, etc), serviront de variable d'ajustement dans l'analyse statistique.

Compte tenu de la portée de cette première étude dans le domaine, un niveau d'aveugle impliquant un placebo ne serait pas adapté et ferait largement dépasser le budget alloué. Néanmoins, en assurant l'aveugle des résultats de rhéologie du mucus et du CASA-Q pendant toute la durée de l'étude, l'aveugle permis par la randomisation est assuré, au moins en début d'étude (un investigateur/patient pourrait éventuellement deviner le bras de l'étude du fait des changements de prescription d'azithromycine et des symptômes pendant le suivi). Une question de type « deviner le bras » sera posée aux investigateurs et aux patients en fin d'étude pour évaluer le niveau de l'aveugle.

Les données nécessaires à l'état de base, à savoir la rhéologie du mucus et les réponses au CASA-Q, sont rapidement entrées dans l'eCRF par le personnel désigné dans chaque centre participant, car ces données conditionnent l'allocation du traitement.

Pour maintenir l'aveugle, les éléments suivants sont mis en œuvre :

- Les mesures et les données relatives à la rhéologie du mucus sont gérées par des personnes désignées dans chaque centre et par ailleurs non impliquées dans la suite de l'essai.
- Les patients doivent remplir seuls les questionnaires CASA-Q et placer le CASA-Q dans une enveloppe scellée. Les personnes désignées dans chaque centre et par ailleurs non impliquées dans la suite de l'essai assureront la saisie de ces données dans le CRF.
- Les champs du eCRF correspondant aux mesures de rhéologie du mucus et les réponses au CASA-Q ne sont disponibles que pour les personnes désignées dans chaque centre et par ailleurs non impliquées dans la suite de l'essai.
- Le scoring du CASA-Q sera effectué automatiquement dans l'eCRF et non disponible pendant l'étude.

Une application Web au sein de l'eCRF (ENNOV Clinical) sera créée pour les besoins de l'étude et assurera la randomisation des patients. La création d'eCRF, la séquence et les modules d'allocation seront supervisés par le Département de Recherche Clinique et d'Epidémiologie du CHU Montpellier.

En sus de la randomisation, l'eCRF sera également paramétré pour appliquer de manière automatique l'algorithme de traitement propre à chaque bras de l'étude :

- dans le bras comparateur standardisé, l'azithromycine est prescrite ou non, en fonction des résultats du CASA-Q,
- et dans le bras expérimental, l'azithromycine est prescrite ou non, en fonction des résultats de la rhéologie du mucus,

comme décrit dans le paragraphe 6 « interventions ».

La randomisation des patients sera effectuée par les investigateurs participants par le biais de modules spécifiques dans l'eCRF. La randomisation est effectuée après la saisie des données correspondant à la rhéologie du mucus et au questionnaire CASA-Q.

5. POPULATION ET CRITERES D'ELIGIBILITE

5.1. CADRE GENERAL ET POPULATION

Cette étude se déroule dans 3 centres situés dans le sud-ouest de la France (voir Figure 5-1). Tous les centres sont des hôpitaux universitaires financés par le gouvernement qui, grâce au système d'assurance maladie en vigueur en France, devraient inclure des patients couvrant un large éventail de catégories socio-économiques et urbaines-rurales. La population cible comporte des patients ayant une BPCO depuis au moins 1 an et qui, et en dépit d'un traitement optimal, font au moins trois exacerbations par an. Il s'agit de patients ayant une BPCO et exacerbateurs fréquents pour qui le recours à l'azithromycine s'inscrit dans le cadre de prescription évalué (Albert et al, NEJM 2011) et relaté dans les recommandations en vigueur, au regard du bénéfice potentiel de cet antibiotique et des risques liés à son utilisation au long cours



Figure 5-1 Localisation des centres participants

5.2. CRITERES D'INCLUSION

- Sujet dont l'âge est compris entre 40 et 85 ans inclus
- Formulaire de consentement éclairé écrit et signé
- Les sujets doivent être en mesure d'assister à toutes les visites prévues et de se conformer à toutes les procédures de l'essai
- Bénéficiaire du ou affilié au système de sécurité sociale français
- Patient ayant une BPCO, exacerbateur fréquent, pour qui le recours à l'azithromycine s'inscrit dans le cadre de prescription évalué (Albert et al, NEJM 2011) et relaté dans les recommandations en vigueur, au regard du bénéfice potentiel de cet antibiotique et des risques liés à son utilisation au long cours :
- . Homme ou femme avec BPCO depuis au moins 1 an défini selon les critères GOLD et validé par l'investigateur clinique
- . Traitement optimal selon les recommandations GOLD class de sévérité C ou D
- . ≥ 3 exacerbations au cours des 12 derniers mois
- Production spontanée ou induite d'expectoration
- ECG: QTc < 450 ms chez l'homme, QTC < 470 ms chez la femme
- Audiogramme normal

5.3. CRITERES DE NON INCLUSION

- Grossesse ou allaitement
- Les patients qui sont prisonniers ou sous d'autres formes de protection judiciaire
- Patients sous toute forme de tutelle/curatelle
- Participation en cours à un autre protocole interventionnel, ou au cours du mois précédant l'inclusion
  A reçu de l'azithromycine au cours des 3 mois précédents
- Patient dont le diagnostic principal est une dilatation des bronches sur la base d'une documentation tomodensitométrique
- Hypersensibilité connue à l'azithromycine, à l'érythromycine, à tout autre macrolide, au kétolide ou à l'un des excipients de la spécialité à base d'azithromycine utilisée
- Prise concomitante de médicament contre-indiqué avec l'azithromycine (dihydroergotamine, ergotamine, cisapride, colchicine)
- Autres maladies respiratoires ou infections pulmonaires associées
- Insuffisance hépatique sévère et cholestase sévère (un bilan biologique hépatique sera réalisé si suspicion clinique)
- Insuffisance rénale avec clairance de la créatinine < 40 mL/min
- Patients atteints d'hémopathies malignes ayant subi une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
  Patients présentant une intolérance au galactose, un déficit en lactase de Lapp ou un syndrome de malabsorption du glucose ou du galactose (maladie héréditaire rare) en raison de la présence de lactose dans la spécialité Zithromax.

5.4. CRITERES DE SORTIE D'ETUDE

Les évènements suivants pendant la période de run-in auront pour résultat une sortie d'étude :

- prise d'antibiotiques,
- prise de corticostéroïdes systémiques,
- exacerbation modérée ou sévère (cf. 3.1 pour les définitions),
- hospitalisation,

- visite non-programmée pour troubles respiratoires,
- non-observance du traitement.

5.5. FAISABILITE ET MODALITES DE RECRUTEMENT

Les patient(e)s seront screené(e)s lors des consultations de routine dans chaque centre investigateur. La BPCO est une maladie chronique qui affecte une fraction tangible de la population, et les possibilités de recrutement sont nombreuses (voir tableau ci-dessous).

Centre recruteur	Estimation du nombre de patients éligibles
Bordeaux	~20 par mois
Montpellier	~30 par mois
Toulouse	~30 par mois

Le nombre de recrutements potentiels par mois et par centre est largement suffisant pour subvenir aux besoins de la présente étude. Néanmoins, pour prendre en compte les différences de temps administratifs pouvant affecter le recrutement (par exemple, en France, les formalités contractuelles au sein de chaque centre peuvent entraîner des dates de mise-en-place disparates par rapport au début de la période d'inclusion), la saisonnalité (le potentiel de recrutement est susceptible d'être plus intense pendant la période automno-hivernale), et pour rendre la courbe d'inclusion aussi souple et réalisable que possible et disposer de suffisamment de temps pour recueillir des données de haute qualité, nous proposons un taux d'inclusion moyen de 2 patients par mois et par centre.

6. INTERVENTIONS

6.1. INTERVENTIONS

Cette étude implique la comparaison de deux bras constitués via une procédure de randomisation. Chaque bras représente une stratégie différente pour la prescription ou non d'azithromycine.

6.1.1. L'INTERVENTION EXPERIMENTALE

Les patients randomisés dans le « bras expérimental » bénéficieront du traitement de fond optimal de la BPCO selon les recommandations nationales (SPLF) et internationales (GOLD) en vigueur, sauf en ce qui concerne la prescription d'azithromycine qui sera asservie à la rhéologie du mucus.

La rhéologie du mucus sera quantifiée tous les 3 mois en utilisant le dispositif Rheomuco.

- Si le patient a une expectoration spontanée ou induite, et que cette expectoration a une contrainte critique $\tau c > 39$ (cf. 4.1 pour le rationnel), une prescription pour 3 mois de traitement par azithromycine sera initiée. Cette prescription pourra être renouvelée tous les 3 mois pendant les 12 mois de suivi prévus dans cette étude.
- En l'absence d'expectoration, l'azithromycine ne sera pas prescrite.

Le dispositif « Rheomuco »

Rheomuco est un rhéomètre de paillasse (dispositif médical de diagnostic in vitro disposant d'un marquage CE), dédié à l'étude des propriétés viscoélastiques du mucus broncho-pulmonaire. Simple d'utilisation, il permet une analyse rhéologique d'un échantillon en moins de 15 minutes, et une lecture directe du résultat n'exigeant aucune compétence en rhéologie.

En l'espace d'une dizaine de minutes, le dispositif Rheomuco fournit des mesures rhéologiques du mucus précises et reproductibles (NCT02682290) : le module d'élasticité du mucus (G '), le module visqueux (G''), leur rapport G''/G', et d'autres paramètres, notamment le tau-c (τc : la contrainte critique nécessaire pour déplacer un fluide), particulièrement discriminant dans la BPCO qui diffèrent clairement entre donneurs sains et patients atteints de BPCO (Patarin et al. 2017).

Son utilisation est simple : pendant la visite, il est demandé au patient d'expectorer dans un récipient dédié. L'expectoration est homogénéisée selon les instructions du fabricant et introduite dans le rhéomètre de paillasse « Rheomuco ». Suite à une analyse automatisée, les données rhéologiques sont fournies par la machine.

Dans le cadre de notre projet de recherche, les dispositifs Rheomuco, ainsi que les consommables associés, sont fournis gracieusement par le fabricant Rheonova.

6.1.2. L'INTERVENTION COMPARATEUR

Les patients randomisés dans le « bras standardisé comparateur » bénéficieront du traitement de fond optimal de la BPCO selon les recommandations nationales (SPLF) et internationales (GOLD) en vigueur, y compris en ce qui concerne la prescription d'azithromycine en cas d'expectorations sévères (ici définies par un score CASA-Q sputum symptoms < 70 pour homogénéiser les pratiques entre les centres) (cf. 4.1 pour le rationnel).

Le CASA-Q sera coté tous les 3 mois.

