



HAL
open science

Approche translationnelle du remodelage bronchique dans la broncho-pneumopathie chronique obstructive et l'asthme

Matthieu Thumerel

► **To cite this version:**

Matthieu Thumerel. Approche translationnelle du remodelage bronchique dans la broncho-pneumopathie chronique obstructive et l'asthme. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0418 . tel-01282052

HAL Id: tel-01282052

<https://theses.hal.science/tel-01282052>

Submitted on 3 Mar 2016

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ Biologie cellulaire et Physiopathologie

Par Matthieu THUMEREL

Né le 17 mai 1978 à Béthune

**APPROCHE TRANSLATIONNELLE DU REMODELAGE
BRONCHIQUE DANS LA BRONCHO-PNEUMOPATHIE
CHRONIQUE OBSTRUCTIVE ET L'ASTHME**

Sous la direction de : Roger MARTHAN

Soutenue le 17 Décembre 2015

Membres du jury :

Mme.	AMEDEE Joëlle	DR, INSERM	Présidente
M.	MATRAN Régis	PU-PH, Université de Lille 2	Rapporteur
M.	AUBIER Michel	PU-PH, Université Denis Diderot - Paris VII	Rapporteur
M.	MARTHAN Roger	PU-PH, Université de Bordeaux	Directeur de Thèse

A Johanna, Simon et « petit poulpe », mes AMOURS !

Remerciements

Je remercie :

Mme la Directrice de recherche Joëlle Amédée, Présidente. Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Votre implication et vos connaissances de biologie cellulaire dans la bio-ingénierie tissulaire rendent essentiel votre avis sur ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance.

Mr le Professeur Régis Matran, Rapporteur. Vous me faites l'honneur de rapporter cette thèse. Vos travaux sur la physiologie respiratoire pendant l'exercice physique et vos connaissances de l'asthme donnent à votre examen sur cette thèse toute sa pertinence.

Mr le Professeur Michel Aubier, Rapporteur. Votre implication dans la connaissance de l'asthme fait référence. Pionnier de la thermoplastie bronchique française, votre rapport de cette thèse n'en est que plus pertinent.

Mr le Professeur Roger Marthan, Directeur de thèse. Vous m'avez ouvert la voie de la recherche bordelaise en pneumologie et fait confiance au cours de cette thèse. Votre expertise en physiopathologie respiratoire est pour moi un exemple. Merci pour votre disponibilité, soyez assuré de ma profonde estime.

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le Centre de Recherche Cardio-Thoracique de l'Université de Bordeaux (INSERM, U1045) et au CHU de Bordeaux.

Je remercie chaleureusement les 2 équipes pour leur aide et leur patience à mes côtés. Plus particulièrement :

- mes collègues chirurgiens au quotidien, médecins, internes, infirmiers, aides-soignants, kinésithérapeutes et secrétaires médicales.

- mes compagnons « attachés de recherche clinique » : Thomas Royo-Lazaro et surtout Virginie Niel. Un grand Merci.

- mes nouvelles relations laborantines (Dupin I, Maurat E, Ousova O, Trian T, Rossignol R, Bara I, Allard B), Begueret Hugues, Dournes Gaël, Montaudon Michel, Laurent François, Girodet Pierre-Olivier et principalement Berger Patrick pour son éclairage scientifique très pragmatique voir chirurgical tout au long de ce travail.

Remerciements	3
Avant-propos	4
Liste des figures et tableaux	7
Liste des abréviations	9
Liste des publications pour cette thèse	11
Introduction	12
Chapitre I : Généralités	14
I-A BPCO	15
I-A-1 Description	15
I-A-2 Traitements actuels	20
I-A-3 Relation Fibrocyte/Poumon	22
I-A-3-a Identification des fibrocytes	22
I-A-3-b Mécanismes de réparation du parenchyme pulmonaire	25
I-A-3-c Relation fibrocyte et maladies pulmonaires	26
I-A-4 Perspectives	29
I-B Asthme	30
I-B-1 Description	30
I-B-3 Relation remodelage bronchique / asthme	35
I-B-3-a Principes généraux.....	35
I-B-3-b Rôle de la cellule musculaire lisse dans l’asthme	37
I-B-4 : Perspectives	41
I-C Endoscopie bronchique	42
I-C-1 Description	42
Article 1 : Endoscopie interventionnelle bronchique	43
I-C-2 Perspectives	44
I-C-2-a Diagnostique	44
I-C-2-b Thérapeutique	45
Chapitre II : Matériels et Méthodes	48
II-A Design des études	49
II-A-1 Design de Firebrob (chapitre III-A)	49
II-A-2 Design de Fibrochir (chapitre III-B)	49
II-A-2-a Population de l’étude	50
II-A-2-b Design de l’étude.....	50
II-A-3 Design de Remodel’asthme (chapitre III C)	51
II-A-4 Design de Mit’asthme (chapitre III-D)	52
II-B Méthodes employées	54
II-B-1 Firebrob	54
II-B-1-a Identification des fibrocytes circulants.....	54
II-B-1-b Migration des fibrocytes.....	54
II-B-1-c Dosage de CXCL12 et CCL11.....	54
II-B-1-d Analyse statistique.....	54
II-B-2 Fibrochir	54
II-B-2-a Identification des fibrocytes circulants.....	54
II-B-2-b Identification des fibrocytes péri-bronchiques.....	54
II-B-2-c Mesures scannographiques	55
II-B-2-d Mesures spirométriques.....	56
II-B-2-e Analyse statistique.....	56
II-B-3 Remodel’asthme	56

II-B-4 Mit'asthme	56
Chapitre III : Résultats et Discussion	57
III-A Etude des fibrocytes sanguins pendant et au décours d'une exacerbation de BPCO (Firebrob).....	58
Article 2 : Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4 dependent pathway.....	59
III-B Etude des fibrocytes sanguins et pulmonaires dans la BPCO à l'état stable (Fibrochir)	61
III-B-1 Caractéristiques des patients	61
III-B-2 Quantification des fibrocytes sanguins	65
III-B-3 Quantification des fibrocytes péri-bronchiques	68
III-B-4 Mesures scannographiques	69
III-B-5 Discussion	72
III-C Etude de l'effet d'inhibiteur calcique sur le remodelage bronchique du patient asthmatique sévère (Remodel'asthme)	73
Article 4: Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma: a proof-of-concept study	74
III-D Etude du remodelage du muscle lisse bronchique chez le patient asthmatique non-sévère (Mit'asthme).....	76
Article 5: Bronchial smooth muscle remodeling in non-severe asthma	77
IV Perspectives.....	79
IV-A BPCO et Fibrocyte	79
IV-B Asthme et remodelage bronchique	79
Bibliographie.....	81
Annexe des publications et communications de M Thumerel	90

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Score de CAT de la BPCO. Laboratoire GlaxoSmithKline	18
Figure 2 : Caractéristiques cellulaires de fibrocyte vs macrophage vs fibroblaste	23
Figure 3 : Image d'un fibrocyte en microscopie électronique (a)(19) décrivant un large noyau et des extensions à travers des fibres collagènes. Image d'un fibrocyte sanguin circulant (b) triplement marqué (cde) CD 45, CD34, pro-collagène I révélé en microscopie confocale(17).....	24
Figure 4 : Différentes voies de signalisation du fibrocyte dans l'inflammation (production d'IL 6,10, d'IFN- δ) et la destruction tissulaire (métalloprotéase, MMP) et dans la réparation tissulaire (production de MEC)(17).....	28
Figure 5 : Taux standardisés de mortalité par asthme, tous âges, France métropolitaine, 1990-1999 et 2000-2011.....	30
Figure 6 : Approche thérapeutique de l'asthme basée sur le contrôle de la maladie (GINA, 2013).....	34
Figure 7 : Altération de l'homéostasie calcique dans la CML occasionnant une prolifération et une contraction cellulaire.	38
Figure 8 : Mécanismes régulant l'infiltration des mastocytes dans le MLB.....	39
Figure 9 : Corrélation histologique d'image endocoronarienne obtenue par OCT(111) (A : plaque fibreuse, B : plaque calcifiée, C : dépôts lipidiques).....	45
Figure 10 : Cathéter de thermoplastie endobronchique.....	46
Figure 11 : Valve endobronchique Zephyr déployée et intrabronchique au niveau du lobe supérieur gauche (*2).	47
Figure 12 : Design de l'étude Firebrob.....	49
Figure 13 : Design de l'étude Remodelasthme.....	52
Figure 14 : Design de l'étude Mitasthme.	53
Figure 15 : IHC de parenchyme pulmonaire doublement marqué CD45 en rouge et collagène en marron.	68

Tableau 1 : Evolution avec l'âge du déclin du VEMS en fonction du statut tabac (Fletcher, Oxford University Press, 1976).....	16
Tableau 2 : Stades GOLD de sévérité de la BPCO (avant 2011).....	16
Tableau 3 : index de BODE (sévérité croissante en quartile de 0 à 4 en fonction des points accumulés).....	19
Tableau 4: Thérapeutiques de la BPCO en fonction du degré de sévérité.....	20
Tableau 5 : Degré de sévérité de l'asthme en fonction de la clinique et de l'EFR.....	32
Tableau 6 : Sévérité de l'asthme en fonction de la clinique et du traitement.....	32
Tableau 7: Critères de contrôle de l'asthme selon les recommandations internationales du GINA (Global INitiative for Asthma).....	33
Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et fonctionnelles des patients Fibrochir.....	62
Tableau 9: Caractéristiques cliniques et fonctionnelles des patients BPCO de Fibrochir.....	64
Tableau 10 : Répartition des cellules sanguines chez les patients Fibrochir.....	65
Tableau 11 : Corrélation de Pearson entre le pourcentage de fibrocytes sanguins dans les NANT et les sous-sections 2S6 et 2S7 du questionnaire Saint-Georges.	66
Tableau 12 : Corrélation de Pearson entre les pourcentages de fibrocytes sanguins et les sous-sections du questionnaire Saint-Georges.	66
Tableau 13 : Répartition des cellules sanguines chez les patients BPCO de Fibrochir.....	67
Tableau 14 : Caractéristiques scannographiques du parenchyme des patients Fibrochir.....	69
Tableau 15 : Caractéristiques scannographiques des bronches des patients Fibrochir.....	70
Tableau 16: Caractéristiques scannographiques de la vascularisation pulmonaire des patients Fibrochir.....	71

Liste des abréviations

ACOS : Asthma COPD Overlap Syndrome
ACQ : Asthma control questionnaire
ALT : Antileucotriène
APC : Antigen-presenting cell
ATP/AMP : Adénosine (tri/mono) phosphate
BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive
BSA : Bovine seric albumin
CamKIV : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
CawNO : Concentration en NO de la paroi bronchique
CAT : COPD assessment test
CBP/p300 : CREB-binding protein/p300
CCL/CXC : Chimiochine
CDK : Cycline-dépendant kinase
C/EBP α : CCAAT enhancer-binding protein α
CML : Cellule musculaire lisse
Cox-2 : Cyclooxygénase-2
CPT : Capacité pulmonaire totale
CSA : Cross sectional area
CSN : Cross sectional number
CVF : Capacité vitale forcée
DAB : Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DawNO : Diffusion du NO
DEMM25-75 : Débit expiratoire maximal médian entre 25 et 75% de la CVF
DMEM : Dulbecco's modified eagles medium
DMSO : Dimethyl sulfoxide
EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EFR : Epreuve fonctionnelle respiratoire
EGFR : Epidermal growth factor receptor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS : NOS endothéliale
ET 1 : Endothéline 1
FANO : Fraction alvéolaire de NO
GINA : Global initiative for asthma
GOLD : Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HES : Hématoxyline-Éosine-Safran
HIF-1 α : Hypoxy induce factor-1 α
HIV : Human immunodeficiency virus
HRB : Hyperréactivité bronchique
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
ICAM-1 : Inter-cellular adhesion molecule-1
ICS : Corticothérapie inhalée
IFN- γ : Interferon- γ
IKK : I κ B kinase
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IMC : Indice de masse corporelle
iNOS : NOS inductible
J'awNO : NO bronchique
LA : Lumen area

LAA% : low attenuation area
LABA : β -2 agoniste de longue durée d'action
LBA : Lavage broncho-alvéolaire
LD : Lumen diameter
LXA4 : Lipoxine A4
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MBP : Major basic protein
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1
MCT : Mastocyte de type T
MCTC : Mastocyte de type TC
MEC : Matrice extra-cellulaire
MLB : Muscle lisse bronchique
MLCK : Myosin light chain kinase
MLCP : Myosin light chain phosphatase
MMP : Métalloprotéinase
mtTFA : Mitochondrial transcription factor A
NANTc : Non adherent Non T cell
nDNA : ADN nucléaire
NE : Neutrophil elastase
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NK-T : Natural killer T cell
NO : Monoxyde d'azote
OCS : Corticothérapie orale
OCT : Optical coherence tomography
PA : Paquet-année
PAR-2 : Protease activated receptor-2
PBMC : Peripheral Blood mononuclear cell
PCR : Polymerase chain reaction
PBS : Phosphate buffered saline
PC20 : Provocative concentration
PDGF : Platelet derived growth factor
PFA : Paraformaldéhyde
PKA : Protéine kinase A
SDF-1 : Stromal cell derived factor 1
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigue
 α -SMA : Alpha-smooth muscle actin
TDM : Tomodensitométrie
TGF- β : Transforming growth factor- β
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR : Toll like recepteur
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
TNF-R : Tumor necrosis factor-receptor
UH : Unités Hounsfield
VA : Voies aériennes
V' : Débit expiratoire
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEMS : Volume expiratoire maximum en une seconde
VIP : Vasoactive intestinal peptide
V'NO : Débit de NO
VR : Volume résiduel
WA : Wall area
WT : Wall Thickness

Liste des publications pour cette thèse

Publications acceptées :

1 : Girodet PO, Dournes G, Thumerel M, Begueret H, Dos Santos P, Ozier A, Dupin I, Trian T, Montaudon M, Laurent F, Marthan R, Berger P. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. Am J Respir Crit Care Med. 2015 Apr 15;191(8):876-83.

2 : Dupin I, Allard B, Ozier A, Maurat E, Ousova O, Delbrel E, Trian T, Bui H-N, Dromer C, Guisset O, Blanchard E, Hilbert G, Vargas F, Thumerel M, Marthan R, Girodet P-O, Berger P. Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4-dependent pathway. J Allergy Clin Immunol, 2015, sous presse.

3 : Girodet P-O, Allard B, Thumerel M, Begueret H, Dupin I, Ousova O, Lassalle R, Maurat E, Ozier A, Trian T, Marthan R, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling in non-severe asthma, Am J Respir Crit Care Med, 2015, sous presse.

4 : Thumerel M, Roze H, Velly J-F, Jougon J. Endoscopie bronchique interventionnelle. Chapitre 87 du livre « Réanimation », sous presse.

Publications en préparation :

1 : Thumerel M, Dupin I, Girodet P-O, Dournes G, Trian T, Begueret H, Maurat E, Ousova O, Montaudon M, Marthan R, Berger P. In situ localization of fibrocytes in distal airways of COPD.

Introduction

L'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) sont deux maladies pulmonaires à fortes incidences. Toutes deux ont des phénotypes communs ou classiques et des variables voir frontières entre les deux (bronchopathie asthmatiforme, asthme obstructif chronique, « asthma-COPD overlap syndrome » (ACOS)(1)). Elles décrivent une obstruction bronchique plus ou moins permanente, des facteurs déclenchant, une inflammation, un remodelage pulmonaire, des exacerbations, une sévérité variable corrélée à la qualité de vie des patients. Ainsi dans l'asthme sévère, le remodelage bronchique est associé en partie à l'augmentation de la masse musculaire lisse bronchique qui est corrélée au déclin de la fonction respiratoire(2). Dans la BPCO, l'atteinte cumulée après chaque exacerbation se fait en partie par une réponse inflammatoire couplée à des phénomènes de remodelage et de réparation qui épaississent la paroi bronchiolaire(3) et augmentent l'obstruction. Dans le poumon emphysémateux, correspondant à la destruction parenchymateuse, on retrouve ces mêmes cellules inflammatoires.

Ce travail de thèse vient s'ajouter à de nombreuses études sur la compréhension de mécanismes physiopathologiques du remodelage bronchique et parenchymateux de ces deux pathologies.

D'un coté, nous avons cherché à investiguer le rôle que pourraient avoir les fibrocytes sanguins et pulmonaires dans la BPCO en exacerbation puis à l'état stable. Ceux-ci sont déjà largement étudiés dans d'autres pathologies comme la fibrose pulmonaire idiopathique(4)(5), l'asthme(6), l'hypertension artérielle pulmonaire(7)(HTAP), la bronchiolite oblitérante post-transplantation pulmonaire(8)(9) mais relativement peu, voire pas, dans la BPCO.