- Si le patient présente un score de sputum symptoms < 70, une prescription pour 3 mois de traitement par azithromycine sera réalisée. Cette prescription peut être renouvelée tous les 3 mois pendant les 12 mois de suivi prévus dans cette étude, si le patient continue d'obtenir un score de sputum symptoms < 70.
- Si le patient présente un score de sputum symptoms > 70, la prise en charge n'est pas modifiée.

6.1.3. LE MEDICAMENT : AZITHROMYCINE

La prescription d'azithromycine est standardisée dans les deux bras : 500 mg soit (250 mgx2/j) 3 jours par semaine pour trois mois, avec renouvellement possible pendant les 12 mois de suivi prévus par l'étude. Les comprimés de Zithromax pourront être pris pendant ou en dehors des repas.
Dans la mesure où l'information contenue dans les autorisations de mise sur le marché est susceptible d'évoluer, il convient de s'assurer au moment de la prescription des médicaments du respect notamment des contre-indications, mises en garde et précautions d'emploi, interactions médicamenteuses. Se référer à l'information disponible sur la Base de Données Publique des médicaments, accessible par internet à l'adresse suivante :

6.2. HTTP://BASE-DONNEES-PUBLIQUE.MEDICAMENTS.GOUV.FR/CIRCUIT DU MATERIEL POUR LA RHEOLOGIE

Le représentant de Rhéonova sera en charge de fournir gracieusement le matériel et les consommables nécessaires à l'obtention des données rhéologiques dans chaque centre (machine « Rhéomuco » et consommables associés).

7. TRAITEMENTS ET PROCEDURES ASSOCIE(E)S

7.1. TRAITEMENTS/PROCEDURES ASSOCIE(E)S AUTORISE(E)S

En dehors de la prescription d'azithromycine, la prise en charge des patients est décidée par l'investigateur selon les pratiques usuelles. Les recommandations émises par la Société de pneumologie de langue française (SPLF) seront respectées (Jouneau et al. 2017).

7.2. TRAITEMENTS/PROCEDURES ASSOCIE(E)S INTERDIT(E)S

Les macrolides autres que l'azithromycine sont interdits. Leur utilisation doit être signalée à l'investigateur coordinateur de l'étude, ainsi que méticuleusement documentée et justifiée. Leur utilisation ne donne pas pour résultat l'exclusion du patient, qui sera suivi per-protocole (analyse en intention de traiter). Si la prise en charge d'une infection du patient nécessite un traitement par un autre macrolide, la question du maintien du traitement par azithromycine pendant l'épisode doit être posée. Il est attendu que le recours potentiel à une co-prescription de l'azithromycine avec un autre macrolide soit dument pesé au regard du bon usage des antibiotiques et compte tenu du profil de sécurité d'emploi des macrolides dans l'intérêt d'une prise en charge adaptée du patient considérant les recommandations thérapeutiques en vigueur. Si une telle association est envisagée, ~~Leur utilisation~~ celle-ci doit être signalée à l'investigateur coordinateur de l'étude, ainsi ~~que~~ qu'être méticuleusement documentée et justifiée.

La liste des médicaments interagissant avec l'azithromycine est disponible dans le Thésaurus des Interactions médicamenteuses de l'ANSM , accessible à l'adresse vuivante : www.ansm.fr
Les associations de l'azithromycine avec la colchicine, les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine et dihydroergotamine) sont contre-indiquées, avec les alcaloïdes de l'ergot de seigle dopaminergiques (bromocriptine, cabergoline, lisuride, pergolide) sont déconseillées, et avec les

substances susceptibles de donner des torsades de pointes font l'objet de précautions d'emploi.

8. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

8.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE

- Durée des démarches réglementaires : 6-9 mois
- Durée de la période d'inclusion : 24 mois
- Durée de participation de chaque participant : 12 mois
- Analyse statistique, rédaction du rapport final : 12 mois
- Durée prévisionnelle de l'étude (inclusion et suivi) :36 mois
- Durée prévisionnelle totale de l'étude : 48 mois

8.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT

	Pré inclusion pendant une visite de routine	Inclusion	Période de Run-in	Visites de suivi				
	Vpré	Vinc*	RI	V0	V3M	V6M	V9M	V12M
	J-60 à j-28	J-30 à J-15	Au moins 15j	J0	3M ± 7j	6M ± 7j	9M ± 7j	12M ± 7j
Eligibilité / Inclusion								
Vérification des critères d'éligibilité	✓	✓						
Lettre d'information	✓							
ECG		✓						
Audiogramme		✓						
Recueil du consentement		✓						
Test de grossesse (Dosage β hcg)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Vérification que l'état du patient reste stable sous traitement de fond optimal			✓					
Interventions expérimentales								
Randomisation [A]				✓				
Gestion de la maladie « standard » ou en fonction de la rhéologie du mucus [A]						✓		
Evaluations								
Recueil de données via le journal-patient : symptômes, exacerbations, consommation de médicaments ressources					✓			
Pléthysmographie*		✓		✓				✓
Spirométrie*		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Questionnaires*				✓	✓	✓	✓	✓
Analyses sanguines : NFS, CCSP*				✓				✓
*Analyses du mucus : rhéologie A,M et contenu (dont bactériologie)		✓		✓	✓	✓	✓	✓
Evénements indésirables			✓			✓		

*Elément propre à la recherche et ne faisant pas partie de la prise-en-charge habituelle / Pour les questionnaires : CASA-Q, CAT, SNOT, St-Georges Respiratory Questionnaire, SF-36, EQ-5D-5L.

[A] En aveugle

[M] Fourni par le fabricant

8.3. PRISE EN CHARGE D'UNE EXACERBATION DE BPCO:

- Le patient est infomé en début d'étude qu'il doit présenter son carnet patient à tout professionnel de santé qu'il peut être amené à rencontrer, afin d'informer ce dernier de sa participation au protocole COPD CaRhe, et ce d'autant plus que le professionnel de santé n'est pas un investigateur de l'étude (que ce soit dans le cadre de la prise en charge de sa BPCO ou pour tout autre motif).
- En cas de survenue d'une exacerbation de BPCO, celle-ci sera prise en charge conformément aux recommandations de la société de pneumologie de langue française (Jouneau et al. 2017, document joint). Le médecin investigateur est la personne principale à contacter en cas de modifications des symptômes et a fortiori d'exacerbation. De plus, si une antibiothérapie est indiquée pour traiter cette exacerbation, le traitement par azithromycine sera suspendu le cas échéant pendant toute la durée de cette dernière. Dans la mesure du possible, une antibiothérapie ne contenant pas de macrolides sera privilégiée. Si une bi-thérapie intraveineuse incluant une bêta-lactamine de large spectre est nécessaire, par ex. en cas de documentation d'un P. Aeruginosa, une fluoroquinolone sera prioritairement co-prescrite en l'absence de contre-indication et non pas un macrolide.
- Si le patients ne contactait pas en première intention un médecin investigateur de l'étude (par ex. consultation du médecin traitant) n cas d'exacerbation, cela serait noté lors de la visite d'étude et constituerait une déviation au protocole si ce médecin modifie le traitement en cours, notamment l'antibiothérapie. Au décours d'une exacerbation, et s'il le juge nécessaire, le médecin investigateur en charge du patient peut décider de réaliser une consultation ou téléconsultation afin de vérifier notamment la bonne évolution de l'état de santé du patient, et ce en dehors des visites prédéterminées dans le cadre du protocole. Le patient poursuivra ensuite normalement le protocole en assistant aux visites prédéterminées.

9. ASPECTS STATISTIQUES

9.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE

Dans le bras standardisé comparateur, nous attendons un taux d'exacerbation de 3.59/an (Wedzicha et al. 2016). Le choix de l'écart-type est le plus conservateur chez les GOLD classes C-D, soit ET=2.5 (Han et al. 2013). Afin de détecter une réduction de 50% (réduction d'intérêt pour cette première étude du genre) du taux d'exacerbation dans le bras expérimental avec un risque de première espèce bilatéral de 0.05 et une puissance 1-beta=0.80, un total de 62 patients est requis (31 par groupe). Prenant en compte une perte de données de 10% (screen failure et sortis d'étude), nous proposons d'inclure dans cette étude un total de 72 patients (36 dans chaque bras).

9.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES

Une première analyse des données permettra la description de la population totale et par groupe. La normalité de la distribution des variables quantitatives sera explorée à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilks. Les résultats statistiques seront présentés sous forme de moyennes ± écarts-types pour les variables quantitatives dont la distribution est gaussienne et médianes et intervalles interquartiles pour les autres variables. Pour les variables qualitatives, les effectifs et les pourcentages associés seront présentés. Les variables qualitatives seront comparées entre les groupes par un test du χ^2. A défaut, si les conditions de réalisation de ce test ne sont pas respectées, le test exact de Fisher sera utilisé. Les variables quantitatives seront comparées entre les groupes : en cas de variables gaussiennes, par des tests paramétriques, en cas de variables non-gaussiennes, par des tests non paramétriques.

L'analyse statistique du critère de jugement principal (taux d'exacerbation sur 12 mois) sera réalisée sur la population en intention de traiter. Le critère de jugement principal sera comparé entre les 2 groupes par un test de comparaison de moyenne pour données indépendantes. Un modèle de régression ajusté sur les variables cliniquement importantes ou ayant une distribution différentes entre les deux groupes sera ajusté avec une procédure de sélection de modèle (*forward*).

Pour l'analyse des critères secondaires, un plan d'analyses statistique (PAS) complet sera établi avant le gel de la base. Ces analyses comprendront entre autre, des modélisations par des modèles mixtes pour les données répétées dans le suivi, l'estimation de courbes ROC pour l'analyse des biomarqueurs, et la construction de cluster de trajectoires (package 'traj', Leffondree et al. 2004).

Le taux de données manquantes attendu est faible. Il n'est pas prévu d'employer de méthode d'imputation. Les analyses seront conduites sur cas complets.

L'analyse statistique sera conduite par le DIM du CHU de Montpellier sous SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) version 9 ou R 3.1.1 (ou plus récent) (R Core Team 2016).

9.3. ANALYSE DE LA SECURITE

Les évènements indésirables seront compilés et présentés par groupe et pour chaque période indiquée (nombre cumulatif d'événements). Ils seront classés en fonction de la gravité : grade 1 (léger), grade 2 (modéré), grade 3 (sévère), grade 4 (menace pour la vie) et grade 5 (décès ; CTCAE).

Des tests de χ^2 non ajustés ou des tests de probabilité exacts de Fisher seront utilisés pour comparer les bras de traitement.

10. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adeloye, Davies, Stephen Chua, Chinwei Lee, Catriona Basquill, Angeliki Papana, Evropi Theodoratou, Harish Nair, et al. 2015. "Global and Regional Estimates of COPD Prevalence: Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Global Health* 5 (2): 020415. https://doi.org/10.7189/jogh.05-020415.

Albert, Richard K., John Connett, William C. Bailey, Richard Casaburi, J. Allen D. Cooper, Gerard J. Criner, Jeffrey L. Curtis, et al. 2011. "Azithromycin for Prevention of Exacerbations of COPD." *The New England Journal of Medicine* 365 (8): 689–98. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104623.

Anthonisen, N. R., J. Manfreda, C. P. Warren, E. S. Hershfield, G. K. Harding, and N. A. Nelson. 1987. "Antibiotic Therapy in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Annals of Internal Medicine* 106 (2): 196–204.

Boucherat, Olivier, Jorge Boczkowski, Lucie Jeannotte, and Christophe Delacourt. 2013. "Cellular and Molecular Mechanisms of Goblet Cell Metaplasia in the Respiratory Airways." *Experimental Lung Research* 39 (4–5): 207–16. https://doi.org/10.3109/01902148.2013.791733.

Burgel, Pierre-Régis, Caroline Laurendeau, Chantal Raherison, Claire Fuhrman, and Nicolas Roche. 2018. "An Attempt at Modeling COPD Epidemiological Trends in France." *Respiratory Research* 19 (1): 130. https://doi.org/10.1186/s12931-018-0827-7.

Crawford, Bruce, Brigitta Monz, Jens Hohlfeld, Nicolas Roche, Bruce Rubin, Helgo Magnussen, Chad Nivens, Mo Ghafouri, Jeff McDonald, and Kay Tetzlaff. 2008. "Development and Validation of a Cough and Sputum Assessment Questionnaire." *Respiratory Medicine* 102 (11): 1545–55. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.06.009.

Deslee, Gaëtan, Pierre-Régis Burgel, Roger Escamilla, Pascal Chanez, Isabelle Court-Fortune, Pascale Nesme-Meyer, Graziella Brinchault-Rabin, et al. 2016. "Impact of Current Cough on Health-Related Quality of Life in Patients with COPD." *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 11 (September): 2091–97. https://doi.org/10.2147/COPD.S106883.

Fahy, John V., and Burton F. Dickey. 2010. "Airway Mucus Function and Dysfunction." *The New England Journal of Medicine* 363 (23): 2233–47. https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061.

Han, MeiLan K., Hana Muellerova, Douglas Curran-Everett, Mark T. Dransfield, George R. Washko, Elizabeth A. Regan, Russell P. Bowler, et al. 2013. "GOLD 2011 Disease Severity Classification in COPDGene: A Prospective Cohort Study." *The Lancet. Respiratory Medicine* 1 (1): 43–50. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70044-9.

Hodge, Sandra, Greg Hodge, Hubertus Jersmann, Geoffrey Matthews, Jessica Ahern, Mark Holmes, and Paul N. Reynolds. 2008. "Azithromycin Improves Macrophage Phagocytic Function and Expression of Mannose Receptor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (2): 139–48. https://doi.org/10.1164/rccm.200711-1666OC.

Hogg, James C., Fanny Chu, Soraya Utokaparch, Ryan Woods, W. Mark Elliott, Liliana Buzatu, Ruben M. Cherniack, et al. 2004. "The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *The New England Journal of Medicine* 350 (26): 2645–53. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032158.

Jouneau, S., M. Dres, A. Guerder, N. Bele, A. Bellocq, A. Bernady, G. Berne, et al. 2017. "Management of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Guidelines from the Société de Pneumologie de Langue Française (Summary)." *Revue Des Maladies Respiratoires* 34 (4): 282–322. https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.03.034.

Kesimer, Mehmet, Amina A. Ford, Agathe Ceppe, Giorgia Radicioni, Rui Cao, C. William Davis, Claire M. Doerschuk, et al. 2017. "Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis." *New England Journal of Medicine* 377 (10): 911–22. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701632.

Kim, Victor, and Gerard J. Criner. 2013. "Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (3): 228–37. https://doi.org/10.1164/rccm.201210-1843CI.

Lahousse, Lies, Leen J. M. Seys, Guy F. Joos, Oscar H. Franco, Bruno H. Stricker, and Guy G. Brusselle. 2017. "Epidemiology and Impact of Chronic Bronchitis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *The European Respiratory Journal* 50 (2). https://doi.org/10.1183/13993003.02470-2016.

Lytras, Theodore, Manolis Kogevinas, Hans Kromhout, Anne-Elie Carsin, Josep M. Antó, Hayat Bentouhami, Joost Weyler, et al. 2018. "Occupational Exposures and 20-Year Incidence of COPD: The European Community Respiratory Health Survey." *Thorax*, March. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211158.

McDonough, John E., Ren Yuan, Masaru Suzuki, Nazgol Seyednejad, W. Mark Elliott, Pablo G. Sanchez, Alexander C. Wright, et al. 2011. "Small-Airway Obstruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *The New England Journal of Medicine* 365 (17): 1567–75. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106955.

Molinari, Nicolas, Camille Briand, Isabelle Vachier, Nicolas Malafaye, Pierre Aubas, Vera Georgescu, Nicolas Roche, Pascal Chanez, and Arnaud Bourdin. 2015. "Hospitalizations for COPD Exacerbations: Trends and Determinants of Death." *COPD* 12 (6): 621–27. https://doi.org/10.3109/15412555.2015.1007931.

Molinari, Nicolas, Pascal Chanez, Nicolas Roche, Engi Ahmed, Isabelle Vachier, and Arnaud Bourdin. 2016. "Rising Total Costs and Mortality Rates Associated with Admissions Due to COPD Exacerbations." *Respiratory Research* 17 (1): 149. https://doi.org/10.1186/s12931-016-0469-6.

Monz, Brigitta U., Paul Sachs, Jeffrey McDonald, Bruce Crawford, Michael C. Nivens, and Kay Tetzlaff. 2010. "Responsiveness of the Cough and Sputum Assessment Questionnaire in Exacerbations of COPD and Chronic Bronchitis." *Respiratory Medicine* 104 (4): 534–41. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.10.026.

O'Reilly, Philip J., Patricia L. Jackson, J. Michael Wells, Mark T. Dransfield, Paul D. Scanlon, and J. Edwin Blalock. 2013. "Sputum PGP Is Reduced by Azithromycin Treatment in Patients with COPD and Correlates with Exacerbations." *BMJ Open* 3 (12): e004140. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004140.

Patarin, Jeremy, Etienne Ghiringhelli, Claire Cracowski, Boubou Camara, Sebastien Quetant, Cecile Bosc, Christophe Pison, and Jean-Luc Cracowski. 2017. "Late Breaking Abstract - Rheology as a Tool to Assess COPD Diagnosis Compared to Asthma Diagnosis, and to Evaluate the Efficiency of Treatments." In , PA1357. European Respiratory Society. https://doi.org/10.1183/1393003.congress-2017.PA1357.

R Core Team. 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/.

Saetta, M., G. Turato, S. Baraldo, A. Zanin, F. Braccioni, C. E. Mapp, P. Maestrelli, G. Cavallesco, A. Papi, and L. M. Fabbri. 2000. "Goblet Cell Hyperplasia and Epithelial Inflammation in Peripheral Airways of Smokers with Both Symptoms of Chronic Bronchitis and Chronic Airflow Limitation." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 (3 Pt 1): 1016–21. https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.3.9907080.

Schikowski, Tamara, Martin Adam, Alessandro Marcon, Yutong Cai, Andrea Vierkötter, Anne Elie Carsin, Benedicte Jacquemin, et al. 2014. "Association of Ambient Air Pollution with the Prevalence and Incidence of COPD." *The European Respiratory Journal* 44 (3): 614–26. https://doi.org/10.1183/09031936.00132213.

Shimizu, Takeshi, and Shino Shimizu. 2012. "Azithromycin Inhibits Mucus Hypersecretion from Airway Epithelial Cells." *Mediators of Inflammation* 2012: 265714. https://doi.org/10.1155/2012/265714.

Svanes, Øistein, Randi J. Bertelsen, Stein H. L. Lygre, Anne E. Carsin, Josep M. Antó, Bertil Forsberg, José M. García-García, et al. 2018. "Cleaning at Home and at Work in Relation to Lung Function Decline and Airway Obstruction." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 197 (9): 1157–63. https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1311OC.

Tagaya, Etsuko, Osamitsu Yagi, Akitoshi Sato, Ken Arimura, Kiyoshi Takeyama, Mitsuko Kondo, and Jun Tamaoki. 2016. "Effect of Tiotropium on Mucus Hypersecretion and Airway Clearance in Patients with COPD." *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 39: 81–84. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.06.008.

Terzikhan, Natalie, Katia M. C. Verhamme, Albert Hofman, Bruno H. Stricker, Guy G. Brusselle, and Lies Lahousse. 2016. "Prevalence and Incidence of COPD in Smokers and Non-Smokers: The Rotterdam Study." *European Journal of Epidemiology* 31 (8): 785–92. https://doi.org/10.1007/s10654-016-0132-z.

Wedzicha, Jadwiga A., Donald Banerji, Kenneth R. Chapman, Jørgen Vestbo, Nicolas Roche, R. Timothy Ayers, Chau Thach, et al. 2016. "Indacaterol-Glycopyrronium versus Salmeterol-Fluticasone for COPD." *The New England Journal of Medicine* 374 (23): 2222–34. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516385.

VI. COPD CaRhe : mesures de reproductibilité et de répétabilité multisites réalisées en réponse aux demandes formulées par l'ANSM le 20 Avril 2021

D'après les rapports élaborés par l'équipe de Rhéonova en collaboration avec les équipes de Montpellier, Bordeaux et Toulouse au sein desquelles ont été réalisées les mesures.

1. Abbréviations

Abréviations et termes	Description
G^*- Module viscoélastique	Rigidité du mucus au repos, liée à la raideur du réseau moléculaire
$tan(\delta)$ - Facteur d'amortissement	Facteur de dissipation d'énergie, lié à la morphologie du réseau moléculaire
γ_c - Déformation critique	Extensibilité maximale du mucus avant l'écoulement
σ_c - Contrainte critique	Force de gel, fermeté du mucus avant l'écoulement

2. Objectif des essais

L'objectif était de quantifier la répétabilité et la reproductibilité de l'appareil Rheomuco, sur la mesure des 4 paramètres rhéologiques qu'il fournit à l'issue de l'analyse :

- Module viscoélastique G* (G' et G'') en Pa

- Facteur d'amortissement tan δ, sans unité

- Déformation critique γc, sans unité

- Contrainte critique σc, en Pa

Dans cette analyse, nous souhaitions évaluer l'influence des paramètres «opérateur», «machine», «environnement», et « fluide mesuré ». Ainsi, l'étude a fait intervenir 3 sites (lieu et appareil différents), 2 opérateurs par site, et 2 fluides modèles (représentatifs des extrémités haute et basse de la plage de mesure).