D'un autre coté, nous nous sommes basés sur des études fondamentales du remodelage bronchique pour étudier la réponse clinique d'un nouveau médicament (inhibiteur calcique) dans l'asthme sévère et nous avons poursuivi les recherches sur le remodelage bronchique dans l'asthme non-sévère.

Cette thèse se compose de quatre grandes parties :

-Chapitre I : généralités. Cette partie revient sur la description des deux pathologies avec leurs traitements accessibles en 2015 et fait une revue didactique

de la relation Fibrocyte/Poumon pour la partie BPCO et du remodelage bronchique pour la partie asthme. Le rôle de l'endoscopie bronchique est décrit.

-Chapitre II : matériels et méthodes. Différentes méthodes et mises au point durant ces travaux de thèse sont présentées

-Chapitre III : résultats et discussion. D'un côté, le travail sur la relation Fibrocyte/BPCO est présenté sous forme d'un article sous presse dans le « Journal of Allergy and Clinical Immunology » et sous la forme d'un travail en cours de finalisation. De l'autre, le travail sur la relation Remodelage musculaire lisse bronchique/Asthme sévère ou non est présenté sous la forme de deux articles ; un publié dans l'American journal of respiratory and critical care medicine et un sous presse dans le même journal.

-Chapitre IV : conclusion et perspective. Les résultats des études présentées ouvrent les portes de perspectives d'études futures, fondamentales et thérapeutiques brièvement présentées.

Chapitre I : Généralités

I-A BPCO

I-A-1 Description

La broncho-pneumopathie chronique obstructive ou BPCO est une maladie respiratoire chronique et l'une des principales causes de décès et d'invalidité en France. Elle atteint en majorité des hommes et femmes de plus de 40 ans fumeurs actifs ou sevrés.

Epidémiologie

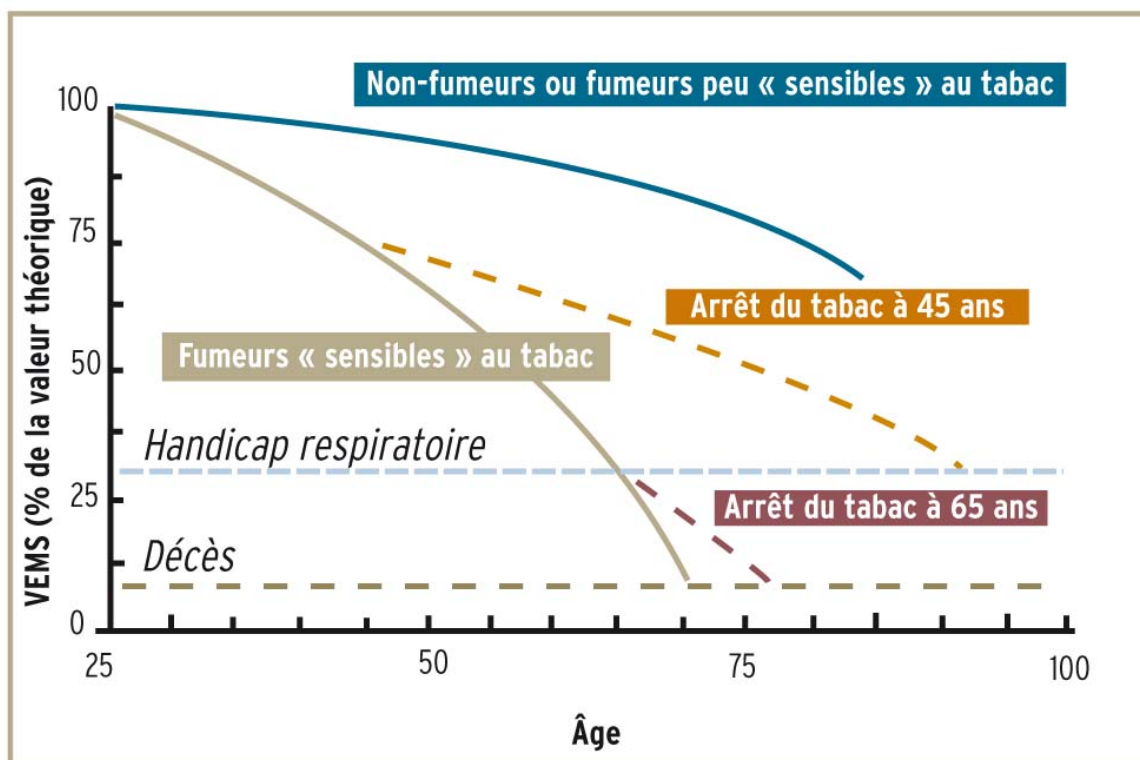
L'OMS estime que 64 millions de personnes souffrent de BPCO à travers le monde et que, en 2030, elle pourrait être la troisième cause de mortalité. En 2005, elle représentait déjà 5%, soit 3 millions, des décès dans le monde. Ces estimations sont probablement sous-estimées compte-tenu d'une distribution essentiellement dans les pays pauvres.

Définition

La BPCO se définit par des critères fonctionnels respiratoires d'obstruction bronchique chronique « pas totalement réversible » (Indice de Tiffeneau inférieur à 0,7 ; Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) variable). Les patients présentent le plus souvent une bronchite chronique (toux chronique pendant au moins 3 mois, au moins deux années consécutives) même si celle-ci n'est pas forcément à rattacher à une BPCO s'il n'y a pas d'obstruction fonctionnelle. De même, l'emphysème qui caractérise une destruction parenchymateuse pulmonaire ne fait partie de la BPCO que s'il s'y associe cette même obstruction fonctionnelle. L'emphysème et la bronchite chronique peuvent coexister, même si un phénotype prédomine souvent sur l'autre. Il existe une limitation inspiratoire, surtout à l'exercice, due à une hyperinflation pulmonaire, l'air restant trappé dans le poumon du fait de l'obstruction. Les exacerbations majorent ce phénomène. La distinction entre asthme et BPCO est parfois difficile (notamment chez les personnes âgées ou les fumeurs) fonctionnellement car il est possible d'avoir une obstruction irréversible chez un patient asthmatique sévère qui présente un remodelage important mimant une BPCO, comme il est possible d'avoir une obstruction franchement réversible chez un patient BPCO mimant un asthme ; d'où la création d'un phénotype intitulé ACOS(1) avec une prise en charge diagnostique bien détaillée en 2015 dans un rapport GINA (Global Initiative for Asthma) /GOLD (Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease)(10).

L'obstruction est généralement progressive, associée à une réponse inflammatoire anormale et à des conséquences systémiques en réponse à des éléments toxiques inhalés. Cette obstruction résulte d'une contraction du muscle lisse bronchique, d'une accumulation de mucus endo-bronchique, d'une augmentation de l'épaisseur bronchique et de zone d'emphysème. Le poumon perd de son élasticité alors que de la fibrose s'installe. L'inflammation dans la BPCO est sous-tendue essentiellement par les polynucléaires neutrophiles et/ou les lymphocytes CD8. Le tabac est le principal facteur de risque de développement de la maladie. Le rôle de la pollution atmosphérique est certain et probablement sous-estimé. Une prédisposition génétique interfère probablement (alpha-1 antitrypsine au moins).

Tableau 1 : Evolution avec l'âge du déclin du VEMS en fonction du statut tabac (Fletcher, Oxford University Press, 1976)



On classe la BPCO en stade de GOLD de 1 à 4, 0 étant une bronchite chronique à EFR normale.

Tableau 2 : Stades GOLD de sévérité de la BPCO (avant 2011)

	Stades	Obstruction bronchique	EFR
	0	à risque	EFR normale symptômes chroniques (toux, expectoration)
		Obstruction	VEMS/CVF < 70 %
	I	légère	VEMS ≥ 80 % avec/sans symptômes chroniques (toux, expectoration)
	II	modérée	50 % ≤ VEMS < 80 % avec/sans symptômes chroniques (toux, expectoration, dyspnée)
	III	sévère	30 % ≤ VEMS < 50 % avec/sans symptômes chroniques (toux, expectoration, dyspnée)
	IV	très sévère	VEMS < 30 % ou VEMS ≤ 50 % plus insuffisance respiratoire (PaO ₂ < 60mmHg avec/sans PaCO ₂ > 50mmHg) ou insuffisance cardiaque droite clinique

Cette sévérité est jugée sur le VEMS post-bronchodilatateur (classiquement 400µg de salbutamol, voir 160µg d'anticholinergique ou les 2 associés). Les critères de réversibilité sont ceux de l'asthme car GOLD ne considère pas le degré de réversibilité comme un élément du diagnostique différentiel avec l'asthme.

Alors que la définition est fonctionnelle sur l'indice de Tiffeneau et le VEMS, la clinique reste très variable comme en témoigne l'indépendance des comorbidités, de la dyspnée, du test de marche de 6 minutes, du nombre d'exacerbation par an et finalement de l'état clinique général du patient.

L'actualisation GOLD 2011 définit 4 groupes de risque croissant d'exacerbation en intégrant les symptômes (échelle de dyspnée mMRC, score du CAT), le nombre d'exacerbations par an et la spirométrie ; le paramètre le plus défavorable fixant le niveau de sévérité :

- Groupe A : risque bas, peu de symptômes : GOLD I ou II et/ou 0-1 exacerbation/an et mMRC grade 0-1 ou CAT < 10

- Groupe B : risque bas, plus de symptômes : GOLD I ou II et/ou 0-1 exacerbation/an et mMRC grade ≥ 2 ou CAT ≥ 10

- Groupe C : risque élevé, peu de symptômes : GOLD III ou IV et/ou ≥ 2 exacerbations/an et mMRC grade 0-1 ou CAT < 10

- Groupe D : risque élevé, plus de symptômes : GOLD III ou IV et/ou ≥ 2 exacerbations/an et mMRC grade ≥ 2 ou CAT ≥ 10

Echelle de dyspnée du Medical Research Council (MRC)

- Stade 0 : Gène uniquement pour un effort intense

- Stade 1 : Essoufflé pour une marche rapide à plat ou une légère côte

- Stade 2 : Marche plus lentement que des personnes du même âge ou doit faire des pauses à cause de sa dyspnée


- Stade 3 : Doit s'arrêter pour reprendre son souffle après une marche d'une centaine de mètres ou après quelques minutes

- Stade 4 : Est trop essoufflé pour sortir de chez lui ou est essoufflé en s'habillant ou se déshabillant

Figure 1 : Score de CAT de la BPCO. Laboratoire GlaxoSmithKline

Nom:

Date:



Quel est l'état de votre BPCO? Répondez au questionnaire CAT (COPD Assessment Test™) pour évaluer votre BPCO

Ce questionnaire vous aidera, ainsi que votre médecin, à mesurer l'impact de la BPCO (BronchoPneumopathie Chronique Obstructive) sur votre bien-être et votre vie au quotidien. Vous pourrez, ainsi que votre médecin, utiliser les réponses et les scores du questionnaire pour mieux prendre en charge votre BPCO et obtenir le meilleur bénéfice de votre traitement.

Pour chaque élément ci-dessous, veuillez indiquer d'une croix (x) la case qui correspond le mieux à votre état actuel. Prenez soin de ne sélectionner qu'une seule réponse par question.

Exemple: Je suis très heureux (heureuse) 0 1 2 3 4 5 Je suis très triste

	POINTS
Je ne tousse jamais <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je tousse tout le temps	<input type="text"/>
Je n'ai pas du tout de glaires (mucus) dans les poumons <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 J'ai les poumons entièrement encombrés de glaires (mucus)	<input type="text"/>
Je n'ai pas du tout la poitrine oppressée <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 J'ai la poitrine très oppressée	<input type="text"/>
Quand je monte une côte ou une volée de marches, je ne suis pas essouffé(e) <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Quand je monte une côte ou une volée de marches, je suis très essouffé(e)	<input type="text"/>
Je ne suis pas limité(e) dans mes activités chez moi <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je suis très limité(e) dans mes activités chez moi	<input type="text"/>
Je ne suis pas inquiet(e) quand je quitte la maison, en dépit de mes problèmes pulmonaires <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je suis très inquiet(e) quand je quitte la maison, en raison de mes problèmes pulmonaires	<input type="text"/>
Je dors bien <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je dors mal à cause de mes problèmes pulmonaires	<input type="text"/>
Je suis plein(e) d'énergie <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je n'ai pas d'énergie du tout	<input type="text"/>
SCORE TOTAL	<input style="width: 50px; height: 30px;" type="text"/>

Le questionnaire CAT (COPD Assessment Test) et le logo sont des marques déposées du laboratoire GlaxoSmithKline. © 2009 GlaxoSmithKline. Tous droits réservés.

L'index de BODE pour « Body mass index, degree of airflow Obstruction, Dyspnea and Exercice capacity » est un autre marqueur de sévérité de la BPCO car corrélé directement à la survie. Il se calcule de la manière suivante:

Tableau 3 : index de BODE (sévérité croissante en quartile de 0 à 4 en fonction des points accumulés)

(additionner les points par item pour obtenir le total)				
Points	0	1	2	3
VEMS (%)	> ou = 65	50 - 64	36 - 49	< ou = 35
Distance en 6 min (mètres)	> ou = 350	250-349	150-249	< ou = 149
Dyspnée (MMRC)	0-1	2	3	4
IMC (kg/m ²)	> 21	<ou= 21		

De la même manière, l'index COTE pour « COPD specific comorbidity test » intègre 12 comorbidités, jusque-là non prises en compte, qui détériore la survie :

- cancer pulmonaire, pancréatique, oesophagien, mammaire
- fibrose pulmonaire
- fibrillation/flutter atrial, coronaropathie, insuffisance cardiaque
- diabète avec neuropathie
- anxiété
- ulcère gastroduodéal, cirrhose

Le risque de décès augmente avec l'index, indépendamment du BODE. Le COTE semble être une aide d'évaluation du risque de mortalité dans la BPCO(11). Une attention particulière sera portée aux comorbidités cardio-vasculaires ainsi qu'aux différents épisodes d'exacerbation qui interfèrent dans la survie de ces patients(12).

Les symptômes, le retentissement sur les activités et l'impact de la BPCO peuvent être appréciés par le questionnaire Saint-Georges. La BPCO peut être prévenue et traitée sur la part réversible de l'obstruction.

Aucun traitement n'est capable de modifier le cours de la maladie et le lent déclin de la fonction pulmonaire. Les mesures et traitements mis en place servent à traiter les symptômes et éviter l'évolution vers l'insuffisance respiratoire terminale.

I-A-2 Traitements actuels

La première mesure reste l'éviction des facteurs de risque, le premier étant le tabac pour lequel il ne faut pas de complaisance. Il faut donc toujours mettre l'accent sur la lutte anti-tabac et aider les patients désireux du sevrage. La lutte contre la pollution atmosphérique est plus du domaine géopolitique que individuel (même si des mesures de protection contre des pollutions professionnelles doivent être proposées) et s'intégrera probablement dans la lutte contre le réchauffement climatique. L'évitement des infections respiratoires est primordiale : vaccinations anti-grippale et anti-pneumococcique, mesures hygiéno-diététiques(13).

L'escalade thérapeutique se fait en fonction du degré de sévérité de la maladie avec une action essentiellement anti-obstructive au départ (bronchodilatateurs à courte puis longue durée d'action) puis une action anti-inflammatoire (corticoïdes inhalés) et enfin une action palliative (oxygénothérapie à domicile, transplantation pulmonaire).

L'importance des comorbidités est soulignée, dans le tableau suivant, par la réhabilitation fonctionnelle qui doit être respiratoire mais aussi générale (lutte contre dépression, réserve musculaire, masse maigre, anémie). Elle doit être proposée au patient dyspneique au moindre effort.

Tableau 4: Thérapeutiques de la BPCO en fonction du degré de sévérité

Degré de sévérité (tous : VEMS/CV<0.7)				
A risque	I : légère VEMS : > 80 %	II : modérée VEMS : 50-80 %	III : sévère VEMS : 30-50 %	IV : très sévère VEMS : < 30 %
Éviction du (des) facteur(s) de risque; vaccination antigrippale.				
+ Bronchodilatateur à courte durée d'action à la demande.				
+ Bronchodilatateur à longue durée d'action + réhabilitation				
+ Corticoïdes inhalés + Bronchodilatateur à longue durée d'action si exacerbations répétées				
				- ± OLD si insuffisance respiratoire - Envisager les traitements chirurgicaux.

Les traitements médicamenteux sont les suivants. Les bronchodilatateurs de courte durée d'action s'utilisent au besoin pour améliorer l'essoufflement. Les bronchodilatateurs de longue durée d'action (beta-2 agonistes ou anticholinergiques) s'utilisent dès le stade 2 en cas de dyspnée modérée. Les corticoïdes inhalés s'utilisent en association aux précédents. Leur usage isolé en monothérapie semble non efficace. Les corticoïdes oraux sont généralement prescrits sur une courte

période de 4 à 6 jours quand des symptômes de bronchite persistent. Ils ne sont pas recommandés sur le long cours. Les théophyllines ne sont pas recommandées en première intention. Les antibiotiques sont prescrits en cas d'exacerbation à trigger infectieux et non recommandés sur le long cours. Une ventilation non invasive en pression positive améliore les gaz du sang, réduit la mortalité et le séjour hospitalier et diminue le recours à une ventilation mécanique. L'oxygénothérapie est prescrite en fonction de deux gaz du sang réalisés en air ambiant(14). Son administration chez l'insuffisant respiratoire chronique plus de 15 h par jour augmente la survie. Les agents anti-oxydants (comme la N-acétylcystéine) semble réduire les exacerbations, sans effet sur la qualité de vie. Le but reste le contrôle des symptômes et des exacerbations, l'amélioration de la qualité de vie et de la tolérance à l'exercice. Aucun traitement n'a montré de bénéfice à long terme sur le déclin de la fonction respiratoire.

Les valves endo-bronchiques (en cas de zone cible de poumon trappé et de scissure complète) vise à l'amélioration de la fonction respiratoire, du piégeage des gaz et des échanges gazeux comme en témoigne l'étude de Davey(15). Leur usage en routine n'est pas recommandé. Leur balance bénéfice/risque est en cours d'étude.

Les traitements chirurgicaux sont de 2 ordres :

- la réduction de volume pulmonaire enlève de l'espace mort et donc diminue le volume résiduel et augmente la compliance pulmonaire pour une meilleure oxygénation. Cette chirurgie permet le plus souvent de retarder la mise sur liste de transplantation pulmonaire. Elle est moins proposée depuis l'innovation technique des valves endo-bronchiques. La sélection des patients éligibles doit être stricte(16) : privilégier les patients avec emphysème lobaire supérieur et une capacité d'exercice pauvre après rééducation mais VEMS et TLCO > 20%.

- la transplantation pulmonaire reste l'étape ultime du traitement de l'insuffisance respiratoire terminale sur BPCO.

Les projets thérapeutiques dans la BPCO sont axés sur l'identification de nouvelles cibles et l'amélioration des médicaments existants sur celles-ci en privilégiant la voie d'administration inhalée : médicament anti-élastase, anti-métalloprotéase MMP9.

L'explication de la dégradation progressive d'un patient BPCO se limitant souvent aux nombres d'exacerbations (« un BPCO se dégrade à chaque exacerbation ») ou à l'impossibilité d'éliminer les facteurs de risque (« Docteur, je n'arrive pas à arrêter de fumer ! »), nous nous intéressons à la cause de la détérioration du parenchyme pulmonaire et notamment aux processus cicatriciels qui surviennent après chaque agression. Ceux-ci pourraient impliquer les fibrocytes, cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle capable de transformation en fibroblaste et myofibroblaste déjà connus dans de nombreuses pathologies pulmonaires mais non explorés dans la BPCO. Leur implication pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution du parenchyme pulmonaire et du remodelage bronchique essentiellement distal dans la BPCO.

I-A-3 Relation Fibrocyte/Poumon

I-A-3-a Identification des fibrocytes

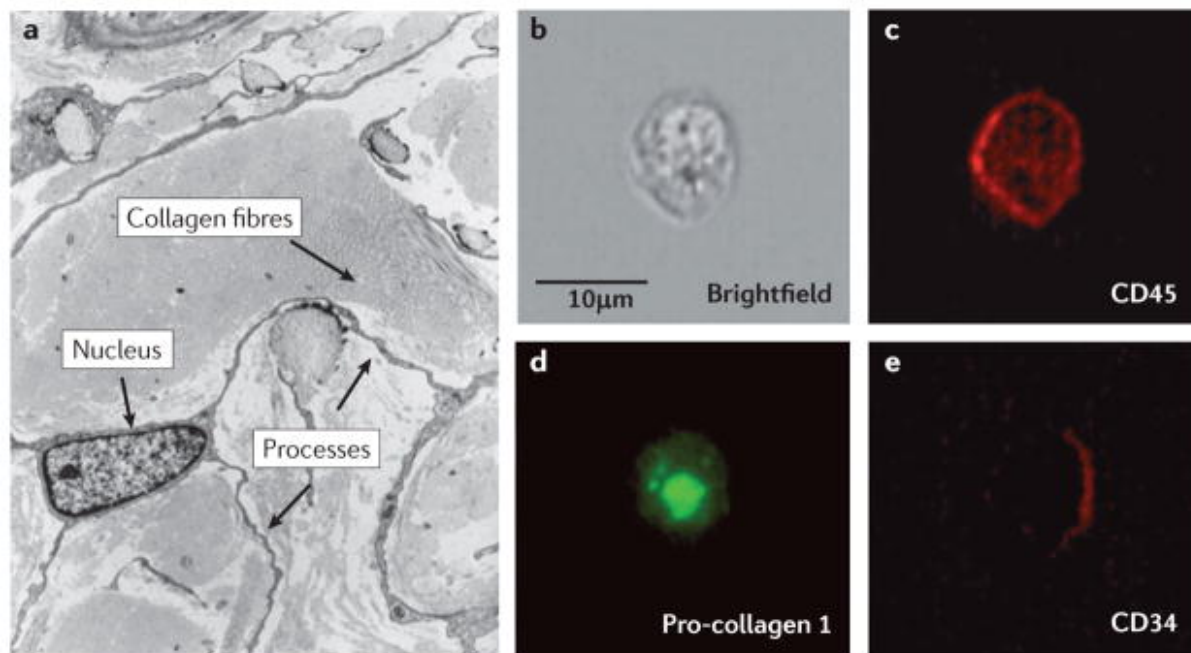
Les fibrocytes sont des cellules progénitrices mésenchymateuses dérivées de la moelle (précurseur monocyttaire) qui se caractérise, au minimum, par un double marquage hématopoïétique (CD34 ou 45) et mésenchymateux (Collagène I , III, pro-collagène)(17). Ils ont été décrits pour la première fois en 1994 par Bucala(18). Ils sont présents dans les organes agressés pour répondre à un stimulus inflammatoire et un besoin de cicatrisation tissulaire. Les stimuli de l'inflammation régulent leur différenciation, leur trafic et leur accumulation quand ces besoins sont nécessaires. Cela a été relativement bien étudié dans des maladies inflammatoires comme l'asthme et des maladies fibrosantes comme la fibrose pulmonaire idiopathique.

La figure 2 montre les caractéristiques morphologiques décrites dans la littérature de fibrocyte vs macrophage vs fibroblaste.

Figure 2 : Caractéristiques cellulaires de fibrocyte vs macrophage vs fibroblaste

Property	Fibrocyte	Macrophage	Fibroblast
Morphology in sections or culture	Large, spindle-shaped when adherent	Large, rounded	Large, spindle-shaped
Functions			
Cytokine production	++	++	+
Immune cell trafficking	++	++	+
ECM production	++	±	++
αSMA production	+	–	++
Lipid metabolism	+	+	–
Antigen presentation	++	++	–
Angiogenesis	+	+	+
MMP production	+	+	+
Chitinase production	+	+	–
Adhesion and motility markers			
CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD43, CD164, galectin 3, LSP1	+ or ++	+ or ++	–
CD34	+	–	–
CD29, CD44, CD81, ICAM1, CD49 complex, CD81	+	+	+
Cell surface enzymes			
CD10, CD172a, CD45	+	+	–
CD13, prolyl 4-hydroxylase	+	+	+
FAP	+	–	+
Scavenging receptors and molecules involved in host defence			
CD14, CD68, CD163, CD206, CD209, CD35, CD36	±	+	–
Fcγ receptors			
CD16, CD32a, CD32b, CD32c	+ or ++	+ or ++	–
Chemokine receptors			
CCR4, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR4, CX ₂ CR1	+ or ++	+	–
Cell-surface molecules involved in antigen presentation			
CD54, CD80, CD86, MHC class I and II	+	+	–
Extracellular matrix proteins			
Collagens I, III and IV, vimentin, tenascin	+	±	++

Figure 3 : Image d'un fibrocyte en microscopie électronique (a)(19) décrivant un large noyau et des extensions à travers des fibres collagènes. Image d'un fibrocyte sanguin circulant (b) triplement marqué (cde) CD 45, CD34, pro-collagène I révélé en microscopie confocale(17).



Le CD34 permet une identification de fibrocyte sanguin et de culture (vs macrophage / fibroblaste CD34-). Le CD45 confirme une origine hématopoïétique (fibroblaste non CD45-)(Figure 3). Des protéines d'adhésion et présentatrices d'antigène sont décrites comme CD11b,c,d, CMH 1 et 2(20), CD80, CD86. Le fibrocyte produit du collagène I, III, IV et V, de la fibronectine, de la vimentine et de la prolyl-hydroxylase.

Ces différents marqueurs supposent un rôle des fibrocytes sur la matrice extracellulaire et le recrutement de cellules inflammatoires.

Il n'est pas retrouvé de marqueurs lymphocytaires comme CD3, CD4, CD8, CD19 et CD25 sur les fibrocytes. Le CD14 (marqueur myéloïde d'éventuel précurseur) est négatif sur les fibrocytes circulants, la transition de CD14+ à CD14- n'étant pas clairement expliquée à l'heure actuelle. Les premières études se sont intéressées au taux de fibrocytes circulants dans le sang périphérique (excluant ainsi les macrophages matures et les fibroblastes) essentiellement par cytométrie en flux. Les études suivantes sur culture cellulaire et analyse de tissu posent le problème du risque de confusion avec les macrophages en utilisant uniquement les marqueurs (qui permettent la différenciation avec les fibroblastes CD45-). La morphologie de fibrocyte adhérent (en forme de fuseau) permet de le différencier de macrophage (plus sphérique). Au total une co-identification marqueur + morphologie permettrait de lever les confusions. On estime entre 0,1 et 0,5% de fibrocyte dans les leucocytes circulants de sujet sain. Il n'a pas été retrouvé de fibrocyte dans le parenchyme pulmonaire sain pour le moment. Peu d'études explorent les fibrocytes en immunohistochimie ; la plupart utilise l'immunofluorescence et/ou la microscopie confocale pour le repérage des fibrocytes (le plus souvent CD34 ou CD45+/collagène ou pro-collagène+).

Sous stimulation par IL-1 β , le fibrocyte produit des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines IL-6, IL-8, IL10, le TNF (Tumor Necrosis

Factor) et des métalloprotéases comme MMP-9(21). Les récepteurs à chimiokines CCR2, CCR3, CCR5, CCR7 et CXCR4 ont été retrouvés sur les fibrocytes humains(22).

I-A-3-b Mécanismes de réparation du parenchyme pulmonaire

Lors d'une agression, les trois compartiments pulmonaires représentés par l'épithélium, l'endothélium et le mésenchyme nécessitent réparation. La clé de cette réparation est probablement dans la néoangiogenèse dont la cellule endothéliale est la voie. Des cellules progénitrices endothéliales sont décrites notamment après lésion induite par l'élastase(23) et leur taux sanguin semble corrélé à la survie de patient présentant un SDRA (24)(syndrome de détresse respiratoire aigu). Au niveau de l'épithélium, les pneumocytes II sont considérés comme progéniteurs des pneumocytes I dans la re-épithélialisation. Le phénomène est fondamental pour éviter des lésions cicatricielles type fibrose ou emphysème. Les cellules du mésenchyme constituent la voie du remodelage de la matrice extra-cellulaire (MEC) et notamment de dépôt accru de collagène constaté dans la fibrose. Le myofibroblaste a concentré les attentions étant donné ses capacités de production en collagène et cytokines profibrotiques (TGF- β , transforming growth factor). Il est caractérisé par un marquage cellulaire en α -SMA (alpha smooth muscle actin). Le fibrocyte peut se différencier en myofibroblaste comme en témoigne la perte du CD34 et l'apparition d'une expression d'alpha-smooth muscle actin(25)(26). Alors que les fibroblastes sont décrits de manière éparses en péri-bronchique et péri-adventiciel du poumon sain, le modèle animal de fibrose induite par la bléomycine montre une accumulation de fibroblastes et une différenciation en myofibroblastes sous stimulation par TGF- β , IL-4, IL 13. Les fibroblastes sont considérés comme des éléments clés de la physiopathologie de la fibrose notamment pulmonaire. Ils se localisent dans des zones considérées comme de la fibrose active sous forme de « Fibroblaste Foci »(FF). Ils sont des éléments clés du diagnostic de pneumopathie interstitielle commune (UIP)(27). Les fibroblastes semblent avoir une grande plasticité (28):

- leur origine pourrait être une transition épithélio-mésenchymateuse (constatée dans le rein(29)) ou endothélio-mésenchymateuse (constatée dans le poumon(30)) ou de cellules circulantes comme les fibrocytes(31) ou les cellules souches.

- In vitro, ils semblent reprogrammables en cellules souches hématopoïétiques(32).

Actuellement, il n'est pas démontré de possibilité de différenciation d'un macrophage en fibroblaste.

La capacité de dédifférenciation d'un fibroblaste en fibrocyte sans passer par la cellule souche, reste à explorer.

Les mécanismes progéniteurs de fibroblaste et donc en partie les fibrocytes sont une voie de recherche intéressante dans la physiopathologie de la BPCO ; Récemment, un travail sur l'examen histologique de parenchyme pulmonaire réséqué décrit des lésions étiquetées fibrose interstitielle tabac-dépendante à différencier d'autres formes de fibrose plus classiques(33). Cela ferait le lien entre une certaine forme de fibrose et la BPCO.

La différenciation en macrophage d'un précurseur monocyttaire semble stimulée par divers facteurs : le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), activation des TLR (toll-like receptor) et phagocytose, les cytokines de lymphocyte Th1 et la migration des précurseurs du sang vers les tissus.

La différenciation en fibrocyte d'un précurseur monocyttaire semble stimulée par : les cytokines de lymphocyte Th2, TGF- β 1, semaphorin 7A et les cellules apoptotiques.

La différenciation en fibroblaste d'un fibrocyte pourrait se faire sous nouvelle stimulation par le TGF- β 1 et/ou ET1 (endothéline 1). La voie de l'EGFR (epithelial growth factor receptor) pourrait être impliquée dans cette différenciation comme en témoigne l'expression accrue d'EGFR sur les fibrocytes de patients asthmatiques obstructif. Cette expression accrue n'est pas retrouvée sur les fibrocytes de sujet sains ou asthmatiques à fonction pulmonaire normale(34).

Sur des fibrocytes en culture, leur stimulation par de l'IL-1 β , des cytokines de lymphocytes Th1 ou une infection virale conduit à une production accrue d'IL-6, IL-8, CCL3 et 4 qui provoque le recrutement de cellules inflammatoires. De plus, l'expression de marqueur comme ICAM1 (intercellular adhesion molecule1) pour l'adhésion leucocytaire est accrue. Cela favorise la phase inflammatoire. ICAM 1 comme IL10 sont décrits élevés au cours d'exacerbation de BPCO(35).

In vitro, il a été montré sur les fibrocytes un rôle potentiel de cellule présentatrice d'antigène capable d'effet prolifératif de cellule T naïve au moins aussi important que les monocytes ou les cellules dendritiques(20). L'expression par les fibrocytes de semaphorine 7A qui active macrophage et cellules dendritique et diminue la réponse des lymphocytes T confirme le rôle immunomodulateur des fibrocytes (comme peut l'avoir un macrophage).

En parallèle, la production d'IL-10 est augmentée après stimulation par IL-1 β et permet de diminuer l'inflammation et de commencer la phase réparation ; ce d'autant plus que la production de collagène est accrue après stimulation de cellules apoptotiques. Le fait que l'on constate une sécrétion de PDGF (Platelet derived growth factor) et de TGF- β 1 par les fibrocytes, semble indiquer un rôle dans la différenciation de fibroblaste en myofibroblaste et donc un rôle de réparateur.