3. Méthode

a) Protocole des essais

L'objectif était de prendre en compte l'influence des paramètres suivants

- Opérateur
- Machine
- Environnement

De plus, l'influence de l'échantillon ne devait pas être prise en compte dans l'analyse statistique. Les caractéristiques des échantillons pouvant évoluer dans le temps, les mesures ont été réalisées la même semaine.

Echantillons test

- Flopaam 6035 de concentration 0.1% et Flopaam 6035 de concentration 1%
- Composition : polyacrylamide standard à 100 million Dalton
- Concentrations testées : 0.1% et 1%.
- Stabilité : 1 mois à température ambiante
- Préparations réalisées par Rheonova, envoi de 100ml/concentration/site

Sur chaque site, réalisation du protocole Rheomuco :

- 10 mesures par jour/fluide
- Par 2 opérateurs

Paramètres à comparer :

	Log (G*)	**Log (tan δ)**	**Log(γc)**	**Log(σc)**
Incertitude à 3 écarts type (%)				

b) *Méthode d'analyse des résultats*

i. Normalité

Le traitement statistique des données mesurées reposait sur l'hypothèse qu'elles suivent une loi normale. La normalité de chaque série de mesure a été vérifiée avec un test de Shapiro-Wilk (niveau de significativité 5%). Une série = 10 mesures correspondant à 1 site, 1 opérateur, 1 fluide et 1 paramètre rhéologique calculé.

ii. Etude de répétabilité

Ces calculs ont été menés pour chaque fluide, chaque paramètre rhéologique, mais sur les mesures des 2 opérateurs.

- Pour chaque site, l'écart-type expérimental était repris : études INTRA-site.
- Pour l'ensemble des sites, la variance de répétabilité était calculée (Sr^2 = moyenne des variances sur les 3 sites) puis l'écart-type de répétabilité (racine carrée de la variance de répétabilité) : étude INTER-site
- la limite de répétabilité était calculée (écart maximal théorique entre deux mesures pour qu'elles soient considérées comme compatibles avec une probabilité de 95%)

iii. Etude de reproductibilité

- Ces calculs ont été menés pour chaque fluide, chaque paramètre rhéologique, mais sur les mesures des 2 opérateurs.
- la variance des moyennes de chaque site a été calculée
- la variance INTER-sites a été calculée (Sr^2 = variance des moyennes - variance de répétabilité / nombre de mesures).
- la variance de reproductibilité a été calculée (somme de la variance INTER-site Sr^2 et de la variance de répétabilité Sr^2), puis l'écart-type de reproductibilité (racine carrée de la variance de reproductibilité).

4. Résultats

a) *Normalité*

La normalité des séries de mesures a été évaluée pour chaque opérateur, pour chaque fluide et pour chaque paramètre rhéologique.

- La grande majorité des cas testés (41/48 soit 85%) vérifiaient l'hypothèse de normalité selon le test de Shapiro-Wilks à 5%.
- Lorsque le test indiquait que la série ne suivait pas la loi normale, nous observions néanmoins que l'hypothèse de normalité était vérifiée dans les autres cas comparables (autres sites et/ou autre opérateur). En d'autres termes, les cas isolés de lois non normales n'étaient pas spécifiques à une association donnée de sites / fluides / paramètres rhéologiques.

Fluide	Cas testé	Loi normale	Total cas testés
Flopaam 0,1%	G_0.1	5	6 (3 labos x 2 opérateurs)
	tand_0.1	5	
	gamc_0.1	6	
	sigc_0.1	5	
Flopaam 1%	G_1	6	
	tand_1	4	
	gamc_1	5	
	sigc_1	5	

Figure 38. Normalité selon les cas testés

Aussi, malgré quelques cas isolés de non normalité, compte tenu du nombre restreint de mesures par opérateur, nous pouvons raisonnablement considérer que les mesures par Rheomuco des 4 paramètres rhéologiques sur les 2 fluides modèles suivent une loi normale. Les méthodes de calcul de répétabilité et de reproductibilité prévues dans la suite de l'étude ont donc été appliqués.

b) *Répétabilité et Reproductibilité*

Les écarts-type de répétabilité et de reproductibilité ont été calculés pour chaque paramètre rhéologique évalué par le dispositif Rheomuco.

Flopaam 0.1%

Paramètre	Symbole	G* (Pa)	tan δ (-)	γc (-)	σc (Pa)
Moyenne des moyennes	-	2.44	0.33	8.63	3.99
Ecart-type de répétabilité	**Sr**	**0.21**	**0.02**	**0.76**	**0.26**
Ecart-type de répétabilité %	*Sr %*	*8.65%*	*5.88%*	*8.85%*	*6.48%*
Ecart-type de reproductibilité	**Srepro**	**0.21**	**0.02**	**0.92**	**0.32**
Ecart-type de reproductibilité %	*Srepro %*	*8.50%*	*7.40%*	*10.69%*	*8.14%*

Flopaam 1%

Paramètre	Symbole	G* (Pa)	tan δ (-)	γc (-)	σc (Pa)
Moyenne des moyennes		40.21	0.20	7.59	52.73
Ecart-type de répétabilité %	**Sr**	**3.92**	**0.01**	**0.68**	**3.90**
Ecart-type de répétabilité	*Sr %*	*9.75%*	*3.28%*	*8.96%*	*7.40%*
Ecart-type de reproductibilité	**Srepro**	**4.00**	**0.01**	**0.92**	**4.40**
Ecart-type de reproductibilité %	*Srepro %*	*9.95%*	*3.76%*	*12.12%*	*8.34%*

Figure 39. Résultats des données de répétabilité et de reproductibilité inter- et intra-sites

5. Conclusion

Après avoir vérifié l'hypothèse de normalité des séries et la validité des données, les écarts-type de répétabilité et de reproductibilité ont été calculés pour chaque paramètre rhéologique évalué par Rheomuco (G*, tan δ, γc, σc).

Ces valeurs sont cohérentes avec le niveau de performance obtenu sur des rhéomètres du commerce de référence.

Conclusion et perspectives

Notre travail se décline en 3 axes :

- Etablir un modèle d'exposition à la fumée de cigarette « *entière* » d'épithélia bronchiques reconstitués *ex vivo*, afin d'étudier la production/sécrétion de mucines et l'effet de traitement potentiellement muco-régulateur.
- A partir d'expectorations de sujets atteints de maladies chroniques des voies aériennes, déterminer les constituants du mucus en mesure d'en impacter la rhéologie dans une optique d'*endotypage.*
- En s'aidant de valeurs seuils de la rhéologie du mucus préalablement déterminées, définir une stratégie diagnostique et thérapeutique basée sur la rhéologie du mucus.

Nous avons tout d'abord détaillé les dysfonctionnements de la régulation du mucus dans les principales pathologies des voies aériennes dites muco-obstructives, l'asthme, la BPCO et les bronchectasies non-CF. Nous avons passé en revue les outils permettant d'étudier les altérations de l'homéostasie du mucus et avons abordé l'impact, modeste, des thérapeutiques conventionnelles actuelles sur cette aspect pathologique.

Puis nos travaux de recherche se sont d'abord intéressés à l'agression environnementale la plus problématique dans les sociétés occidentales, la fumée de cigarette. Nous avons développé un modèle d'exposition de culture en ALI d'épithélia issus de patients (fumeurs et BPCO) nous permettant d'analyser la production et la sécrétion de mucines MUC5AC. Malgré les problématiques liées au modèle de culture cellulaire et aux processus de détection des protéines de mucines que nous avons décrites dans notre revue ***(Partie A – Chapitre III.)***, nous avons pu mettre en évidence une hypersécrétion de mucines et avons pu la moduler par supplémentation « préventive » en protéine CCSP. La suite serait de confirmer cette observation à plus grande échelle et sur une exposition à plus long terme, d'appréhender les voies de signalisation impliquées, et d'étudier les effets *in vivo* chez l'adulte d'une telle supplémentation.

Ensuite nous nous sommes intéressés au mucus *in vivo.* Dans une étude pragmatique, nous avons montré que le caractère viscoélastique du mucus des patients atteints de maladies muco-obstructives était directement corrélé à la concentration en mucines et en éosinophiles des expectorations, mais aussi que la rhéologie pouvait prédire l'éosinophilie. Cela ouvre de multiples perspectives, comme l'utilisation de la rhéologie tel un biomarqueur non invasif permettant d'endotyper les maladies des voies aériennes, comme outils du clinicien pour guider une stratégie thérapeutique ou pour évaluer son efficacité, ou bien encore comme outils destiné à tester l'impact de nouvelles molécules. Bien sûr

il reste de nombreux éléments à appréhender avant cela, notamment le lien entre rhéologie et clinique. Nous avons montré une corrélation statistiquement significative entre les propriété viscoélastiques du mucus et la bronchite chronique (évaluée par le CASA-Q) ainsi que le VEMS, mais sa pertinence clinique reste à démontrer.

De fait, dans l'idée de concilier observations expérimentales et pratique clinique, nous avons élaboré un protocole destiné à évaluer l'efficacité d'une stratégie de prescription de macrolides guidée par la rhéologie dans la BPCO. Outre l'intérêt d'étudier l'impact d'une telle stratégie sur le critère de jugement principal, à savoir le taux annuel d'exacerbation, nous espérons que cette étude confirmera nos premières observations et nous permettra de déterminer d'autres marqueurs corrélés ou influençant directement la rhéologie du mucus, citons par exemple l'éosinophilie sérique, la microbiologie, ou bien le taux circulant de CCSP.

Pour conclure, hypersécrétion, hyperproduction et/ou hyperconcentration du mucus ont été tour à tour mis en lumière dans l'asthme, la BPCO, et les bronchectasies non-CF, mais il reste bien difficile de déterminer si elles en constituent le *primum movens*, ou bien si ces anomalies ne sont que des mécanismes d'adaptation qui se trouvent « dépassés » par d'autres processus physiopathologiques plus précoces.

Partant de là, deux approches à visée thérapeutique, pas nécessairement exclusives, se dessinent:

1) considérer le mucus comme un *« treatable trait »* (217), c'est-à-dire comme une cible thérapeutique à part entière qui serait identifiée par *endotypage* à l'aide d'un biomarqueur validé. La notion de « muco-obstructive lung diseases » fait partie intégrante de ce paradigme.
   ou
2) Intégrer les anomalies de l'homéostasie du mucus dans un ensemble complexe de voies physiopathologiques en relation les unes avec les autres (dysrégulation de la différenciation cellulaire, réponse exagérée à une agression exogène, susceptibilité génétique, etc…).

Cette dernière approche, de loin la plus ambitieuse mais la plus pertinente, ne peut vraisemblablement exister sans une connaissance précise, globale et dynamique de la régulation du mucus. C'est à ce prix que pourront être développées des thérapeutiques permettant réellement d'avoir une emprise précoce sur la trajectoire des maladies chroniques des voies aériennes.