Dans la BPCO, la progression de la maladie (surtout à partir des stades 3 et 4 de GOLD) est associée à une augmentation de l'épaisseur de paroi bronchique à tout les niveaux : épithélium, lamina propria, adventice, muscle lisse bronchique. Il s'agit d'un remodelage des petites voies aériennes correspondant au moins en partie à des follicules lymphoïdes et une infiltration par des cellules immunitaires (Ly CD4, Ly CD8, Ly B, macrophages, neutrophiles) comme décrit par Hogg(36). De plus, il semble exister, dans la BPCO, un déséquilibre entre métalloprotéase (MMP) et leurs inhibiteurs TIMP en faveur des MMP et notamment MMP9(37) et plus généralement un déséquilibre en protéase et anti-protéase. Dans l'emphysème, il existe des amas de cellules inflammatoires autour de zones de ruptures alvéolaires et une diminution de l'élastine.

I-A-3-c Relation fibrocyte et maladies pulmonaires

Chez le sujet sain, le nombre de fibrocyte sanguin est estimé entre 0,1 et 0,5% des leucocytes circulants(38). Un pourcentage accru de fibrocytes sanguins circulants a été décrit dans l'asthme, la fibrose pulmonaire idiopathique(4), la bronchiolite oblitérante post-transplantation pulmonaire(8) ou l'HTAP(7). Ces pathologies pulmonaires présentent un remodelage pulmonaire (parenchyme et/ou bronche) certain.

Fibrose pulmonaire

Ce terme de fibrose regroupe de nombreuses entités physiopathologiques, la plus courante étant la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Le principe général reste un remplacement progressif du parenchyme pulmonaire sain par de la matrice extra-cellulaire (collagène et autres); d'où la corrélation potentielle avec les fibrocytes. Moeller(4) suggère que le taux sanguin de fibrocyte est corrélé au pronostic d'une FPI. De même, le taux sanguin de fibrocytes semble être un biomarqueur pronostique de l'évolution de maladie interstitielle pulmonaire comme dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak(39). Les fibrocytes sont aussi décrits dans le lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA) de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique(40), sans qu'il n'y est pour autant de corrélation avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire. Dans la fibrose pulmonaire idiopathique(5), il existe une corrélation forte entre le nombre de fibrocyte et les fibroblastes foci (FF)(41). CXCL12, encore appelée SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), est une protéine chimiokine qui intervient dans les interactions cellulaires du système immunitaire via au moins deux récepteurs que sont CXCR4 et CXCR7. Le blocage de l'axe CXCL12/CXCR4 (sur modèle animal de fibrose induite par la bléomycine) résulte en une diminution du recrutement des fibrocytes (direct ou indirect, cela reste à préciser) et une diminution de la fibrose(31)(42). CXCL12 semble être fortement exprimée par les cellules épithéliales alvéolaires de poumon fibrosé humain. Un des mécanismes d'induction de CXCR4 semble être la voie de l'hypoxie (voie de PI3-Kinase, mTOR, AKT) comme l'ont montré des études dans lesquelles HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor) est un facteur transcriptionnel pour l'induction de CXCR4(43)(44)(45). Cela a été confirmé sur des fibrocytes de patients atteints de fibrose pulmonaire avec des concentrations cytosoliques de HIF-1 α , d'ARMm de CXCR4 et de CXCR4 membranaire augmentées sous condition d'hypoxie. De plus, la réponse migratoire fibrocytaire à la stimulation par CXCL12 est corrélée à l'expression de CXCR4(46). L'inhibition de cette voie de signalisation grâce à la rapamycine (inhibiteur de mTOR, PI3-Kinase) permet in vitro une diminution de l'expression de CXCR4. In vivo sur un modèle murin de fibrose bléomycine-induite, la rapamycine permet une diminution des fibrocytes circulants, de l'infiltration pulmonaire par les fibrocytes et une diminution des dépôts de collagène(47).

Asthme

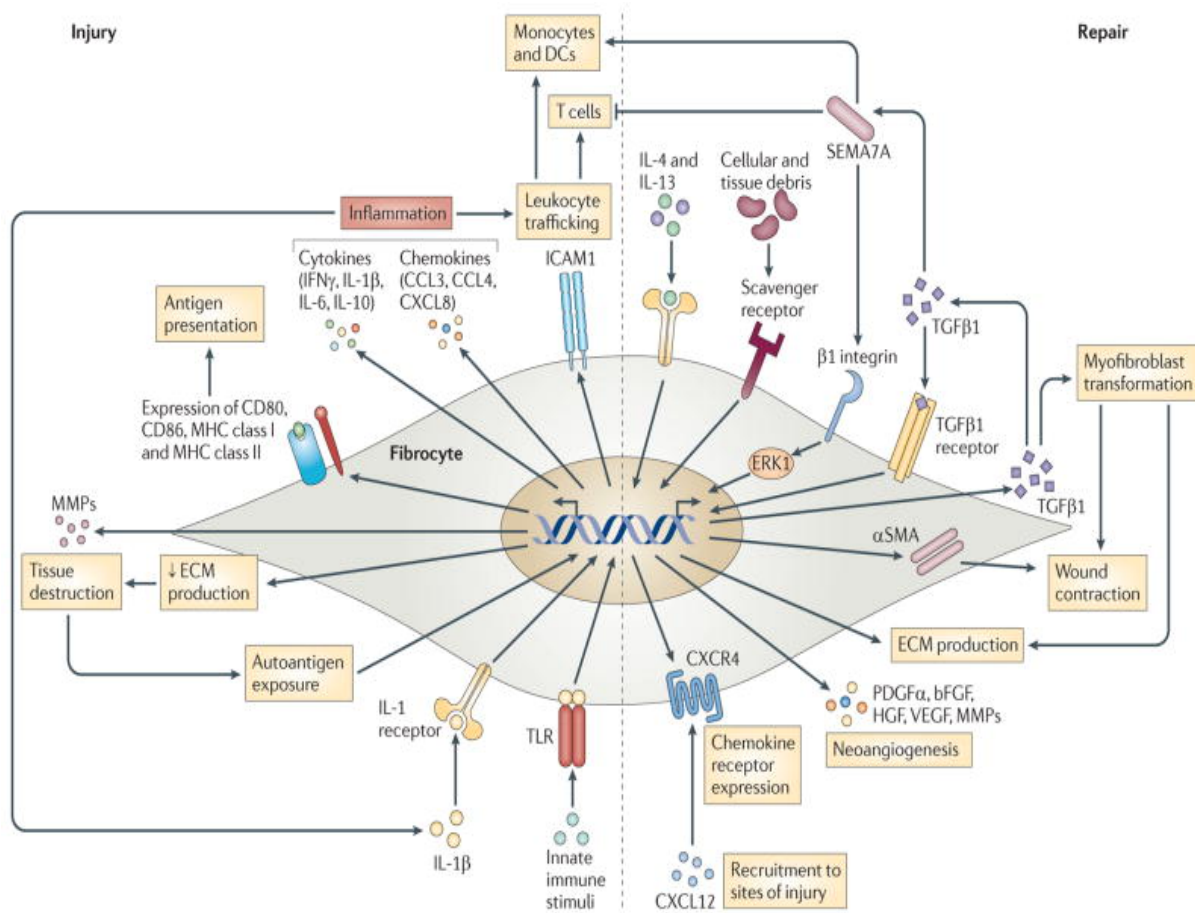
Il est démontré dans l'asthme une inflammation accrue et un remodelage bronchique. Les rôles immuno-modulateur et producteur de MEC du fibrocyte pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'asthme. Il existe une augmentation du pourcentage de fibrocytes circulants dans l'asthme sévère par rapport à l'asthme non-sévère(48), pouvant être corrélé à un rôle dans le remodelage bronchique et notamment la fibrose sous-épithéliale et l'accumulation de myofibroblaste/cellule musculaire lisse. Les fibrocytes sont retrouvés dans la sous-muqueuse épithéliale(26). On les retrouve tout de même dans le poumon de patient asthmatique modéré(49) et même si ces études chez l'asthmatique se focalisent surtout sur le couple fibrocyte / myofibroblaste, il ne faut pas oublier le rôle immunomodulateur décrit in vitro qui, dans l'asthme, ne peut à priori pas être laissé de côté. Plusieurs études suggèrent que les exacerbations d'asthmatiques jouent un rôle de recrutement des fibrocytes notamment via l'axe CXCL12/CXCR4 (48)(41)(5)(50)(42). La perte du CD34 et l'expression de l' α -SMA supporte l'hypothèse de la différenciation du fibrocyte en myofibroblaste(26). Il a été retrouvé une corrélation entre le taux de fibrocyte sanguin et le déclin du VEMS(34)(51). Nihlberg(49) montre une corrélation entre l'épaisseur de membrane basale

bronchique et à la fois le fait de trouver des fibrocytes dans le LBA et le nombre de fibrocyte dans la paroi bronchique.

La voie de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) semble impliquée dans la prolifération et la différenciation des fibrocytes sanguins de patient asthmatique obstructif. En effet, à la fois son inhibition par le gefitinib (inhibiteur d'EGFR tyrosine kinase) ou sa stimulation par le peroxyde d'hydrogène (stress oxydatif inhibé par la N-acétyl cystéine), sont positivement corrélés au taux de fibrocytes sanguins ; évoquant donc une régulation des fibrocytes par la voie de l'EGFR sensible au stress oxydatif(34). La même équipe de recherche a montré une baisse de la sensibilité aux glucocorticoïdes des fibrocytes circulants de patient asthmatique sévère par rapport à des fibrocytes de sujet sain ou asthmatique modéré (apoptotiques après administration)(52). Cette baisse de sensibilité est probablement due à une baisse de l'expression de récepteur à glucocorticoïde sur les fibrocytes de sujet asthmatique sévère. La liaison CCL19/CCR7 sur les fibrocytes est impliquée chez les sujets asthmatiques obstructifs(48). Enfin, l'axe endothéline1 / récepteur à endothéline A des fibrocytes module l'expression du CTGF (connective tissu growth factor) et de l' α -SMA(53).

La figure 4 récapitule les différentes voies de signalisation du fibrocyte dans l'inflammation et la réparation.

Figure 4 : Différentes voies de signalisation du fibrocyte dans l'inflammation (production d'IL 6,10, d'IFN- δ) et la destruction tissulaire (métalloprotéase, MMP) et dans la réparation tissulaire (production de MEC)(17)



I-A-4 Perspectives

A travers la littérature, on commence à comprendre les mécanismes de recrutement des fibrocytes et leur possible rôle immunomodulateur ou de différenciation en fibroblaste/myofibroblaste impliqués dans la réparation et le remodelage tissulaire et donc au final l'aggravation de maladies pulmonaires comme l'asthme ou la fibrose pulmonaire. Les champs d'investigation en recherche fondamentale et thérapeutique restent énormes dans la BPCO qui reste le parent pauvre de la recherche pulmonaire, probablement du fait d'absence de modèle animal reproductible, d'un besoin de cohorte puissante sans trop de comorbidité pour la recherche clinique et possiblement de manque de test ou de biomarqueur d'évaluation des petites voies aériennes(54).

Dans la BPCO, les fibrocytes n'ont pour le moment pas été étudiés aussi bien à l'état stable qu'en exacerbation. Nous nous sommes intéressés tout d'abord aux fibrocytes sanguins au cours d'exacerbation de BPCO nécessitant une hospitalisation par une recherche translationnelle clinico-biologique sur 65 patients, étude FIREBROB (chapitre IIIA). Dans le même temps et afin de statuer sur l'état des fibrocytes sanguins et pulmonaires à l'état stable chez le BPCO, nous avons réalisé une deuxième étude, FIBROCHIR, sur 39 patients en comparant 3 groupes de patient : BPCO stable à sévérité variable, contrôle fumeur, contrôle non-fumeur (chapitre IIIB). L'implication des fibrocytes dans physiopathologie de la BPCO en ferait une cible thérapeutique potentielle innovante.

I-B Asthme

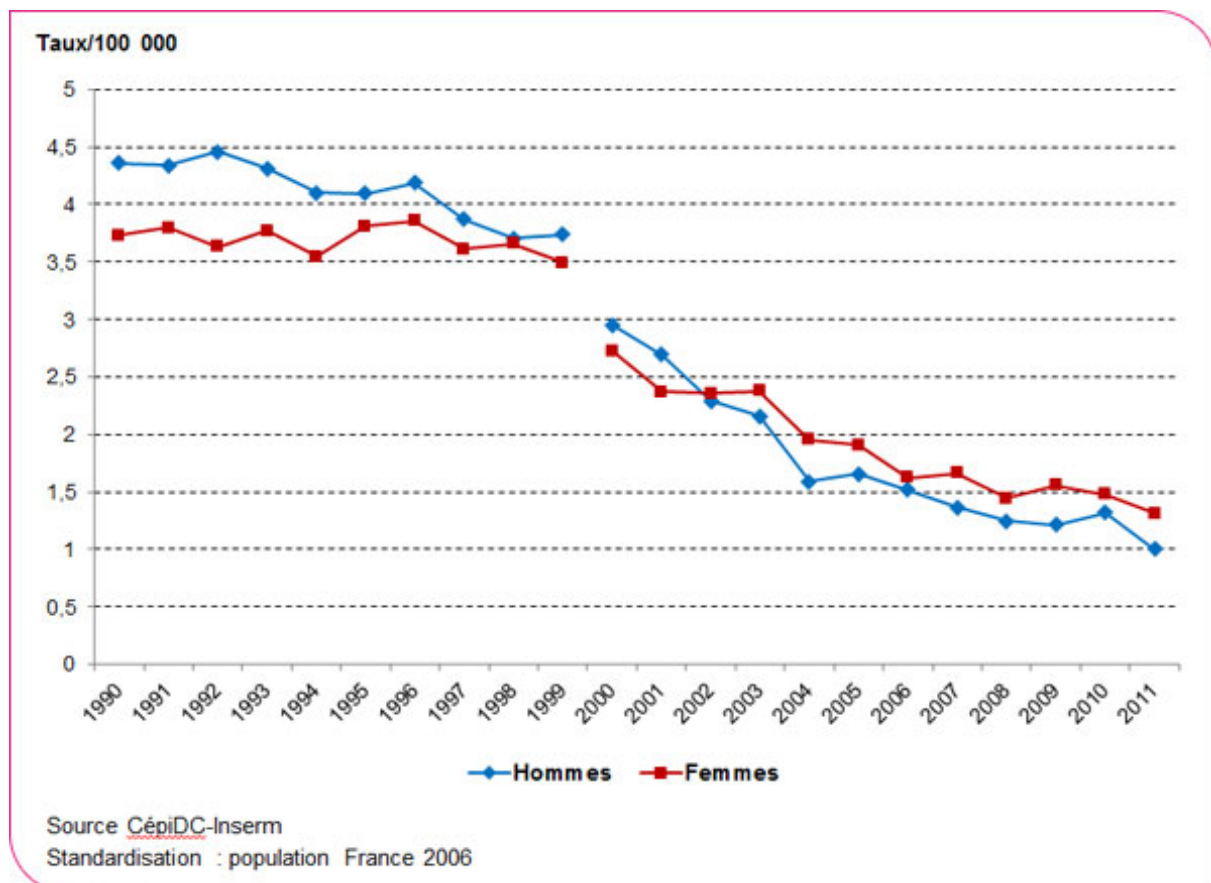
I-B-1 Description

L'asthme est une maladie chronique des voies aériennes caractérisée par des crises récurrentes de dyspnée avec wheezing(2). Lors d'une crise d'asthme, la paroi des bronches se contracte et s'épaissit, ce qui entraîne un rétrécissement de leur calibre interne et réduit le débit de l'air, notamment à l'expiration. Les mécanismes physiopathologiques responsables de la maladie sont complexes et restent encore controversés à l'heure actuelle. On distingue 3 caractéristiques principales à la maladie: une hyperréactivité bronchique (HRB), une inflammation et un remodelage des voies aériennes.

Epidémiologie

D'après les estimations de l'OMS, il y a actuellement 300 millions d'asthmatiques dans le monde dont 30 millions en Europe et on estime à 400 millions le nombre d'asthmatiques en 2025(55). La prévalence de l'asthme a considérablement augmenté au cours des 20 dernières années, plus particulièrement chez les enfants. L'asthme est d'ailleurs la maladie chronique la plus fréquente chez l'enfant et représente la première cause d'absentéisme scolaire. Concernant la France, on estime à plus de 3 millions le nombre d'asthmatiques dont 1/3 sont âgés de moins de 15 ans. D'après l'Institut de veille sanitaire, il y a encore chaque année, 1000 asthmatiques qui décèdent de leur asthme.

Figure 5 : Taux standardisés de mortalité par asthme, tous âges, France métropolitaine, 1990-1999 et 2000-2011.