Références bibliographiques

1. Bakshani CR, Morales-Garcia AL, Althaus M, Wilcox MD, Pearson JP, Bythell JC, et al. Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. npj Biofilms Microbiomes. 4 juill 2018;4(1):1-12.

2. Rose MC, Voynow JA. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. Physiological Reviews. 1 janv 2006;86(1):245-78.

3. Kesimer M, Ford AA, Ceppe A, Radicioni G, Cao R, Davis CW, et al. Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis. New England Journal of Medicine. 7 sept 2017;377(10):911-22.

4. Meldrum OW, Chotirmall SH. Mucus, Microbiomes and Pulmonary Disease. Biomedicines. 13 juin 2021;9(6):675.

5. Demouveaux B, Gouyer V, Magnien M, Plet S, Gottrand F, Narita T, et al. La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus. Med Sci (Paris). oct 2018;34(10):806-12.

6. Kim D, Liao J, Hanrahan JW. The buffer capacity of airway epithelial secretions. Frontiers in Physiology. 2014;5:188.

7. Georgiades P, Pudney PDA, Thornton DJ, Waigh TA. Particle tracking microrheology of purified gastrointestinal mucins. Biopolymers. avr 2014;101(4):366-77.

8. Carpenter J, Wang Y, Gupta R, Li Y, Haridass P, Subramani DB, et al. Assembly and organization of the N-terminal region of mucin MUC5AC: Indications for structural and functional distinction from MUC5B. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 sept 2021;118(39):e2104490118.

9. Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule. J Biol Chem. 4 avr 1997;272(14):9561-6.

10. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. Biochem J. 1 févr 2002;361(Pt 3):537-46.

11. Meldrum OW, Yakubov GE, Bonilla MR, Deshmukh O, McGuckin MA, Gidley MJ. Mucin gel assembly is controlled by a collective action of non-mucin proteins, disulfide bridges, Ca2+-mediated links, and hydrogen bonding. Sci Rep. 11 avr 2018;8(1):5802.

12. Button B, Cai L-H, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. Science. 24 août 2012;337(6097):937-41.

13. Boucher RC. Muco-Obstructive Lung Diseases. New England Journal of Medicine. 16 mai 2019;380(20):1941-53.

14. Button B, Goodell HP, Atieh E, Chen Y-C, Williams R, Shenoy S, et al. Roles of mucus adhesion and cohesion in cough clearance. Proc Natl Acad Sci USA. 04 2018;115(49):12501-6.

15. Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. Journal of Allergy and Clinical Immunology. mai 2012;129(5):1259-1266.e1.

16. Gras D, Petit A, Charriot J, Knabe L, Alagha K, Gamez AS, et al. Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth. BMC Pulm Med. 3 mai 2017;17(1):80.

17. Frontiers | Mucus Microrheology Measured on Human Bronchial Epithelium Culture | Physics [Internet]. [cité 15 oct 2021]. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2019.00019/full

18. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. New England Journal of Medicine. 2010;363(23):2233-47.

19. Lee RE, Miller SM, Randell SH. Adult Pulmonary Epithelial Stem Cells and Their Niches. In: Reis RL, éditeur. Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine [Internet]. Oxford: Academic Press; 2019 [cité 17 oct 2021]. p. 319-36. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383654752

20. Okuda K, Chen G, Subramani DB, Wolf M, Gilmore RC, Kato T, et al. Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine [Internet]. 23 oct 2018 [cité 21 nov 2018]; Disponible sur: https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201804-0734OC

21. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of airway mucin gene expression. Annu Rev Physiol. 2008;70:405-29.

22. Voynow JA. Mucins, Mucus, and Sputum. CHEST Journal. 1 févr 2009;135(2):505.

23. Hancock LA, Hennessy CE, Solomon GM, Dobrinskikh E, Estrella A, Hara N, et al. Muc5b overexpression causes mucociliary dysfunction and enhances lung fibrosis in mice. Nat Commun. 18 déc 2018;9(1):5363.

24. Zhang Q, Wang Y, Qu D, Yu J, Yang J. The Possible Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis considering MUC5B. BioMed Research International. 11 juin 2019;2019:e9712464.

25. Adler K, Tuvim M, Dickey B. Regulated Mucin Secretion from Airway Epithelial Cells. Frontiers in Endocrinology. 2013;4:129.

26. Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, et al. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. Am J Respir Cell Mol Biol. oct 2004;31(4):382-94.

27. Ramnarine SI, Haddad EB, Khawaja AM, Mak JC, Rogers DF. On muscarinic control of neurogenic mucus secretion in ferret trachea. J Physiol. 15 juill 1996;494(Pt 2):577-86.

28. Mullol J, Baraniuk JN, Logun C, Mérida M, Hausfeld J, Shelhamer JH, et al. M1 and M3 muscarinic antagonists inhibit human nasal glandular secretion in vitro. J Appl Physiol (1985). nov 1992;73(5):2069-73.

29. Salathe M. Effects of beta-agonists on airway epithelial cells. J Allergy Clin Immunol. déc 2002;110(6 Suppl):S275-281.

30. Moulton BC, Fryer AD. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. Br J Pharmacol. mai 2011;163(1):44-52.

31. On LS, Boonyongsunchai P, Webb S, Davies L, Calverley PM, Costello RW. Function of pulmonary neuronal M(2) muscarinic receptors in stable chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. mai 2001;163(6):1320-5.

32. Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, Barnes PJ. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. J Appl Physiol (1985). déc 1989;67(6):2461-5.

33. McGuckin MA, Thornton DJ, Whitsett JA. Mucins and Mucus. In: Mucosal Immunology [Internet]. Elsevier; 2015 [cité 17 oct 2021]. p. 231-50. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158474000148

34. Sweeter JM, Kudrna K, Hunt K, Thomes P, Dickey BF, Brody SL, et al. Autophagy of mucin granules contributes to resolution of airway mucous metaplasia. Sci Rep. 22 juin 2021;11(1):13037.

35. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, et al. Small-Airway Obstruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. New England Journal of Medicine. 26 oct 2011;365(17):1567-75.

36. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 24 juin 2004;350(26):2645-53.

37. 2021 GOLD Reports [Internet]. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. [cité 17 oct 2021]. Disponible sur: https://goldcopd.org/2021-gold-reports/

38. Lahousse L, Seys LJM, Joos GF, Franco OH, Stricker BH, Brusselle GG. Epidemiology and impact of chronic bronchitis in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J [Internet]. 10 août 2017 [cité 25 janv 2020];50(2). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593375/

39. Radicioni G, Ceppe A, Ford AA, Alexis NE, Barr RG, Bleecker ER, et al. Airway mucin MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort. The Lancet Respiratory Medicine. mai 2021;S2213260021000795.

40. Anderson WH, Coakley RD, Button B, Henderson AG, Zeman KL, Alexis NE, et al. The Relationship of Mucus Concentration (Hydration) to Mucus Osmotic Pressure and Transport in Chronic Bronchitis. Am J Respir Crit Care Med. 24 avr 2015;192(2):182-90.

41. Innes AL, Woodruff PG, Ferrando RE, Donnelly S, Dolganov GM, Lazarus SC, et al. Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. Chest. oct 2006;130(4):1102-8.

42. Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. Thorax. 1 nov 1984;39(11):844-9.

43. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, et al. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in

chronic obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2001;163(1):185-94.

44. Bernard A, Marchandise FX, Depelchin S, Lauwerys R, Sibille Y. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. Eur Respir J. nov 1992;5(10):1231-8.

45. Knabe L, Fort A, Chanez P, Bourdin A. Club cells and CC16: another « smoking gun »? (With potential bullets against COPD). Eur Respir J. juin 2015;45(6):1519-20.

46. Burgel P-R, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. Thorax. nov 2004;59(11):992-6.

47. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel P-R, Dao-Pick T, Ueki IF, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 1 janv 2001;280(1):L165-72.

48. Shao MXG, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor -converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 30 sept 2003;100(20):11618-23.

49. Fischer BM, Voynow JA. Neutrophil Elastase Induces MUC5AC Gene Expression in Airway Epithelium via a Pathway Involving Reactive Oxygen Species. Am J Respir Cell Mol Biol. 1 avr 2002;26(4):447-52.

50. Gundavarapu S, Wilder JA, Mishra NC, Rir-Sima-Ah J, Langley RJ, Singh SP, et al. Role of nicotinic receptors and acetylcholine in mucous cell metaplasia, hyperplasia, and airway mucus formation in vitro and in vivo. J Allergy Clin Immunol. sept 2012;130(3):770-780.e11.

51. Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. Sci Rep [Internet]. 2 févr 2015 [cité 4 févr 2015];5. Disponible sur: http://www.nature.com.gate2.inist.fr/srep/2015/150202/srep08163/full/srep08163.html

52. Cao X, Wang Y, Xiong R, Muskhelishvili L, Davis K, Richter P, et al. Cigarette whole smoke solutions disturb mucin homeostasis in a human in vitro airway tissue model. Toxicology. 2018;

53. van Heusden C, Grubb BR, Button B, Lazarowski ER. Airway Epithelial Nucleotide Release Contributes to Mucociliary Clearance. Life (Basel). 11 mai 2021;11(5):430.

54. Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, et al. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. FASEB J. févr 2012;26(2):533-45.

55. Kreda SM, Seminario-Vidal L, van Heusden CA, O'Neal W, Jones L, Boucher RC, et al. Receptor-promoted exocytosis of airway epithelial mucin granules containing a spectrum of adenine nucleotides. J Physiol. 15 juin 2010;588(Pt 12):2255-67.

56. Mukherjee I, Roy S, Chakrabarti S. Identification of Important Effector Proteins in the FOXJ1 Transcriptional Network Associated With Ciliogenesis and Ciliary Function. Frontiers in Genetics. 2019;10:23.

57. Perotin J-M, Coraux C, Lagonotte E, Birembaut P, Delepine G, Polette M, et al. Alteration of primary cilia in COPD. European Respiratory Journal [Internet]. 1 juill 2018 [cité 21 oct 2021];52(1). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/1/1800122

58. Viniol C, Vogelmeier CF. Exacerbations of COPD. European Respiratory Review [Internet]. 31 mars 2018 [cité 21 oct 2021];27(147). Disponible sur: https://err.ersjournals.com/content/27/147/170103

59. Linden D, Guo-Parke H, Coyle PV, Fairley D, McAuley DF, Taggart CC, et al. Respiratory viral infection: a potential "missing link" in the pathogenesis of COPD. European Respiratory Review [Internet]. 31 mars 2019 [cité 21 oct 2021];28(151). Disponible sur: https://err.ersjournals.com/content/28/151/180063

60. Jing Y, Gimenes JA, Mishra R, Pham D, Comstock AT, Yu D, et al. NOTCH3 contributes to rhinovirus-induced goblet cell hyperplasia in COPD airway epithelial cells. Thorax. 1 janv 2019;74(1):18-32.

61. Singanayagam A, Footitt J, Kasdorf BT, Marczynski M, Cross MT, Finney LJ, et al. MUC5AC drives COPD exacerbation severity through amplification of virus-induced airway inflammation [Internet]. Immunology; 2019 juill [cité 21 oct 2021]. Disponible sur: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/706804

62. Singanayagam A, Glanville N, Girkin JL, Ching YM, Marcellini A, Porter JD, et al. Corticosteroid suppression of antiviral immunity increases bacterial loads and mucus production in COPD exacerbations. Nat Commun. 8 juin 2018;9(1):2229.

63. Fernández-Blanco JA, Fakih D, Arike L, Rodríguez-Piñeiro AM, Martínez-Abad B, Skansebo E, et al. Attached stratified mucus separates bacteria from the epithelial cells in COPD lungs [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2018 [cité 21 oct 2021]. Disponible sur: https://insight.jci.org/articles/view/120994/pdf

64. Wang BX, Wu CM, Ribbeck K. Home, sweet home: how mucus accommodates our microbiota. FEBS J. mars 2021;288(6):1789-99.

65. Jeffries JL, Jia J, Choi W, Choe S, Miao J, Xu Y, et al. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewisx to increase binding to airway epithelial cells. Mucosal Immunol. juill 2016;9(4):1039-50.

66. Hoffman CL, Lalsiamthara J, Aballay A. Host Mucin Is Exploited by Pseudomonas aeruginosa To Provide Monosaccharides Required for a Successful Infection. mBio. 11(2):e00060-20.

67. Sibila O, Garcia-Bellmunt L, Giner J, Rodrigo-Troyano A, Suarez-Cuartin G, Torrego A, et al. Airway Mucin 2 Is Decreased in Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease with Bacterial Colonization. Ann Am Thorac Soc. mai 2016;13(5):636-42.

68. Pocket Guide for Asthma Management and Prevention [Internet]. Global Initiative for Asthma - GINA. [cité 21 oct 2021]. Disponible sur: https://ginasthma.org/pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/

69. Robinson D, Humbert M, Buhl R, Cruz AA, Inoue H, Korom S, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. Clin Exp Allergy. févr 2017;47(2):161-75.

70. Kuruvilla ME, Lee FE-H, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. Clinic Rev Allerg Immunol. avr 2019;56(2):219-33.

71. Kuo C-HS, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, et al. A Transcriptome-driven Analysis of Epithelial Brushings and Bronchial Biopsies to Define Asthma Phenotypes in U-BIOPRED. Am J Respir Crit Care Med. 15 févr 2017;195(4):443-55.

72. Sze E, Bhalla A, Nair P. Mechanisms and therapeutic strategies for non-T2 asthma. Allergy. 2020;75(2):311-25.

73. Kuyper LM, Paré PD, Hogg JC, Lambert RK, Ionescu D, Woods R, et al. Characterization of airway plugging in fatal asthma. Am J Med. juill 2003;115(1):6-11.

74. Kim V, Evans CM, Dickey BF. Dawn of a New Era in the Diagnosis and Treatment of Airway Mucus Dysfunction. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine [Internet]. 25 sept 2018 [cité 4 oct 2018]; Disponible sur: https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201808-1444ED

75. Fig. 1: Polymeric mucins in asthmatic airways are targets for disulfide disruption. | Nature Communications. [cité 21 oct 2021]; Disponible sur: https://www.nature.com/articles/s41467-020-20499-0/figures/1

76. JCI - Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction [Internet]. [cité 15 sept 2019]. Disponible sur: https://www.jci.org/articles/view/95693

77. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and Moderate Asthma Is Associated with Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression. Am J Respir Crit Care Med. 1 févr 2001;163(2):517-23.

78. 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. 1 sept 2009;180(5):388-95.

79. Bonser LR, Erle DJ. Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. Journal of Clinical Medicine. déc 2017;6(12):112.

80. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nat Med. août 2002;8(8):885-9.

81. 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. 2 oct 2007;104(40):15858-63.

82. Solberg OD, Ostrin EJ, Love MI, Peng JC, Bhakta NR, Hou L, et al. Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2012;186(10):965-74.

83. Zhen G, Park SW, Nguyenvu LT, Rodriguez MW, Barbeau R, Paquet AC, et al. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. Am J Respir Cell Mol Biol. févr 2007;36(2):244-53.

84. Park K-S, Korfhagen TR, Bruno MD, Kitzmiller JA, Wan H, Wert SE, et al. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. J Clin Invest. avr 2007;117(4):978-88.

85. Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, et al. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. J Clin Invest. oct 2009;119(10):2914-24.

86. Alevy YG, Patel AC, Romero AG, Patel DA, Tucker J, Roswit WT, et al. IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. J Clin Invest. déc 2012;122(12):4555-68.

87. Sivaprasad U, Askew DJ, Ericksen MB, Gibson AM, Stier MT, Brandt EB, et al. A nonredundant role for mouse Serpinb3a in the induction of mucus production in asthma. J Allergy Clin Immunol. janv 2011;127(1):254-61, 261.e1-6.

88. Zhao J, Maskrey B, Balzar S, Chibana K, Mustovich A, Hu H, et al. Interleukin-13-induced MUC5AC is regulated by 15-lipoxygenase 1 pathway in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Crit Care Med. 1 mai 2009;179(9):782-90.

89. Lachowicz-Scroggins ME, Finkbeiner WE, Gordon ED, Yuan S, Zlock L, Bhakta NR, et al. Corticosteroid and long-acting ß-agonist therapy reduces epithelial goblet cell metaplasia. Clin Exp Allergy. déc 2017;47(12):1534-45.

90. Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease. Cytokine. sept 2015;75(1):68-78.

91. Temann UA, Prasad B, Gallup MW, Basbaum C, Ho SB, Flavell RA, et al. A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. Am J Respir Cell Mol Biol. 1 avr 1997;16(4):471-8.

92. Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. J Exp Med. 17 nov 1997;186(10):1737-47.

93. Perkins C, Wills-Karp M, Finkelman FD. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. août 2006;118(2):410-9.

94. Awosika O, Kim L, Mazhar M, Dermatology M, Ehrlich A. Profile of dupilumab and its potential in the treatment of inadequately controlled moderate-to-severe atopic dermatitis. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. 24 janv 2018;Volume 11:41-9.

95. Lin J, Jiang Y, Li L, Liu Y, Tang H, Jiang D. TMEM16A mediates the hypersecretion of mucus induced by Interleukin-13. Exp Cell Res. 10 juin 2015;334(2):260-9.

96. Takeyama K, Dabbagh K, Lee H-M, Agustí C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc Natl Acad Sci U S A. 16 mars 1999;96(6):3081-6.

97. Grainge C, Dennison P, Lau L, Davies D, Howarth P. Asthmatic and Normal Respiratory Epithelial Cells Respond Differently to Mechanical Apical Stress. Am J Respir Crit Care Med. 15 août 2014;190(4):477-80.

98. Ressler B, Lee RT, Randell SH, Drazen JM, Kamm RD. Molecular responses of rat tracheal epithelial cells to transmembrane pressure. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. juin 2000;278(6):L1264-1272.

99. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. N Engl J Med. 26 mai 2011;364(21):2006-15.

100. Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, Liptzin DR, Fletcher AA, Harper DN, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. Nat Commun. 17 févr 2015;6(1):6281.

101. Simpson JL, Phipps S, Baines KJ, Oreo KM, Gunawardhana L, Gibson PG. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. European Respiratory Journal. 1 avr 2014;43(4):1067-76.

102. Faiz A, Weckmann M, Tasena H, Vermeulen CJ, Berge MV den, Hacken NHT ten, et al. Profiling of healthy and asthmatic airway smooth muscle cells following interleukin-1β treatment: a novel role for CCL20 in chronic mucus hypersecretion. European Respiratory Journal [Internet]. 1 août 2018 [cité 22 oct 2021];52(2). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/2/1800310

103. Martin JG. Airway smooth muscle may drive mucus hypersecretion in asthma. European Respiratory Journal [Internet]. 1 août 2018 [cité 22 oct 2021];52(2). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/2/1801166

104. Chang Y, Al-Alwan L, Risse P-A, Halayko AJ, Martin JG, Baglole CJ, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. FASEB J. déc 2012;26(12):5152-60.

105. Chang Y, Al-Alwan L, Risse P-A, Roussel L, Rousseau S, Halayko AJ, et al. TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration. J Allergy Clin Immunol. avr 2011;127(4):1046-1053.e1-2.

106. Moynihan BJ, Tolloczko B, Bassam SE, Ferraro P, Michoud M-C, Martin JG, et al. IFN-γ, IL-4 and IL-13 modulate responsiveness of human airway smooth muscle cells to IL-13. Respiratory Research. 30 déc 2008;9(1):84.

107. Parameswaran K, Radford K, Fanat A, Stephen J, Bonnans C, Levy BD, et al. Modulation of Human Airway Smooth Muscle Migration by Lipid Mediators and Th-2 Cytokines. Am J Respir Cell Mol Biol. 1 août 2007;37(2):240-7.

108. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. Nature. 16 janv 2014;505(7483):412-6.

109. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, Dunican EM, Yu M, Carrington SD, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2016;194(10):1296-9.

110. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis - PubMed [Internet]. [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25497369/

111. Bonser LR, Zlock L, Finkbeiner W, Erle DJ. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma [Internet]. 2016 [cité 25 sept 2017]. Disponible sur: https://www.jci.org/articles/view/84910/pdf

112. Innes AL, Carrington SD, Thornton DJ, Kirkham S, Rousseau K, Dougherty RH, et al. Ex vivo sputum analysis reveals impairment of protease-dependent mucus degradation by plasma proteins in acute asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1 août 2009;180(3):203-10.

113. Welsh KG, Rousseau K, Fisher G, Bonser LR, Bradding P, Brightling CE, et al. MUC5AC and a Glycosylated Variant of MUC5B Alter Mucin Composition in Children With Acute Asthma. Chest. oct 2017;152(4):771-9.

114. Abdullah LH, Evans JR, Wang TT, Ford AA, Makhov AM, Nguyen K, et al. Defective postsecretory maturation of MUC5B mucin in cystic fibrosis airways. JCI Insight [Internet]. 23 mars 2017 [cité 22 oct 2021];2(6). Disponible sur: https://insight.jci.org/articles/view/89752

115. Shimura S, Sasaki T, Sasaki H, Takishima T. Chemical properties of bronchorrhea sputum in bronchial asthma. Chest. déc 1988;94(6):1211-5.

116. Alagha K, Bourdin A, Vernisse C, Garulli C, Tummino C, Charriot J, et al. Goblet cell hyperplasia as a feature of neutrophilic asthma. Clin Exp Allergy. juin 2019;49(6):781-8.