Facteurs de risques

Il existe plusieurs facteurs de risques capables d'influencer le développement de l'asthme. Ces facteurs de risques sont divisés en facteurs hôtes et facteurs environnementaux :

- Facteurs hôtes : génétiques (terrain atopique, prédisposition à l'hyperréactivité des voies aériennes), sexe, obésité.
- Facteurs environnementaux : allergènes d'intérieur (acariens domestiques, phanères d'animaux, blattes, champignons, moisissures, levures), allergènes d'extérieur (pollens, champignons, moisissures, levures), infections (majoritairement virales), sensibilisateurs professionnels (= polluants sur le lieu de travail), la fumée de cigarette (fumeurs passif ou actif), la pollution de l'air, l'alimentation.

Coût

Le coût économique de l'asthme est considérable, que ce soit en terme de coût médical direct (hospitalisation, médicaments) ou indirect (absentéisme professionnel ou scolaire, mort précoce). Il se chiffrerait à 1,5 milliard d'euros chaque année en France(56).

Clinique

Les signes cliniques de l'asthme sont principalement la toux sèche, les sifflements et l'essoufflement spontané ou à l'exercice, associés à une gêne respiratoire à l'expiration. Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques de l'asthme. Le diagnostic de l'asthme doit donc être confirmé par une exploration fonctionnelle respiratoire (EFR). Sans cet examen, beaucoup d'asthmatiques sont sous-diagnostiqués, ce qui représente un réel problème dans la prise en charge thérapeutique. De plus, l'EFR permet de quantifier l'existence d'un déficit fonctionnel et d'apprécier la sévérité de l'asthme.

Epreuve fonctionnelle respiratoire

L'exploration fonctionnelle d'un asthmatique comporte principalement la spirométrie avec test de réversibilité ou test de provocation, que l'on pourra compléter par une pléthysmographie. La réversibilité de l'obstruction bronchique est définie par une augmentation du VEMS supérieure à 12 % et supérieure à 200 ml en valeur absolue, après administration d'un bronchodilatateur d'action rapide. Chez l'asthmatique, l'obstruction est classiquement réversible mais une absence de réversibilité peut être objectivée en cas de remodelage bronchique chez certains asthmatiques sévères.

Cependant, en dehors des crises d'asthme, l'EFR au repos est souvent normale. Il est alors possible de faire un test de provocation, afin de rechercher l'existence d'une HRB. En pratique clinique, les tests de provocation pharmacologique sont préférentiellement utilisés, le plus souvent en utilisant la métacholine(57). L'inhalation de concentrations croissantes et cumulées de métacholine, permet alors de quantifier la réactivité bronchique. Ainsi, chez le sujet normal, la concentration

nécessaire et suffisante pour engendrer une chute de 20% du VEMS, ou PC20 (Provocative Concentration), est supérieure ou égale à 16 mg/ml, alors qu'elle est inférieure à 4 mg/ml chez un sujet avec une HRB modérée et inférieure à 1 mg/ml dans les HRB sévères(58).

Stades

Tableau 5 : Degré de sévérité de l'asthme en fonction de la clinique et de l'EFR.

	STADE I intermittent	STADE II persistant léger	STADE III persistant modéré	STADE IV persistant sévère
SYMPTÔMES	<ul style="list-style-type: none"> • symptômes présents moins d'une fois par semaine • exacerbations brèves • symptômes nocturnes pas plus de 2 fois par mois 	<ul style="list-style-type: none"> • symptômes présents plus d'une fois par semaine mais moins d'1 fois par jour • exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil • symptômes nocturnes plus de 2 fois par mois 	<ul style="list-style-type: none"> • symptômes présents quotidiennement • exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil • symptômes nocturnes présents plus d'une fois par semaine • utilisation quotidienne de β_2 agoniste de courte durée d'action 	<ul style="list-style-type: none"> • symptômes présents quotidiennement • exacerbations fréquentes • symptômes nocturnes fréquents • limitation des activités physiques
SPIROMÉTRIE	<ul style="list-style-type: none"> • DEP ou VEMS $\geq 80\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $< 20\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> • DEP ou VEMS $\geq 80\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS 20-30% 	<ul style="list-style-type: none"> • DEP ou VEMS 60-80% de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $> 30\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> • DEP ou VEMS $\leq 60\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $> 30\%$

Puis une classification en prenant en compte la charge thérapeutique est proposée(59).

Tableau 6 : Sévérité de l'asthme en fonction de la clinique et du traitement

Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4
Pas de Ttt de fond	CI (faible dose)	CI (dose faible à moyenne) + LABA	CI (forte dose) + LABA + autre

CI : corticoïdes inhalés, LABA : Beta 2 agoniste longue durée d'action

	Charge thérapeutique
--	-----------------------------

		Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4
symptômes	Stade 1	Intermittent	Persistant léger	Persistant modéré	Persistant sévère
	Stade 2	Persistant léger	Persistant modéré	Persistant sévère	Persistant sévère
	Stade 3	Persistant modéré	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère
	Stade 4	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère

Une autre classification se réfère au contrôle de la maladie.

Tableau 7 : Critères de contrôle de l'asthme selon les recommandations internationales du GINA (Global INitiative for Asthma).

**Les critères de contrôle de l'asthme selon les recommandations internationales du GINA
(Global INitiative for Asthma)**

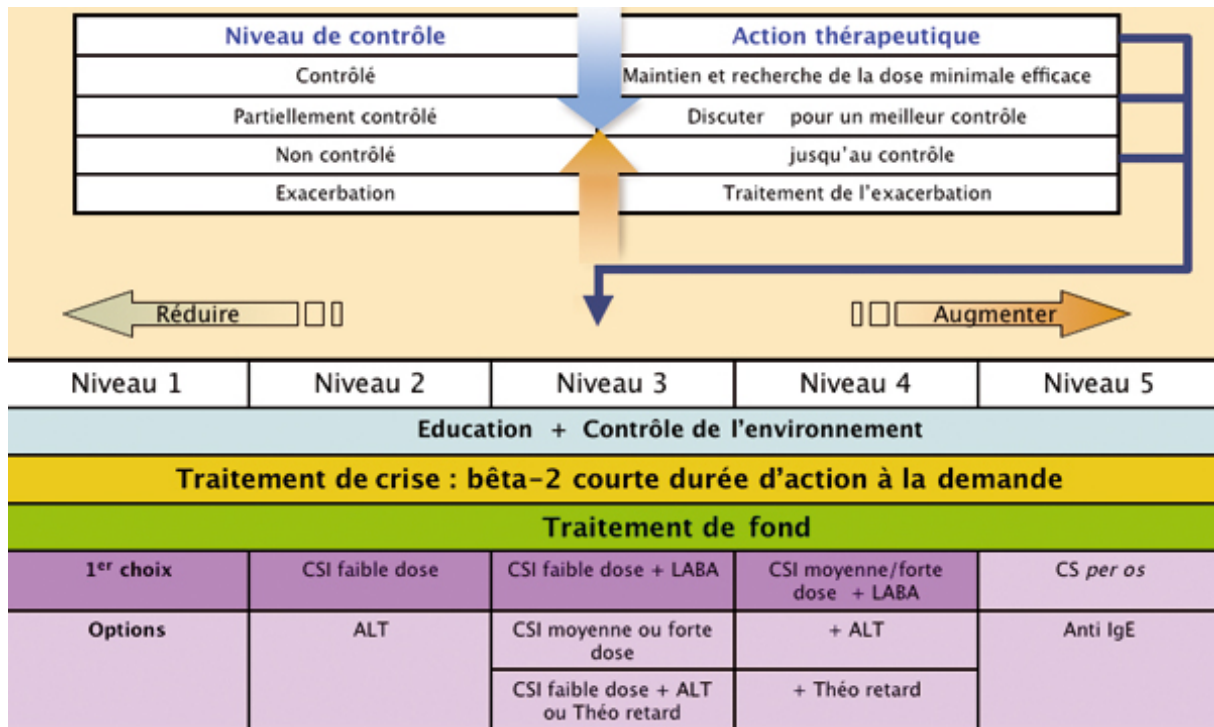
	Contrôle total <i>(tous les critères)</i>	Contrôle partiel <i>(≥ 1 critère)</i>	Non contrôlé
Symptômes diurnes	≤ 2 /semaine	> 2 /semaine	3 critères ou plus du contrôle partiel
Limitation des activités	Aucune	Présence	
Symptômes nocturnes/ réveils	Aucun	Présence	
Utilisation de β2- mimétiques de courte durée d'action	≤ 2 /semaine	> 2 /semaine	
Fonction respiratoire (VEMS ou DEP)	Normale (≥ 80%)	< 80% de la théorique ou de la meilleure valeur	
Exacerbations	Aucune	≥ 1 /an ¹	1 exacerbation dans la semaine ²

¹ Chaque exacerbation implique de réévaluer si le traitement est adapté.

² Par définition, la présence d'une exacerbation dans la semaine d'évaluation correspond à un asthme non contrôlé

I-B-2 Traitements actuels

Figure 6 : Approche thérapeutique de l'asthme basée sur le contrôle de la maladie (GINA, 2013)



(CSI : corticostéroïde inhalé, CS : corticostéroïde, LABA : long acting Beta 2 agoniste, Théo : théophylline, ALT : anti-leucotriène)

Le traitement médical de la crise d'asthme est basé sur les beta-2 agonistes courte durée d'action sous forme inhalée ou injectable pour une action rapide mais courte sur la relaxation du muscle lisse péri-bronchique. On peut y associer des médicaments anti-cholinergiques d'action plus lente et moins puissante. Les corticoïdes, sous forme inhalée, orale ou injectable sont un complément en cas de crise prolongée ; ils sont relayés par la forme inhalée dès la crise terminée pour le traitement de fond. Le traitement de fond est basé sur les corticoïdes inhalés qui agissent sur l'inflammation bronchique. Ils peuvent être associés aux beta-2 agonistes longue durée d'action (Niveau 3-4). La cortisone sous forme orale ou injectable est associée en cas de niveau 5. Des alternatives médicamenteuses sont proposées avec les anti-leucotriènes (Montelukast) qui agissent sur l'inflammation bronchique tout comme les Anticorps Anti-IgE (Omalizumab) en cas d'asthme étiqueté dépendant des Ig E(60) même si les effets immunosuppresseurs à long terme, notamment carcinogène, sont non connus. La théophylline pose le problème d'une dose toxique proche de la dose efficace avec des effets secondaires non négligeables.

La thermoplastie bronchique qui vise à diminuer la masse musculaire lisse bronchique semble prometteuse sur les exacerbations et les hospitalisations(61)(62).

Pour autant qu'il soit bien conduit, cet arsenal thérapeutique ne contrôle que 55-60% des patients(63) ! Les corticoïdes, qui constituent le traitement de fond, semblent sans effet sur la prolifération du muscle lisse bronchique(64). L'espoir de nouvelles cibles et médicaments est donc énorme.

I-B-3 Relation remodelage bronchique / asthme

I-B-3-a Principes généraux

Longtemps considéré comme un processus anormal de réparation de l'inflammation bronchique, le remodelage bronchique représente également un facteur de pérennisation de celle-ci. Il se caractérise par un ensemble de modifications anatomiques affectant, à des degrés divers, toutes les composantes de la paroi bronchique des voies aériennes proximales et distales, *i.e.* l'épithélium, la membrane basale, la matrice extracellulaire, les glandes séro-muqueuses, les vaisseaux et le muscle lisse bronchique(65). Ces altérations structurales sont susceptibles d'apparaître précocement dans l'histoire naturelle de la maladie, comme en témoignent les données histologiques issues de biopsies bronchiques chez des enfants asthmatiques(66)(67). Elles contribuent à l'installation d'une obstruction bronchique moins réversible voir fixée, et correspondent donc à une évolution défavorable de la maladie(68)(69).

Epithélium bronchique

L'asthme se caractérise, classiquement, par une desquamation de l'épithélium bronchique et un renouvellement cellulaire plus important. L'importance de ces altérations épithéliales est corrélée à l'HRB(70). Dans l'asthme sévère, l'épithélium est hyperplasique, avec une augmentation du nombre de cellules caliciformes(71)(72)(73). Parmi les mécanismes à l'origine de cette hyperplasie, le rôle de la leptine, adipokine impliquée dans les processus inflammatoires et de réparation tissulaire, a été évoqué(74). En effet, une diminution de l'expression de la leptine et de son récepteur, a été mise en évidence *in vitro* et *ex vivo* dans l'épithélium des asthmatiques sévères. Elle est, en outre, corrélée négativement à certains aspects du remodelage bronchique, tels que l'épaisseur de la membrane basale(74). D'autre part, l'implication de la lipoxine A4 (LXA4) a également été suggérée dans les altérations épithéliales chez l'asthmatique sévère. En effet, sa concentration est diminuée dans le surnageant issu d'expectorations induites de patients asthmatiques sévères(75). La LXA4 est un médiateur lipidique dérivé de l'acide arachidonique, aux propriétés anti-inflammatoires qui pourraient résulter de sa fixation sur son récepteur spécifique, le FPRL-1 (Formyl peptide receptor-like 1), dont l'expression dans l'épithélium de l'asthmatique sévère reste à préciser.

L'épithélium, en tant que première barrière contre les pathogènes, subit de nombreuses altérations, conduisant à la production de médiateurs inflammatoires(76). L'impact de cette inflammation sur le remodelage bronchique fait l'objet de nouvelles études, et permet d'étudier les interactions épithélium-muscle. Dernièrement, il a été montré que la production d'IL-8 de l'épithélium bronchique, induite par YKL-40, une chitinase-like produite par l'épithélium en condition inflammatoire, stimule la prolifération et la migration des CML bronchiques(77). D'ailleurs, YKL-40 elle-même induit une prolifération et une migration des CML bronchiques d'asthmatiques(78). Ainsi l'épithélium participe aussi au remodelage musculaire lisse bronchique.

Membrane basale et matrice extracellulaire

Une fibrose sous-épithéliale de la lamina reticularis forme un pseudo épaississement de la membrane basale(65). Elle résulte de deux mécanismes :

- un dépôt de protéines de la matrice extracellulaire : collagène I, III, V, fibronectine, tenascine par les fibroblastes, myofibroblastes et cellule musculaire lisse (CML)(79)(80)

- un déséquilibre d'expression des MMP(81)(82) qui dégradent ces protéines et leurs inhibiteurs TIMP (Tissue inhibitor of MetalloProteinase)

Glandes séro-muqueuses

Une hypertrophie des glandes séro-muqueuses est retrouvée dans l'asthme et conduit à une hypersécrétion de mucus, qui majore l'obstruction bronchique et l'HRB(83). Les mécanismes responsables de cette hypertrophie sont imparfaitement connus à l'heure actuelle. Toutefois, l'implication de gènes responsables de la production de mucus comme MUC2 et MUC5AC a été démontrée(84)(85). Leur expression peut être induite par différentes cytokines Th2, comme l'IL-4, l'IL-5, ou l'IL-13(83)(85)(86)(87). L'IL-1 β (83), le TNF- α (88) ou l'IL-17A, via l'induction de l'IL-6(89), semblent être également mis en jeu dans l'activation de ces gènes.

Angiogenèse

Le nombre des vaisseaux sanguins bronchiques est augmenté dans l'asthme, chez l'enfant et l'adulte, et est corrélé à la sévérité de la maladie(67)(90)(91). Bien que les mécanismes responsables de cette angiogenèse soient encore mal connus(92), plusieurs travaux suggèrent l'implication du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). En effet, l'expression de ce facteur de croissance de l'endothélium est augmentée dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques et est colocalisée avec les marqueurs des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes Th2, suggérant un rôle possible de l'inflammation dans l'angiogenèse(93)(94). En effet, dans un modèle de souris asthmatique, l'inhibition du VEGF conduit à une diminution de l'inflammation bronchique(95). A l'inverse, dans un modèle de souris transgénique surexprimant le VEGF au niveau épithélial, on observe une augmentation de l'angiogenèse et de l'inflammation bronchique(96). Très récemment, un modèle de souris sensibilisée par HDM (House Dust Mite), montre que le recrutement des cellules pro-génitrices endothéliales dans le poumon, induisant une néo-vascularisation, est dépendant de l'IL-25, démontrant un rôle direct de l'IL-25 au cours de l'angiogénèse *in vivo*(97). Une autre étude utilisant aussi le modèle murin sensibilisé par HDM, montre que la sensibilisation à l'allergène induit la production de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1alpha) par les macrophages alvéolaires. Le blocage de HIF-1 α diminue le niveau de VEGF-A et CXCL1 dans les poumons et permet de diminuer le recrutement des cellules pro-génitrices endothéliales ainsi que l'angiogenèse(98).