117. Whitwell F. A Study of the Pathology and Pathogenesis of Bronchiectasis *. Thorax. sept 1952;7(3):213-39.

118. Muzio BD. Cystic bronchiectasis | Radiology Case | Radiopaedia.org [Internet]. Radiopaedia. [cité 23 oct 2021]. Disponible sur: https://radiopaedia.org/cases/cystic-bronchiectasis-3

119. Araújo D, Shteinberg M, Aliberti S, Goeminne PC, Hill AT, Fardon T, et al. Standardised classification of the aetiology of bronchiectasis using an objective algorithm. European Respiratory Journal [Internet]. 1 déc 2017 [cité 23 oct 2021];50(6). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/50/6/1701289

120. Schäfer J, Griese M, Chandrasekaran R, Chotirmall SH, Hartl D. Pathogenesis, imaging and clinical characteristics of CF and non-CF bronchiectasis. BMC Pulm Med. 22 mai 2018;18:79.

121. Flume PA, Chalmers JD, Olivier KN. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity. The Lancet. sept 2018;392(10150):880-90.

122. Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel P-R, Hubert D, Crestani B, Bassinet L, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in non-cystic fibrosis bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 15 mai 2010;181(10):1078-84.

123. Angrill J, Agustí C, de Celis R, Rañó A, Gonzalez J, Solé T, et al. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. Thorax. janv 2002;57(1):15-9.

124. Fuschillo S, De Felice A, Balzano G. Mucosal inflammation in idiopathic bronchiectasis: cellular and molecular mechanisms. Eur Respir J. févr 2008;31(2):396-406.

125. Cox MJ, Turek EM, Hennessy C, Mirza GK, James PL, Coleman M, et al. Longitudinal assessment of sputum microbiome by sequencing of the 16S rRNA gene in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. PLOS ONE. 7 févr 2017;12(2):e0170622.

126. Wheeler KM, Cárcamo-Oyarce G, Turner BS, Dellos-Nolan S, Co JY, Lehoux S, et al. Mucin glycans attenuate the virulence of Pseudomonas aeruginosa in infection. Nat Microbiol. déc 2019;4(12):2146-54.

127. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, Fardon TC, Finch S, Mateus EF, et al. Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis: Mucins in bronchiectasis. Respirology. oct 2015;20(7):1082-8.

128. Ramsey KA, Chen ACH, Radicioni G, Lourie R, Martin M, Broomfield A, et al. Airway Mucus Hyperconcentration in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 15 mars 2020;201(6):661-70.

129. Henke MO, John G, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. Am J Respir Crit Care Med. 15 avr 2007;175(8):816-21.

130. Ramphal R, Arora SK, Ritchings BW. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of Pseudomonas aeruginosa. Am J Respir Crit Care Med. oct 1996;154(4 Pt 2):S170-174.

131. Henke MO, Renner A, Huber RM, Seeds MC, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. Am J Respir Cell Mol Biol. juill 2004;31(1):86-91.

132. Lethem MI, James SL, Marriott C, Burke JF. The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. Eur Respir J. janv 1990;3(1):19-23.

133. Aogáin MM, Chandrasekaran R, Lim AYH, Low TB, Tan GL, Hassan T, et al. Immunological corollary of the pulmonary mycobiome in bronchiectasis: the CAMEB study. European Respiratory Journal [Internet]. 1 juill 2018 [cité 23 oct 2021];52(1). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/1/1800766

134. Aksamit TR, O'Donnell AE, Barker A, Olivier KN, Winthrop KL, Daniels MLA, et al. Adult Patients With Bronchiectasis: A First Look at the US Bronchiectasis Research Registry. Chest. mai 2017;151(5):982-92.

135. Ziedalski TM, Kao PN, Henig NR, Jacobs SS, Ruoss SJ. Prospective analysis of cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in adults with bronchiectasis or pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. Chest. oct 2006;130(4):995-1002.

136. Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Wilson R, Thornton DJ, Kirkham S, et al. INTERACTION BETWEEN MYCOBACTERIA AND MUCUS ON A HUMAN RESPIRATORY TISSUE ORGAN CULTURE MODEL WITH AN AIR INTERFACE. Experimental Lung Research. janv 2004;30(1):17-29.

137. Livraghi-Butrico A, Grubb BR, Wilkinson KJ, Volmer AS, Burns KA, Evans CM, et al. Contribution of mucus concentration and secreted mucins Muc5ac and Muc5b to the pathogenesis of muco-obstructive lung disease. Mucosal Immunol. mars 2017;10(2):395-407.

138. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat Med. mai 2004;10(5):487-93.

139. Zheng W, Kuhlicke J, Jäckel K, Eltzschig HK, Singh A, Sjöblom M, et al. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. FASEB J. janv 2009;23(1):204-13.

140. Bartoszewska S, Kamysz W, Jakiela B, Sanak M, Króliczewski J, Bebok Z, et al. miR-200b downregulates CFTR during hypoxia in human lung epithelial cells. Cell Mol Biol Lett. 15 nov 2017;22:23.

141. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na+ channels and increases airway epithelial Na+ transport. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. mai 2005;288(5):L813-819.

142. Ramsey K, Radicioni G, Hill D, Ehre C, Button B, Alexis NE, et al. Airways mucus pathogenesis in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. European Respiratory Journal [Internet]. 15 sept 2018 [cité 23 oct 2021];52(suppl 62). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl_62/PA5049

143. Alcaraz-Serrano V, Fernández-Barat L, Scioscia G, Llorens-Llacuna J, Gimeno-Santos E, Herrero-Cortina B, et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa alters sputum viscoelasticity in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. Respiratory Medicine. 1 juill 2019;154:40-6.

144. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis | PNAS [Internet]. [cité 29 oct 2021]. Disponible sur: https://www.pnas.org/content/103/12/4628?ijkey=39ab7fdcc4b71685d295e57942d8561b194ff6a1&keytype2=tf_ipsecsha

145. Rogers DF. Mucoactive drugs for asthma and COPD: any place in therapy? Expert Opin Investig Drugs. janv 2002;11(1):15-35.

146. Tam J, Nash EF, Ratjen F, Tullis E, Stephenson A. Nebulized and oral thiol derivatives for pulmonary disease in cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 12 juill 2013;(7):CD007168.

147. Decramer M, Rutten-van Mölken M, Dekhuijzen PNR, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R, et al. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 30 mai 2005;365(9470):1552-60.

148. Kim C-H, Hyun Song M, Eun Ahn Y, Lee J-G, Yoon J-H. Effect of hypo-, iso- and hypertonic saline irrigation on secretory mucins and morphology of cultured human nasal epithelial cells. Acta Otolaryngol. déc 2005;125(12):1296-300.

149. Elkins MR, Bye PT. Mechanisms and applications of hypertonic saline. J R Soc Med. juill 2011;104(Suppl 1):S2-5.

150. Rasgado-Flores H, Krishna Mandava V, Siman H, Van Driessche W, Pilewski JM, Randell SH, et al. Effect of apical hyperosmotic sodium challenge and amiloride on sodium transport in human bronchial epithelial cells from cystic fibrosis donors. Am J Physiol Cell Physiol. 1 déc 2013;305(11):C1114-1122.

151. Budai-Szűcs M, Berkó S, Kovács A, Jaikumpun P, Ambrus R, Halász A, et al. Rheological effects of hypertonic saline and sodium bicarbonate solutions on cystic fibrosis sputum in vitro. BMC Pulmonary Medicine. 12 juill 2021;21(1):225.

152. King M, Dasgupta B, Tomkiewicz RP, Brown NE. Rheology of cystic fibrosis sputum after in vitro treatment with hypertonic saline alone and in combination with recombinant human deoxyribonuclease I. Am J Respir Crit Care Med. juill 1997;156(1):173-7.

153. Hypertonic saline (salt water with at least 3% salt) nebulised as a fine mist through a mask or mouthpiece for cystic fibrosis [Internet]. [cité 29 oct 2021]. Disponible sur: https://www.cochrane.org/CD001506/CF_hypertonic-saline-salt-water-least-3-salt-nebulised-fine-mist-through-mask-or-mouthpiece-cystic

154. Makker HK, Holgate ST. Relation of the hypertonic saline responsiveness of the airways to exercise induced asthma symptom severity and to histamine or methacholine reactivity. Thorax. 1 févr 1993;48(2):142-7.

155. Taube C, Holz O, Mücke M, Jörres RA, Magnussen H. Airway Response to Inhaled Hypertonic Saline in Patients with Moderate to Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2001;164(10):1810-5.

156. Meer G de, Marks GB, Jongste JC de, Brunekreef B. Airway responsiveness to hypertonic saline: dose-response slope or PD15? European Respiratory Journal. 1 janv 2005;25(1):153-8.

157. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. PNAS. 1 déc 1990;87(23):9188-92.

158. Patarin J, Ghiringhelli É, Darsy G, Obamba M, Bochu P, Camara B, et al. Rheological analysis of sputum from patients with chronic bronchial diseases. Scientific Reports. 24 sept 2020;10(1):15685.

159. Treatment of idiopathic bronchiectasis with aerosolized recombinant human DNase I. rhDNase Study Group | Cochrane Library [Internet]. [cité 29 oct 2021]. Disponible sur: https://www.cochranelibrary.com/central/doi/10.1002/central/CN-00150845/full

160. Wills PJ, Wodehouse T, Corkery K, Mallon K, Wilson R, Cole PJ. Short-term recombinant human DNase in bronchiectasis. Effect on clinical state and in vitro sputum transportability. Am J Respir Crit Care Med. août 1996;154(2 Pt 1):413-7.

161. Hodson ME. Aerosolized Dornase Alfa (rhDNase) for Therapy of Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1 mars 1995;151(3_pt_2):S70-4.

162. Suri R, Metcalfe C, Lees B, Grieve R, Flather M, Normand C, et al. Comparison of hypertonic saline and alternate-day or daily recombinant human deoxyribonuclease in children with cystic fibrosis: a randomised trial. The Lancet. 20 oct 2001;358(9290):1316-21.

163. Broughton-Head VJ, Shur J, Carroll MP, Smith JR, Shute JK. Unfractionated heparin reduces the elasticity of sputum from patients with cystic fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. nov 2007;293(5):L1240-1249.

164. Ehre C, Rushton ZL, Wang B, Hothem LN, Morrison CB, Fontana NC, et al. An Improved Inhaled Mucolytic to Treat Airway Muco-obstructive Diseases. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 15 janv 2019;199(2):171-80.

165. Carstairs JR, Nimmo AJ, Barnes PJ. Autoradiographic localisation of beta-adrenoceptors in human lung. Eur J Pharmacol. 3 août 1984;103(1-2):189-90.