Augmentation de la masse musculaire lisse bronchique

L'augmentation de la masse musculaire lisse bronchique (MLB), apparaît être un facteur pronostique majeur de l'asthme sévère car corrélée à la dégradation non réversible de la fonction respiratoire(69). Cette augmentation de masse est probablement la conséquence d'une hyperplasie musculaire lisse (démontrée *ex vivo*(99) et *in vitro*(100)) mais aussi d'une hypertrophie de la cellule musculaire lisse (CML) et d'un dépôt accru de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). L'hyperplasie peut être due à une augmentation de la prolifération, une diminution de

l'apoptose ou le recrutement de cellules mésenchymateuses (fibroblaste, myofibroblaste, fibrocyte).

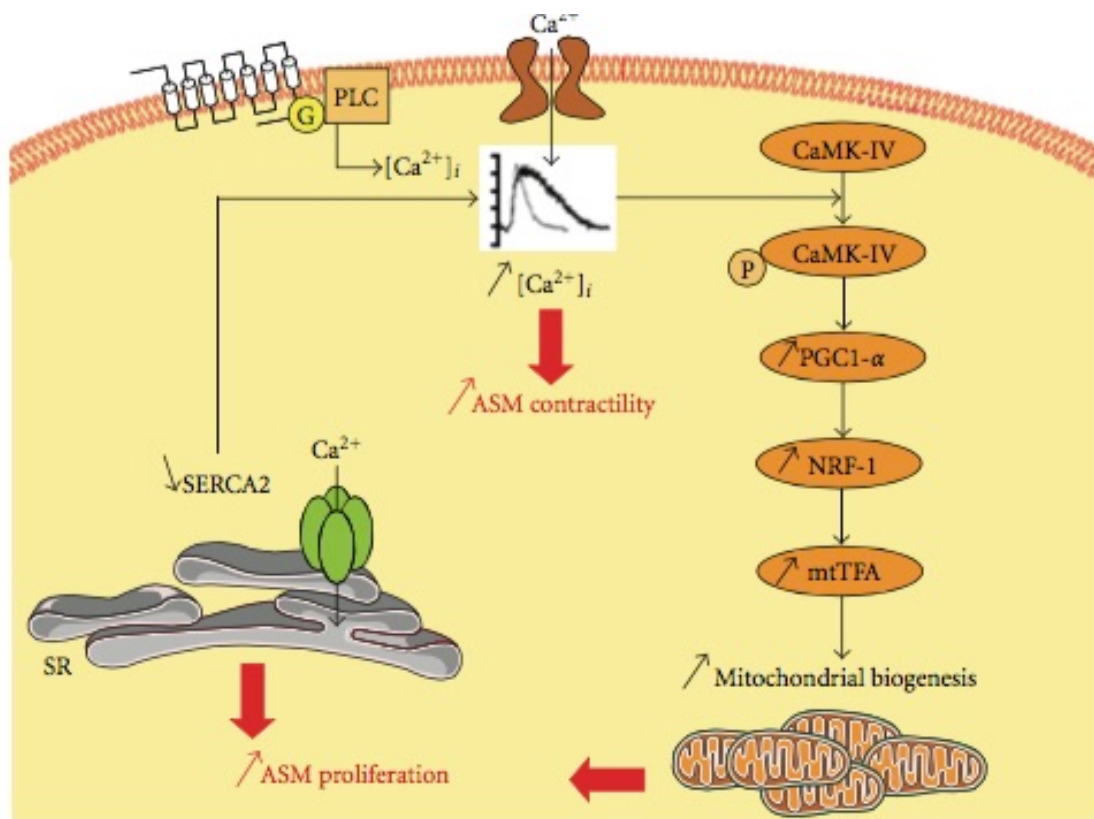
I-B-3-b Rôle de la cellule musculaire lisse dans l'asthme

Ce rôle a été décrit par un article de revue du laboratoire en 2011(101). En résumé, comme la masse de MLB est corrélée à la décroissance de la fonction pulmonaire des asthmatiques(69)(68)(99), la compréhension de son rôle paraît indispensable avant d'envisager de nouvelles thérapeutiques.

CML/HRB

Les stimuli direct ou indirect de l'HRB peuvent induire une contraction de CML soit directement (comme avec la métacholine sur le récepteur muscarinique M3)(102) soit indirectement par des cellules intermédiaires relâchant des agents contractiles. Les stimuli indirects sont associés à la libération de médiateurs mastocytaires ou éosinophiliques comme les prostaglandines (PGF2alpha, PGD2 et TXA2), l'histamine, ... procontractiles sur la CML par des récepteurs spécifiques. La tryptase accroît ainsi la concentration calcique cytosolique des CML occasionnant, après activation du PAR 2, la contraction(103). Des leucotriènes pro inflammatoires peuvent aussi avoir une action contractile directe sur la CML (LTC4, LTD4, LTE4) ou indirectement par le relargage de TXA2 (LTB4). L'endothéline produite par les cellules épithéliales et endothéliales est aussi un agent contractant direct de la CML tout comme l'acétylcholine. Par ailleurs, la concentration des médiateurs relaxant la CML (comme l'adrénaline) semble plus faible, notamment pendant les crises d'asthme. Les Beta-2 récepteurs sont moins nombreux, la production de PGE2 relaxante est moindre.

Figure 7 : Altération de l'homéostasie calcique dans la CML occasionnant une prolifération et une contraction cellulaire.



Chez l'asthmatique sévère, la concentration accrue de Ca^{2+} phosphoryle et active CaMK-IV qui active PGC-1 α , NRF-1 et mtTFA générant de la prolifération mitochondriale puis cellulaire(104). Chez l'asthmatique non sévère, une dysfonction de SERCA2 altère l'homéostasie calcique pour une résultante identique(105). CaMK-IV: calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV; G: G protein; mtTFA: mitochondrial transcription factor A; NRF: nuclear respiratory factor; PGC: peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator; PLC: phospholipase C; SERCA: sarcoendoplasmic calcium pump; SR: sarcoplasmic reticulum.

Après stimulation extracellulaire, l'homéostasie calcique intracellulaire est dépendante de divers phénomènes :

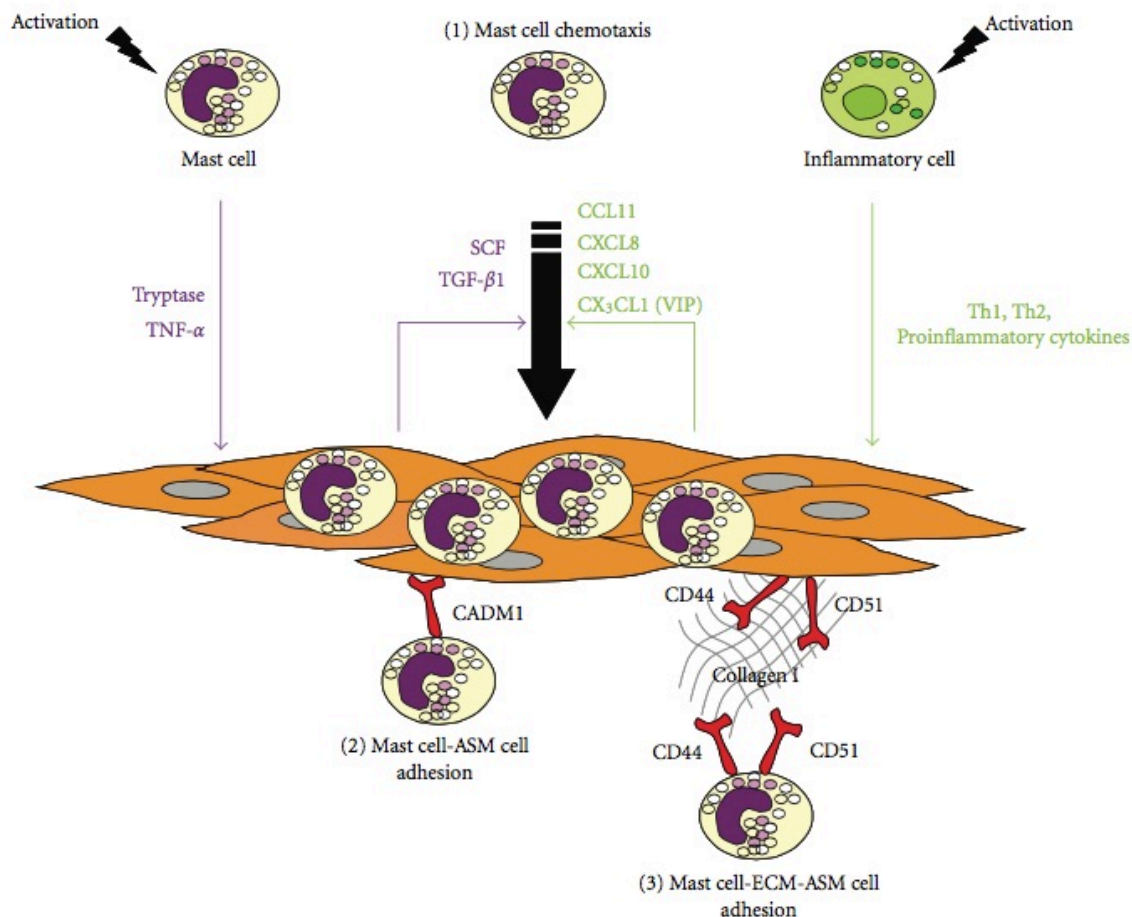
- La concentration cytosolique calcique reste élevée chez l'asthmatique par une possible entrée anormale et /ou une expression moindre de SERCA2 (pouvant être expérimentalement diminuée par IL-13 ou TNF- α)
- Une autre cascade via IL-1 β , cytokine pro-inflammatoire, accroît le Ca^{2+} cytosolique par la voie ADP-ribosyl cyclase / cyclic ADP-ribose / récepteur ryanodine.
- La sensibilité calcique à la contraction musculaire peut être accrue, occasionnant une réponse contractile accrue pour une même stimulation (rôle du couple myosin light chain kinase/myosin light chain phosphatase (MLCK/MLCP) débattu).

Par ailleurs, il semble exister une altération du couple contraction/charge musculaire occasionnant un raccourcissement et donc une majoration de l'obstruction bronchique.

CML / Inflammation

La CML, à travers de nombreuses molécules de surface, intégrines et Toll-like récepteurs, possède des fonctions pro-inflammatoires et immunomodulatrices ; et donc à fortiori, un rôle propre dans l'inflammation asthmatique. Par ailleurs, les mastocytes et lymphocytes T sont connus pour infiltrer le MLB dans l'asthme.

Figure 8 : Mécanismes régulant l'infiltration des mastocytes dans le MLB.



Un chimiotactisme mastocyte/MLB, une adhérence directe mastocyte/CML ou mastocyte/MEC/CML. Un cercle d'auto-activation se crée entre mastocyte/CML via des médiateurs mastocytaires (tryptase, TNF- α) et musculaires (CXCL10, CXCL8, CCL11,). De plus, une stimulation Th1/Th2/cytokines sur les CML fait sécréter les facteurs chimiotactiques mastocytaires.

L'infiltration musculaire des mastocytes semble positivement corrélée au degré d'HRB et à l'intensité de l' α -smooth muscle actin. Pas ou peu de corrélation n'a été démontrée entre cette infiltration et la masse de MLB (remodelage).

CML / remodelage bronchique

La masse de MLB est augmentée dans l'asthme sévère mais reste insensible au traitement proposé (plus efficace sur l'inflammation et l'obstruction aiguë). La CML joue un rôle propre dans le remodelage des structures bronchiques notamment par la synthèse de médiateurs. Ainsi, le TGF- β , produit par les CML, peut occasionner des altérations épithéliales, une fibrose sous-épithéliale, une hypersécrétion de mucus et de l'angiogenèse. Les mécanismes responsables du

remodelage du MLB sont l'hyperplasie et l'hypertrophie de CML et les dépôts protéiques excessifs dans la MEC.

L'hyperplasie de CML semble soutenue par trois mécanismes que sont la prolifération de CML, la réduction de l'apoptose des CML et la migration de myofibroblaste dans le MLB.

- La prolifération de CML dans l'asthme a été confirmée in vitro et in vivo. De nombreux facteurs mitogènes sont connus (facteurs de croissance, cytokines, médiateurs inflammatoires), mais la CML asthmatique semble proliférer plus vite que la CML non-asthmatique en dehors de tout stimuli (in vitro), soutenant l'hypothèse d'une anomalie intrinsèque : trouble de l'homéostasie calcique (vu plus haut), niveau de C-EBP α diminué occasionnant une diminution de p21, inhibiteur du cycle cellulaire.

- l'apoptose des CML dans l'asthme n'a été que peu étudiée et nécessite d'autres recherches.

- La migration de myofibroblaste dans le MLB (habituellement dans le compartiment sanguin ou en dehors de la paroi bronchique) en tant que précurseur de CML a été suggérée. La différenciation en « CML-like » de myofibroblaste pourrait expliquer en partie l'hyperplasie. Leur origine reste débattue : différenciation de fibroblaste résident, dédifférenciation de CML, différenciation et migration de cellules épithéliales, dérivé de cellule circulante type fibrocyte. Il est retrouvé dans le MLB, la lamina propria ou sous l'épithélium d'asthmatique. Le PDGF sécrété par la CML pourrait être un facteur chimiotactique des fibrocytes, comme d'autres chimiokines (CXCL12, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13).

L'hypertrophie de la CML reste débattue. Toutes les formes d'asthme la décrivent ; même si finalement, on la réserve à l'asthme sévère du fait de résultats discordant dans l'asthme modéré.

L'altération de la MEC du MLB apparaît comme une autre voie de remodelage bronchique dans l'asthme. Il existe du dépôt excessif de protéines de la MEC par la CML, les cellules épithéliales, les fibroblastes et myofibroblastes. La composition de la MEC est différente asthme vs témoin sain :

- plus de collagène I, III, V, fibronectine, tenascine, laminine, hyaluronane, versicane, lumican et biglycane

- moins de collagène IV et d'élastine (débattu)

Ces constatations sont probablement le fait d'une diminution des MMP et/ou une augmentation des TIMP-1 et 2. De manière intéressante, certains éléments de la MEC pourraient avoir un rôle dans la prolifération de CML (fibronectine, collagène I), la survie de CML (fibronectine, collagène I, IV, laminine) et la maturation de CML en phénotype contractile.

I-B-4 : Perspectives

De nombreux travaux de recherche s'intéressent à l'HRB et à l'inflammation bronchique dans l'asthme allergique. Un récent travail(106) retrouve comme cible potentielle de ces mécanismes un récepteur CaSR (native calcium-sensing receptor). Ainsi des médicaments calcilytiques par voie inhalée (antagoniste du récepteur) représenterait un espoir thérapeutique énorme sur ce phénotype d'asthme. Certaines études proposent de nouvelles thérapeutiques comme les anti-IL-5 (Mepolizumab)(107), anti-IL-13 (Lebrikizumab)(108), anti-IL-4R α (Dupilumab) (109) ; toutes plutôt axées sur le contrôle de l'inflammation et avec peu d'évaluation du remodelage bronchique.

Actuellement, il n'y a pas de médicament capable de diminuer la taille du MLB(110). Le Gallopamil ou D600 ou methoxyverapamil est un inhibiteur calcique bien connu pour ces propriétés cardio-vasculaires. Il diminue, in vitro, la biogénèse mitochondriale musculaire consécutive à l'influx de Ca²⁺ et donc les facteurs de transcriptions pour une diminution de la masse mitochondriale et de la prolifération du MLB(104). Pour autant, les effets cliniques de ce médicament sur le remodelage bronchique n'étaient pas évalués de manière puissante et suffisante. C'est la raison pour laquelle nous avons conduit un premier travail clinico-biologique translationnel (étude Remodel'asthme au chapitre IIIC) étudiant l'effet du Gallopamil sur le remodelage bronchique microscopiquement, radiologiquement et cliniquement chez des patients asthmatiques sévères.

Le deuxième travail (étude Mit'asthme au chapitre IIID) s'est intéressé aux patients asthmatiques non-sévères pour l'étude du remodelage du MLB et de la biogénèse mitochondriale.

I-C Endoscopie bronchique

I-C-1 Description

Etant chirurgien thoracique et endoscopiste à la fois, ceci me permet d'avoir l'expertise endo et extrabronchique de l'exploration pulmonaire, au moins macroscopique. Cette double casquette permet d'évoquer divers prélèvements humains précieux pour la recherche fondamentale et l'évaluation de nouvelles thérapeutiques:

- En fibroscopie souple :
 - Lavage bronchiolo-alvéolaire pour étude cytologique, bactériologique, parasitologique, virologique, mycologique voir biologique
 - Fluorescence bronchique
 - Biopsie de la paroi bronchique pour étude de l'épithélium et jusqu'au MLB (chapitre IIIC et D)
 - Biopsie distale parenchymateuse pour étude cytologique et structurelle parenchymateuse (mais plus à risque de complications, notamment pneumothorax)

- En chirurgie thoracique :
 - macrobiopsie sous forme de résection atypique voir exérèse pulmonaire majeure permettant, sous réserve d'un conditionnement rapide, toutes les analyses possibles à tous les étages du parenchyme pulmonaire.

La description de l'endoscopie bronchique réalisée au CHU de Bordeaux est faite dans l'article 1 présenté ci-dessous (article correspondant au chapitre 87 du livre « réanimation » intitulé Endoscopie bronchique interventionnelle, actuellement sous presse).

Article 1 : Endoscopie interventionnelle bronchique

Chapitre 87

Endoscopie bronchique interventionnelle

M. Thumerel, H. Rozé, J.-F. Velly, J. Jougon

Introduction

L'endoscopie bronchique interventionnelle fait appel aux techniques de bronchoscopie souple (BS) et rigide (BR). Elle permet de traiter la trachée, les bronches principales et les troncs intermédiaires. Les possibilités thérapeutiques du bronchoscope sont liées à la largeur de son canal opérateur qui permet de faire passer du matériel permettant essentiellement de désobstruer les voies aériennes proximales en utilisant entre autres des pinces, du laser et des prothèses. Dans ce chapitre, nous exposons les problématiques que l'on peut rencontrer en réanimation, pour lesquelles l'endoscopie interventionnelle peut être salvatrice. Elle utilise des techniques et des matériaux nouveaux, apportant des renseignements ou solutions supplémentaires. Nous les résumons ici avec leurs indications appliquées aux patients de réanimation.

La première endoscopie trachéobronchique rapportée date de 1897 et est réalisée par Killian en Allemagne pour l'ablation d'un corps étranger, grâce à un œsophagoscope rigide. C'est aussi en 1897 que Chevalier Jackson, aux États-Unis, présente l'ensemble de l'instrumentation pour la réalisation de la bronchoscopie au tube rigide. Jusqu'aux années 1970, l'exploration endoscopique de l'arbre trachéobronchique ne pouvait être effectuée que par endoscopie rigide. La tuberculose et ses complications bronchiques allaient contribuer au développement de la technique. En 1967, au Japon, Shigeto Ikeda [1] présente le premier endoscope souple appelé fibroscope bronchique. Cela signe le déclin annoncé du bronchoscope rigide, sauf dans certains centres européens qui ont persévéré et contribué au développement de l'endoscopie interventionnelle. À Marseille, Jean-François Dumon [2] confectionne des ancillaires dédiés, en élaborant une protocolisation des techniques et en créant des prothèses spécifiques. Alors que la réalisation d'une bronchoscopie au tube rigide nécessite une anesthésie générale avec curarisation, l'utilisation de l'endoscope flexible (fibroscope) peut se faire sous anesthésie locale et sédation minime. Ces deux techniques sont cependant complémentaires : si l'endoscopie flexible se caractérise par sa facilité d'utilisation, la possibilité d'exploration plus distale de l'arbre bronchique eu égard à la plus petite taille des optiques et aux possibilités d'orientation multiplanaire, la réalisation de manœuvres endoscopiques interventionnelles avancées nécessite des canaux opérateurs de diamètre beaucoup plus important, tels que ne le permet que le bronchoscope rigide. L'utilisation simultanée du bronchoscope rigide et du fibroscope peut d'ailleurs parfois être utile lors d'une procédure d'endoscopie interventionnelle. À l'avenir, avec la miniaturisation des caméras et l'utilisation de l'image numérique à très haute définition, on peut prévoir une plus grande utilisation des fibroscopes numériques, voire à usage unique [3], au détriment des

fibroscopes à fibre optique actuellement utilisés. Concernant la bronchoscopie rigide, son utilisation devrait continuer à décroître, sans s'interrompre totalement, avec le développement de matériel (pinces, prothèses) utilisable par le fibroscope.

Bronchoscopies

Bronchoscopie souple (BS)

Elle fait appel à deux types de fibroscopes.

Le fibroscope « standard » est un tube flexible, béquillable à l'extrémité jusqu'à 90°, muni d'un canal opérateur étroit, à vision oculaire ou à retransmission sur écran (vidéo-endoscope). Les diamètres externes des fibroscopes vont de 3 à 6 mm. Le gain en finesse du fibroscope (de petit diamètre) se fait au détriment du champ de vision offert et de l'étroitesse, voire l'absence de canal opérateur. Son utilisation nécessite au minimum un branchement sur une source de lumière froide dans sa version oculaire. Une caméra peut être raccordée à l'optique du fibroscope pour une transmission sur écran. Dans le cas du vidéo-endoscope, une caméra CCD est montée à l'extrémité de l'endoscope et l'image est transmise directement sur le moniteur dédié. Pour ces deux systèmes visuels, on aura recours à une colonne vidéo, certes plus encombrante, mais permettant la vision sur écran et donc une meilleure compréhension par tous les acteurs des gestes réalisés.

L'écho-endoscope permet la réalisation de biopsies transbronchiques échoguidées (EBUS), essentiellement sur des tumeurs paratrachéales et hilaires suspectes d'envahissement néoplasique.

La BS peut se faire sans anesthésie générale, par voie préférentiellement nasale sur des patients vigiles non intubés (avec oxygénothérapie ou ventilation non invasive) après anesthésie locale ORL et trachéale. Chez les patients avec obstruction nasale ou intubés en buccal, il est primordial d'utiliser un cale-dents autour de la sonde pour éviter tout risque de morsure du BS. Dans tous les cas, une préoxygénation est effectuée en augmentant la FiO_2 à 100 %. Chez le patient intubé, ventilé avec une dysfonction respiratoire, un approfondissement de la sédation et de l'analgésie, parfois associé à une curarisation, peut être utile pour maintenir une interaction patient-ventilateur correcte et éviter la toux ou un bronchospasme. Pendant la procédure, le rapport des surfaces des sections du fibroscope et de la sonde d'intubation rend compte du degré d'obstruction. Le diamètre interne de la sonde d'intubation est donc primordial et il faut utiliser des sondes de taille 7 au minimum. On utilise préférentiellement un mode de ventilation contrôlé en volume afin de garantir celui-ci. La valeur de pression maximale autorisée sur la valve d'échappement est augmentée, car la pression de crête générée se situe essentiellement dans les tuyaux de ventilation. Il faut monitorer le volume courant expiré qui peut aussi être diminué du fait de fuites importantes (aspiration par le BS ou fistule bronchopleurale). Enfin, l'expiration passive peut être limitée

de manière importante, du fait de l'obstruction du BS ou de la pathologie sous-jacente, et créer une pression expiratoire positive intrinsèque plus ou moins importante. La fréquence respiratoire, le volume courant et le temps inspiratoire peuvent être diminués en tolérant une hypercapnie pendant la procédure. Les valeurs du CO₂ expiré, du fait de l'obstruction et parfois des pathologies pulmonaires sous-jacentes, ne sont souvent pas représentatives de la PaCO₂. La tolérance de cette hyperinflation dynamique dépend du risque de barotraumatisme (on surveillera la pression de plateau en l'absence de fuites) et d'hypotension due à la diminution du retour veineux et à l'augmentation de l'impédance à l'éjection du ventricule droit.

La poignée du BS comporte un bouton pour aspiration intermittente ou continue et l'orifice proximal du canal opérateur qui permet le passage des instruments ou l'instillation de fluide. Le choix des instruments et des matériaux utilisés dépendra du diamètre du canal opérateur. Gardons à l'esprit que le canal opérateur est le même que le canal aspiratif, ce qui explique l'apparition de sécrétions après introduction d'instruments en distalité et une perte d'aspiration. Cela peut gêner la vision et l'utilisation des instruments, voire nécessiter une sortie du fibroscope pour nettoyage de son extrémité distale et du canal opérateur avant réintroduction.

Les possibilités d'exploration trachéale et paratrachéale par vision directe ou par ultrasons (US) dépendent de la position de la sonde d'intubation, ce qui peut nécessiter le retrait de celle-ci sous contrôle endoscopique pour une analyse trachéale complète. Lors de l'utilisation de l'endoscope, il faut maintenir celui-ci sans plicature pour éviter d'abîmer les fibres optiques. La BS est généralement réalisable en secteur de réanimation, sous réserve de l'encombrement de la colonne vidéo et de la disponibilité des instruments, ce qui apparaît moins évident pour la BR.

Bronchoscopie rigide

Description et utilisation du bronchoscope rigide

On utilise des tubes droits, rigides, creux, de diamètres variés, avec soit des ouvertures latérales en distalité (« tube ouvert ») pour une utilisation bronchique sélective autorisant la ventilation controlatérale, soit fermés sur le côté (« tube fermé ») pour une utilisation trachéale haute évitant ainsi les fuites d'air au niveau laryngé ([Fig. 87.1](#)).

Fig. 87.1

Bronchoscope rigide.

Le bronchoscope rigide est alimenté par une source de lumière froide grâce à un raccord en Y permettant l'éclairage simultané au bout du bronchoscope rigide et au bout de l'optique. La vision est obtenue grâce à une optique rigide utilisée en vision oculaire directe ou par retransmission sur une colonne vidéo. Certaines optiques sont inclinées à 30 et 45 degrés pour permettre une vision latérale plus aisée. Grâce à un branchement latéral sur la partie

proximale du bronchoscope rigide, la ventilation du patient est possible et nécessaire, compte tenu de l'anesthésie générale requise pour cette procédure. Le plus souvent, on a recours à une curarisation du patient pendant le geste pour faciliter les manœuvres de franchissement glottique. Ce franchissement a lieu après introduction du bronchoscope rigide par la bouche, subluxation antérieure de la glotte permettant la vision des cordes vocales en prenant appui sur le pouce de l'opérateur (on peut s'aider d'un cale-dents pour protéger l'arcade dentaire supérieure) avant introduction du bronchoscope. L'assistant vérifie l'absence de pincement des lèvres entre le bronchoscope et les arcades dentaires ([Fig. 87.2](#)).

Fig. 87.2

Introduction d'un bronchoscope rigide sous anesthésie.

La ventilation doit composer avec d'une part l'encombrement des optiques et instruments introduits dans la lumière du tube, et d'autre part les fuites aériques au niveau laryngé et au niveau de l'embout proximal du bronchoscope. Il n'y a pas de ballonnet permettant de faire l'étanchéité ; par conséquent, la ventilation va se faire avec des fuites importantes. Elle va nécessiter un ballon d'oxygénation valvé à hauts débits d'air et d'oxygène (jusqu'à 50 L/min). Afin de diminuer les fuites laryngées, on peut avoir recours à une compression cervicale du cartilage thyroïde ainsi qu'à une fermeture buccale manuelle autour du bronchoscope.

Avant d'envisager une BR, on vérifiera que le patient a une ouverture de bouche et une extension cervicale suffisantes pour l'introduction du bronchoscope rigide (ce qui peut poser problème chez les patients opérés ou ayant bénéficié de radiothérapie de la face et/ou du cou). Pour les patients présentant une trachéostomie, il existe des bronchoscopes rigides de longueur inférieure, même si on peut tout à fait utiliser les BR classiques.

En cas d'introductions répétées du bronchoscope rigide ou d'utilisation de source de chaleur à proximité du larynx, il faudra se méfier d'un œdème laryngé possible sous 24 h après extubation.

Il existe une tendance à vouloir remplacer la BR par la BS, plus simple d'utilisation, sans toutefois y parvenir. La BR reste le meilleur moyen de désobstruction rapide et efficace des lésions trachéobronchiques proximales (jusqu'à l'origine des lobaires). Tout centre hospitalier traitant de pathologie tumorale thoracique doit disposer d'un centre référent en bronchoscopie rigide. La bronchoscopie nécessite un compte-rendu [4].

Indications d'endoscopie bronchique interventionnelle en réanimation

Les principales indications de l'endoscopie interventionnelle en réanimation concernent :

- la désobstruction trachéobronchique, qu'elle soit tumorale, inflammatoire ou liée à un corps étranger inhalé ;
- plus rarement, pour tenter de stopper une hémoptysie ou comme aide au diagnostic avec la réalisation de biopsies.

Désobstruction trachéobronchique

Quel qu'en soit le mécanisme (tumeur, corps étranger, sténose, caillot, etc.), l'obstruction trachéobronchique constitue la principale indication d'endoscopie interventionnelle du patient de réanimation. Le principe commun est la nécessité d'une réanimation pour support ventilatoire chez un patient en insuffisance respiratoire décompensée. Le support ventilatoire peut être varié (oxygénothérapie à haut débit, ventilation non invasive, intubation naso- ou orotrachéale, trachéotomie, trachéostomie, etc.) ; il est primordial de garder à l'esprit qu'une décision d'endoscopie interventionnelle pour désobstruction va nécessiter le plus souvent une anesthésie générale pour une BR. Une obstruction trachéobronchique au stade de l'insuffisance respiratoire est souvent accompagnée d'un encombrement distal majeur. L'endoscopiste doit donc toiletter en premier l'arbre bronchique pour améliorer les paramètres gazométriques avant de commencer les gestes interventionnels.

Il nous apparaît important de différencier les étiologies, compte tenu de terrains cliniques différents.

Corps étranger (CE)

Le BR va permettre l'ablation du corps étranger à la pince à travers le canal opérateur. Il existe différents types de pinces en termes de taille et de crochet pour attraper le CE (crocodile, cacahouète, etc.).

Les cas classiques de CE nécessitant une réanimation sont :

- l'enclavement sous-glottique (manœuvres d'expulsion inefficaces) réalisant un tableau de détresse respiratoire aiguë dans un contexte de syndrome de pénétration. Il va nécessiter une BR, avec potentiellement la réalisation d'une trachéotomie d'urgence au préalable en cas de non-ventilation. Le plus souvent, l'intubation du patient permet d'assurer au minimum une ventilation unipulmonaire en poussant le CE dans la bronche souche droite permettant de rétablir une oxygénation (sous réserve de CE n'obstruant pas tout l'arbre trachéobronchique, tels que de la boue, des grains de maïs, etc.). Dans le cas d'obstruction bilatérale, l'hypoxie sévère est réversible, soit par un accès très rapide à la BR, soit par une oxygénation avec une Extra-Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) veino-veineuse avant la BR.
- les CE survenant sur un terrain fragilisé (Bronchopathie chronique, insuffisance respiratoire chronique) peuvent faire décompenser rapidement une situation précaire. Leur ablation résout le problème. Il est parfois possible que le CE soit présent depuis longtemps et explique une atelectasie traînante, une surinfection d'aval gênant le retour à la normale.

Tumeurs endobronchiques

Elles peuvent être bénignes ou malignes, primitives ou secondaires (ganglionnaire, trachéale, œsophagienne, thyroïdienne, etc.), responsables d'une obstruction aiguë ou chronique avec ou sans complication d'aval. Il est important d'obtenir rapidement des informations sur le terrain du patient (souvent fragile), sur le pronostic de la maladie cancéreuse et sur les possibilités de

reperméabilisation. On se fierait surtout au dernier scanner thoracique réalisé pour juger des possibilités de reperméabilisation trachéobronchique. Si celui-ci n'est pas fait ou disponible, il est important d'en réaliser un nouveau avec injection de produit de contraste si possible. En effet, si le scanner laisse entrevoir une possibilité de reperméabilisation bronchique (sous réserve d'une vascularisation pulmonaire) et donc une meilleure oxygénation, il faut proposer l'endoscopie interventionnelle, quelles que soient finalement les comorbidités du patient (hormis peut-être une situation palliative désespérée clairement étiquetée). Dans la pratique, ces désobstructions s'adressent à des patients porteurs de néoplasie évoluée devant laquelle l'équipe ne connaît pas forcément le mauvais pronostic à l'admission [5]. La présentation clinique classique est celle d'une détresse respiratoire très stressante pour le patient et sa famille. En dehors de situations critiques, on prendra soin d'arrêter une anticoagulation curative ou une anti-agrégation avant le geste (arrêt du Plavix[®], Efixent[®], Xarelto[®], Pravadual[®] ; Le Kardégic[®] est généralement toléré).

On aura recours pour cette reperméabilisation à une BR dans la majeure partie des cas. Il faut autant que faire se peut réaliser cette BR dans une salle d'endoscopie dédiée (matériel potentiellement important à disposition). Une désobstruction est réalisée, elle peut être mécanique à la pince (risque de saignement) ou au laser (cautérise, mais nécessite une oxygénothérapie avec une $FiO_2 < 40\%$ pour ne pas enflammer les voies aériennes) (Fig. 87.3 et 87.4). Ces gestes peuvent être associés à une hémostase par électrocoagulation (possible avec une FiO_2 à 100 %).