166. Proskocil BJ. 2-Agonist and Anticholinergic Drugs in the Treatment of Lung Disease. Proceedings of the American Thoracic Society. 1 nov 2005;2(4):305-10.

167. Rogers DF. Motor control of airway goblet cells and glands. Respir Physiol. mars 2001;125(1-2):129-44.

168. Gosens R, Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. European Respiratory Journal [Internet]. 1 oct 2018 [cité 29 oct 2021];52(4). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/52/4/1701247

169. Wang Y, Ninaber DK, van Schadewijk A, Hiemstra PS. Tiotropium and Fluticasone Inhibit Rhinovirus-Induced Mucin Production via Multiple Mechanisms in Differentiated Airway Epithelial Cells. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020;10:278.

170. Derendorf H, Daley-Yates PT, Pierre LN, Efthimiou J. Systemic bioavailability of inhaled steroids: the importance of appropriate and comparable methodology. European Respiratory Journal. 1 janv 2001;17(1):157-8.

171. Lipworth BJ. Systemic Adverse Effects of Inhaled Corticosteroid Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. Archives of Internal Medicine. 10 mai 1999;159(9):941-55.

172. Pandya D, Puttanna A, Balagopal V. Systemic effects of inhaled corticosteroids: an overview. Open Respir Med J. 2014;8:59-65.

173. Chen Y, Nickola TJ, DiFronzo NL, Colberg-Poley AM, Rose MC. Dexamethasone-Mediated Repression of MUC5AC Gene Expression in Human Lung Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1 mars 2006;34(3):338-47.

174. Chen Y, Watson AM, Williamson CD, Rahimi M, Liang C, Colberg-Poley AM, et al. Glucocorticoid Receptor and Histone Deacetylase–2 Mediate Dexamethasone-Induced Repression of MUC5AC Gene Expression. Am J Respir Cell Mol Biol. 1 nov 2012;47(5):637-44.

175. Lu W, Lillehoj EP, Kim KC. Effects of dexamethasone on Muc5ac mucin production by primary airway goblet cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 1 janv 2005;288(1):L52-60.

176. Hart TK, Cook RM, Zia-Amirhosseini P, Minthorn E, Sellers TS, Maleeff BE, et al. Preclinical efficacy and safety of mepolizumab (SB-240563), a humanized monoclonal antibody to IL-5, in cynomolgus monkeys. J Allergy Clin Immunol. août 2001;108(2):250-7.

177. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med. 5 mars 2009;360(10):973-84.

178. Nair P, Wenzel S, Rabe KF, Bourdin A, Lugogo NL, Kuna P, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma. N Engl J Med. 22 mai 2017;

179. Aegerter H, Smole U, Heyndrickx I, Verstraete K, Savvides SN, Hammad H, et al. Charcot-Leyden crystals and other protein crystals driving type 2 immunity and allergy. Curr Opin Immunol. 16 avr 2021;72:72-8.

180. Ueki S, Hebisawa A, Kitani M, Asano K, Neves JS. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis–A Luminal Hypereosinophilic Disease With Extracellular Trap Cell Death. Frontiers in Immunology. 2018;9:2346.

181. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, Gevaert E, Aegerter H, Percier J-M, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. Science

[Internet]. 24 mai 2019 [cité 24 janv 2020];364(6442). Disponible sur: https://science.sciencemag.org/content/364/6442/eaaw4295

182. Extracellular DNA, Neutrophil Extracellular Traps, and Inflammasome Activation in Severe Asthma - PubMed [Internet]. [cité 29 oct 2021]. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30888839/

183. Kobayashi K, Nagase H, Sugimoto N, Yamamoto S, Tanaka A, Fukunaga K, et al. Mepolizumab decreased the levels of serum galectin-10 and eosinophil cationic protein in asthma. Asia Pac Allergy. 16 juill 2021;11(3):e31.

184. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. New England Journal of Medicine. 21 mai 2018;0(0):null.

185. Park S, Lee JH, Park JH, Park SH, Park SY, Jung YW, et al. Ocular surface disorders associated with the use of dupilumab based on WHO VigiBase. Sci Rep. 12 juill 2021;11(1):14293.

186. Byers DE. Defining the Roles of IL-33, Thymic Stromal Lymphopoietin, and IL-25 in Human Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1 oct 2014;190(7):715-6.

187. Diver S, Khalfaoui L, Emson C, Wenzel SE, Menzies-Gow A, Wechsler ME, et al. Effect of tezepelumab on airway inflammatory cells, remodelling, and hyperresponsiveness in patients with moderate-to-severe uncontrolled asthma (CASCADE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. The Lancet Respiratory Medicine [Internet]. 10 juill 2021 [cité 12 juill 2021];0(0). Disponible sur: https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(21)00226-5/abstract

188. Corren J, Parnes JR, Wang L, Mo M, Roseti SL, Griffiths JM, et al. Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. New England Journal of Medicine. 7 sept 2017;377(10):936-46.

189. Pelaia C, Pelaia G, Crimi C, Maglio A, Gallelli L, Terracciano R, et al. Tezepelumab: A Potential New Biological Therapy for Severe Refractory Asthma. Int J Mol Sci. 22 avr 2021;22(9):4369.

190. Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JAD, Criner GJ, et al. Azithromycin for Prevention of Exacerbations of COPD. New England Journal of Medicine. 24 août 2011;365(8):689-98.

191. Uzun S, Djamin RS, Kluytmans JAJW, Mulder PGH, Veer NE van't, Ermens AAM, et al. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet Respiratory Medicine. 1 mai 2014;2(5):361-8.

192. Wong C, Jayaram L, Karalus N, Eaton T, Tong C, Hockey H, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis (EMBRACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet. 18 août 2012;380(9842):660-7.

193. Altenburg J, de Graaff CS, Stienstra Y, Sloos JH, van Haren EHJ, Koppers RJH, et al. Effect of Azithromycin Maintenance Treatment on Infectious Exacerbations Among Patients With Non–Cystic Fibrosis Bronchiectasis: The BAT Randomized Controlled Trial. JAMA. 27 mars 2013;309(12):1251-9.

194. Hiles SA, McDonald VM, Guilhermino M, Brusselle GG, Gibson PG. Does maintenance azithromycin reduce asthma exacerbations? An individual participant data meta-analysis. European Respiratory Journal. 1 janv 2019;1901381.

195. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet. 12 août 2017;390(10095):659-68.

196. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. Thorax. avr 2013;68(4):322-9.

197. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Efficacy of azithromycin in severe asthma from the AMAZES randomised trial. ERJ Open Research [Internet]. 1 oct 2019 [cité 31 oct 2021];5(4). Disponible sur: https://openres.ersjournals.com/content/5/4/00056-2019

198. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics | PNAS [Internet]. [cité 31 oct 2021]. Disponible sur: https://www.pnas.org/content/111/45/15958

199. O'Reilly PJ, Jackson PL, Wells JM, Dransfield MT, Scanlon PD, Blalock JE. Sputum PGP is reduced by azithromycin treatment in patients with COPD and correlates with exacerbations. BMJ Open. 23 déc 2013;3(12):e004140.

200. Hodge S, Hodge G, Brozyna S, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. Eur Respir J. sept 2006;28(3):486-95.

201. Kobayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Higaki M, Mikura S, et al. A novel macrolide solithromycin exerts superior anti-inflammatory effect via NF-κB inhibition. J Pharmacol Exp Ther. avr 2013;345(1):76-84.

202. Shimizu T, Shimizu S. Azithromycin inhibits mucus hypersecretion from airway epithelial cells. Mediators Inflamm. 2012;2012:265714.

203. Imamura Y, Yanagihara K, Mizuta Y, Seki M, Ohno H, Higashiyama Y, et al. Azithromycin Inhibits MUC5AC Production Induced by the Pseudomonas aeruginosa Autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone in NCI-H292 Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1 sept 2004;48(9):3457-61.

204. Tanabe T, Kanoh S, Tsushima K, Yamazaki Y, Kubo K, Rubin BK. Clarithromycin inhibits interleukin-13-induced goblet cell hyperplasia in human airway cells. Am J Respir Cell Mol Biol. nov 2011;45(5):1075-83.

205. Lu S, Liu H, Farley JM. Macrolide antibiotics inhibit mucus secretion and calcium entry in Swine airway submucosal mucous gland cells. J Pharmacol Exp Ther. janv 2011;336(1):178-87.

206. Dombret M-C, Alagha K, Boulet LP, Brillet PY, Joos G, Laviolette M, et al. Bronchial thermoplasty: a new therapeutic option for the treatment of severe, uncontrolled asthma in adults. European Respiratory Review. 1 déc 2014;23(134):510-8.

207. Chanez P, Pahus L, Charriot J, Bourdin A. Severe asthma treated by bronchial thermoplasty: A success not due to the small airways? Respirology. mai 2019;24(5):402-3.

208. Pretolani M, Bergqvist A, Thabut G, Dombret M-C, Knapp D, Hamidi F, et al. Effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe refractory asthma: Clinical and histopathologic correlations. J Allergy Clin Immunol. avr 2017;139(4):1176-85.

209. Haj Salem I, Gras D, Joubert P, Boulet L-P, Lampron N, Martel S, et al. Persistent Reduction of Mucin Production after Bronchial Thermoplasty in Severe Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 15 févr 2019;199(4):536-8.

210. Slebos D-J, Degano B, Valipour A, Shah PL, Deslée G, Sciurba FC, et al. Design for a multicenter, randomized, sham-controlled study to evaluate safety and efficacy after treatment with the Nuvaira® lung denervation system in subjects with chronic obstructive pulmonary disease (AIRFLOW-3). BMC Pulmonary Medicine. 13 févr 2020;20(1):41.

211. Atanasova KR, Reznikov LR. Neuropeptides in asthma, chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis. Respiratory Research. 6 août 2018;19(1):149.

212. Shao MXG, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-α-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 1 août 2004;287(2):L420-7.

213. Shao MXG, Nadel JA. Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 18 janv 2005;102(3):767-72.

214. Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzaki H, Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. Eur Respir J. oct 2014;44(4):1002-10.

215. Hastie AT, Martinez FJ, Curtis JL, Doerschuk CM, Hansel NN, Christenson S, et al. Association of sputum and blood eosinophil concentrations with clinical measures of COPD severity: an analysis of the SPIROMICS cohort. The Lancet Respiratory Medicine. 1 déc 2017;5(12):956-67.

216. Dunican EM, Elicker BM, Gierada DS, Nagle SK, Schiebler ML, Newell JD, et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. J Clin Invest. 1 mars 2018;128(3):997-1009.

217. McDonald VM, Fingleton J, Agusti A, Hiles SA, Clark VL, Holland AE, et al. Treatable traits: a new paradigm for 21st century management of chronic airway diseases: Treatable Traits Down Under International Workshop report. European Respiratory Journal [Internet]. 1 mai 2019 [cité 5 nov 2021];53(5). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/53/5/1802058