Fig. 87.3

Désobstruction d'une sténose trachéale post-intubation par broncholaser.

Fig. 87.4

A. Tumeur neuroendocrine endobronchique du tronc intermédiaire droit.

B. Désobstruction hémorragique au laser permettant la reperméabilisation des bronches lobaires inférieures et moyennes droites.

Ils seront suivis ou non par la pose d'une prothèse afin de maintenir un bon calibre de l'arbre trachéobronchique. Il existe différents types de prothèses : des prothèses droites pour les bronches souches essentiellement, ou en Y pour les obstructions carinaires ou du tronc intermédiaire avec reperméabilisation possible de la bronche lobaire supérieure droite (prothèse de « Oki »). Leur mise en place peut nécessiter un bronchoscope dédié avec un ancillaire spécifique. Ces prothèses peuvent être couvertes ou non, auto-expansibles ou non, métalliques ou siliconées, recoupées pour les siliconées afin de s'adapter au mieux à l'anatomie, sur mesure. Pour les sténoses tumorales malignes, on aura recours à des prothèses couvertes afin d'éviter une sténose intraprothétique par envahissement tumoral entre des mailles non couvertes. Elles présentent comme inconvénient principal l'arrêt de la clairance mucociliaire sur toute leur hauteur, imposant une fluidification trachéobronchique régulière

pour permettre au patient d'extérioriser efficacement les sécrétions d'aval ; dans le cas de patients intubés, l'humidification et la réalisation de fibro-aspirations itératives sont la règle.

La cryothérapie est réservée aux situations non urgentes, car elle nécessite l'attente de la chute d'escarre pour obtenir le recalibrage de la lumière bronchique.

Une fois la désobstruction réalisée, on procède généralement à une fibro-aspiration des sécrétions sous-jacentes à l'obstacle si celle-ci n'a pu être faite au préalable (passage du bronchoscope rigide impossible avant désobstruction). Il faut penser à faire des prélèvements bactériologiques pour documentation. Après cette aspiration, on observe théoriquement une amélioration fonctionnelle, sous réserve d'un poumon sous-jacent sain et bien vascularisé.

Si le patient est intransportable du service de réanimation (cas exceptionnel), il faudra évoquer les possibilités de gestes sous BS ou d'une BR délicate au lit du patient.

Dans certains cas, la reperméabilisation ne permet pas de sevrer le patient du support respiratoire : cas classique de la pneumopathie d'aval à traiter en conséquence ou de la pleurésie associée à drainer, voire cas plus complexe de la sténose artérielle pulmonaire néoplasique associée (poumon ventilé non perfusé) pour lequel, en fonction de l'histologie (lymphome ou carcinome bronchique à petite cellule majoritairement), on peut proposer une chimiothérapie après reperméabilisation. En cas de poumon sous-jacent non fonctionnel, le problème reste entier.

En cas de patient provenant des urgences ou d'un service d'hospitalisation conventionnelle, on s'assurera d'une possibilité de prise en charge post-endoscopie en service de réanimation, car il est possible d'assister à des difficultés respiratoires en fin de procédure.

En cas de patient intubé, la BR peut être très délicate à réaliser, à la fois en termes d'oxygénation du patient (ventilation en fuite) et en termes de possibilité thérapeutique (laser impossible si $FiO_2 > 50\%$). L'apport d'une oxygénation extracorporelle transitoire (type ECMO) pourra se discuter dans des cas exceptionnels (plaies trachéobronchiques avec contusion pulmonaire et hypoxémie sévère, etc.).

Dans le cadre de la surveillance après implantation de prothèse, il existe des risques de :

- migration prothétique, en particulier avec les prothèses siliconées ou si le patient nécessite une intubation en fin de procédure dans la prothèse (migration à l'extubation) ;
- bouchon muqueux intraprothétique, en particulier si la prothèse est couverte et longue, nécessitant une BS pour fibro-aspiration aidée par des fluidifiants (Mucofluid[®], etc.) ;
- fracture de prothèse avec obstruction intraluminaire, en particulier avec les prothèses métalliques pouvant occasionner des difficultés de ventilation ;
- hémoptysie sur prothèse métallique le plus souvent ;
- récurrence tumorale aux extrémités de la prothèse.

Sténoses trachéales et laryngotrachéales bénignes

Le tableau clinique classique est une bradypnée laryngée pouvant être très invalidante. Congénitale (25 %) ou acquise le plus souvent après intubation (75 %), une sténose est explorée par scanner avec reconstruction et par endoscopie souple, notamment afin de préciser le degré de sténose. Le traitement est soit chirurgical par plastie ou résection-anastomose, soit endoscopique par BR en effectuant une ouverture de la sténose par laser sur trois ou quatre points puis une dilatation de la sténose.

Malacie trachéobronchique

Sujette à controverse dans notre pratique courante, l'indication n'est qu'exceptionnellement retenue même si la question est récurrente dans le cadre d'un sevrage respiratoire difficile chez un patient insuffisant respiratoire chronique porteur d'une malacie importante de l'arbre trachéobronchique. Le plus souvent, la malacie persiste en distalité de la prothèse et la symptomatologie est donc inchangée ; par contre, on rajoute le risque d'obstruction et de migration prothétique (Fig. 87.5).

Fig. 87.5

Trachéomalacie isolée, visualisée au bronchoscope sous anesthésie générale en apnée avant pose de prothèse.

Hémoptysie

L'hémoptysie ([cf. chapitre 193](#)) nécessite à un moment une endoscopie, au moins pour un bilan diagnostique et topographique endobronchique. Si l'état du patient nécessite une réanimation, une BS, voire une BR pour aspiration des caillots peut être nécessaire. La BS peut être laborieuse pour décailloter l'arbre trachéobronchique, de par le petit diamètre du canal opérateur entraînant une faible puissance d'aspiration. De plus, l'endoscope peut détacher le caillot qui faisait l'hémostase. La difficulté est majorée en cas de saignement toujours actif inondant en permanence l'optique du fibroscope et obligeant à des allers-retours répétés. Il faut parfois privilégier dans ce cas une BR qui, grâce à des sondes d'aspiration de diamètre plus important, permettra le décaillotage endobronchique. Les hémoptysies massives sont intubées le plus souvent en sélectif afin de protéger le poumon sain d'une inondation intra-alvéolaire. Lors de la BR, il ne peut pas y avoir d'étanchéité, il n'y a donc plus de protection contre l'inondation par du sang du poumon lésé. Il faut donc bien peser les conséquences de ce geste. Une fois cette aspiration réalisée, l'endoscopie permettra de réaliser un bilan diagnostique en précisant l'origine, voire la cause du saignement. Un traitement local hémostatique peut être envisagé : sérum adrénaliné à 10 %, résection tumorale endoluminale, électrocoagulation, laser, tamponnement au coton monté, prothèse couverte, etc. L'essor d'une anti-agrégation simple ou double puissante, le recours étendu à une anticoagulation curative peuvent majorer une hémoptysie et rendre l'hémostase délicate.

Les principales étiologies sont tumorales, traumatiques, vasculaires, infectieuses, inflammatoires, et le traitement se fait en conséquence.

Fistules trachéopleurales, bronchopleurales, œsobronchiques ou trachéales

Ces situations posent le problème de l'inondation endobronchique par les liquides pleuraux et œsogastriques et de la ventilation du patient (fuite d'air par la bronche en cas de fistule libre dans la cavité pleurale). Dans les suites de résection pulmonaire, un bullage excessif par le drainage thoracique, surtout s'il est accompagné d'un défaut de réexpansion pulmonaire, est fortement évocateur d'une fistule broncho- ou trachéopleurale. Le diagnostic formel est endoscopique, par fibroscopie bronchique. Cette dernière doit être réalisée par un opérateur expérimenté pour orienter le traitement : chirurgical autant que possible, en particulier dans les suites immédiates, ou endoscopique dans certains cas.

Traitement chirurgical

Il doit être le plus souvent conservateur par reprise de suture avec enfouissement par lambeau pédiculé (intercostal, péricardique, pleural, etc.).

Traitement endoscopique des fistules bronchiques

L'obturation endoscopique d'une fistule bronchique peut être effectuée par encollage, par bouchon appelé spigot, ou recouvrement par prothèse pleine. Le choix de la technique dépend de la taille de la fistule, de sa localisation terminale sur un moignon bronchique ou latérale sur une réimplantation bronchique, et de l'état des tissus environnants. Cela peut entraîner l'obstruction des voies aériennes d'aval avec l'apparition d'une atélectasie qui pourra être source de pneumopathie infectieuse.

Les fistules œsotrachéales ou bronchiques d'origine néoplasique sont devenues bien plus fréquentes que celles de réanimation liées autrefois respectivement à l'intubation et aux barotraumatismes de la ventilation non protectrice. On associe classiquement une prothèse couverte œsophagienne à une prothèse bronchique dans les cas non chirurgicaux de fistule œsotrachéale.

Procédures associées aux fistules bronchiques

Le réanimateur doit le plus rapidement possible associer une ventilation spontanée au traitement chirurgical ou endoscopique d'une fistule bronchopleurale. L'objectif étant d'obtenir une pression pleurale à nouveau négative afin de réduire la contrainte des pressions de ventilation sur la zone fistulisée traitée. Cela est parfois extrêmement difficile du fait de l'atteinte parenchymateuse sous-jacente. Il existe de nouvelles techniques d'oxygénation extracorporelle et de ventilation sans déclenchement pneumatique, qui peuvent être discutées lors du traitement de certains cas de fistules sévères afin de contrôler l'hématose sous ventilation spontanée en fuite [6].

Intubation trachéale ou sélective

Intubation nasotrachéale chez un patient vigile

Après explication donnée au patient, la technique est réalisée sous anesthésie locale et légère sédation. La sonde d'intubation est montée sur le fibroscope et bloquée sur le talon de celui-ci. La fibroscopie bronchique est alors réalisée progressivement en complétant l'anesthésie locale par le fibroscope. Après franchissement laryngé et positionnement trachéal du fibroscope, la sonde d'intubation est poussée sur le fibroscope qui sert de guide. C'est la technique d'intubation recommandée :

- en présence d'affection oropharyngée aiguë avec œdème laryngé ;
- lors d'un traumatisme laryngotrachéal dont la forme complète est constituée par la désinsertion laryngotrachéale ;
- en cas d'absence d'ouverture buccale

Guidage endoscopique d'une intubation difficile au laryngoscope

La technique décrite au paragraphe précédent est appliquée dans ce cas sur un patient endormi. Il s'agit d'un geste d'intubation difficile.

Endoscopie bronchique chez un patient déjà intubé

L'endoscopie bronchique peut être utilisée pour contrôler le positionnement de la sonde d'intubation. Un fibroscope de petit calibre (version pédiatrique) est indispensable s'il s'agit d'une sonde à double courant pour contrôler le positionnement de l'extrémité bronchique ou encore un bloqueur bronchique.

Une BR permet la mise en place d'un mandrin d'Eichmann avant intubation par la sonde sur le mandrin après retrait du bronchoscope. Son utilisation est utile en cas d'œdème laryngé important, de saignement ORL ou trachéal haut empêchant la BS, de tumeur ORL ou trachéale haute responsable d'un affaissement important de la filière respiratoire. En effet, le bronchoscope rigide permet une subluxation antérieure de la filière qui peut permettre de retrouver et d'exposer la glotte.

Traumatisme thoracique

En cas de suspicion de rupture trachéobronchique, l'examen de référence reste l'endoscopie bronchique. Le traitement est généralement chirurgical.

Bilan diagnostique

L'endoscopie bronchique, par BS ou BR, peut apporter des renseignements primordiaux dans la prise en charge globale d'un patient de réanimation. De nombreuses situations cliniques et/ou radiologiques posent des problèmes diagnostiques pour lesquels il existe des possibilités d'exploration par endoscopie bronchique, comme :

- réaliser des biopsies transbronchiques échoguidées sur des lésions suspectes paratrachéales ;
- réaliser des biopsies pulmonaires de masse distale par mini-sonde échographique pour ne prendre que les exemples d'amélioration récents de la BS [7].

Risques de l'endoscopie interventionnelle

Toxicité induite par la xylocaïne

La lidocaïne instillée directement dans l'arbre bronchique est rapidement absorbée, même si une partie est aspirée par le bronchoscope. Les effets toxiques connus sont représentés par des convulsions et une dépression cardiaque. Il est recommandé de ne pas dépasser la posologie de 9 mg/kg chez l'adulte (approximativement 30 ml d'une solution à 2 % pour un patient de 70 kg) et plus particulièrement chez les patients âgés ou ayant une insuffisance cardiaque ou hépatique [8]. Le traitement de la toxicité systémique des anesthésiques locaux est basé sur une administration précoce d'émulsions lipidiques comportant un bolus (2 à 3 ml/kg) associé à un traitement symptomatique des troubles neurologiques et cardiaques [9].

Hypoxémie

La correction d'une anémie sévère est recommandée avant de réaliser une endoscopie trachéobronchique ainsi qu'un monitoring de la saturation cutanée pendant l'examen. Un seuil minimum de 90 % peut être toléré, ce qui correspond à une oxymétrie de 60 mm Hg. Une baisse de la PaO₂ d'environ 2,5 kPa (18 mm Hg) a été rapportée pendant des endoscopies. Une oxygénothérapie pendant l'examen, voire une ventilation non invasive, peut être utile pour les patients dont la fonction respiratoire est déjà altérée à l'état de base. Pour les patients de réanimation intubés-ventilés en détresse respiratoire aiguë, il existe un risque de dérecrutement alvéolaire important et donc de majoration d'une hypoxémie sévère. Cela peut empêcher de réaliser l'endoscopie.

Troubles du rythme cardiaque

Ils sont souvent liés à l'hypoxémie survenant pendant l'examen, donc plus fréquents chez les patients à fonction respiratoire altérée.

Risque de saignement

Le maintien du bronchoscope dans l'arbre bronchique jusqu'à l'arrêt du saignement semble essentiel.

Risque infectieux

La décontamination des endoscopes doit être stricte, contrôlée par traçabilité, car des infections nosocomiales consécutives à une endoscopie bronchique ont été rapportées.

Vidéotheque

Accessible par tous, une large banque de vidéos, expliquant les principes, le matériel, la technique et les indications de la BR, est disponible sur le site www.bronchotraining.org, réalisé par le Pr Dumon (Marseille).

Conclusion

L'endoscopie interventionnelle en réanimation peut permettre de traiter certaines détresses respiratoires. Elle permet essentiellement de reperméabiliser l'arbre trachéobronchique en permettant l'ablation de corps étrangers, de sténoses, de tumeurs avec un certain nombre d'outils spécifiques. L'histoire médicale du patient (soins palliatifs) et la tolérance du geste peuvent être une limite à son utilisation.

Références

- [1] Ikeda S, Tsuboi E, Ono R, *et al.* Flexible fiberscope. *Jpn J Clin Oncol*, 2010 Sep;40(9):e55-64.
- [2] Dumon JF. A dedicated tracheobronchial stent. *Chest*, 1990;97:328-32.
- [3] Aïssou M, Coroir M, Debes C, *et al.* Analyse du coût comparant les fibroscopes à usage unique (Ambu® aScope®) et les fibroscopes réutilisables pour l'intubation difficile. *Ann Fr Anest Rea*, 2013 ;32 :291-5.
- [4] Trosini-Désert V, Morin JM, Fournier C, *et al.* ; le GELF. Le compte-rendu de bronchoscopie souple : éléments de réflexion médico-juridique. *Rev Mal Respir*, 2010 ; 27 :729-40.
- [5] Ramon PP, Briche-Martin A, Fournier C. Place de la bronchologie interventionnelle dans la prise en charge des cancers bronchiques. *Rev Mal Respir*, 2005;22:8S106-11.
- [6] Rozé H, Ouattara A. Use of neural trigger during neurally adjusted ventilatory assist in a patient with a large broncho-pleural fistula and air leakage. *Intensive Care Med*, 2012;38:922-3.
- [7] Vergnon JM. La bronchoscopie dans le diagnostic du cancer bronchique. *Rev Mal Respir*, 2013 ; 5 : 339-45.
- [8] Febvre M ; le GELF. Les bonnes pratiques de la bronchoscopie souple diagnostique en 2007. *Rev Mal Respir*, 2007 ;24 :1363-92.
- [9] Lamblin A, Jean FX, Turc J, *et al.* Fibroscopie bronchique sous anesthésie locale à la lidocaïne : attention à la toxicité systémique. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2012 ;31 :979-80.

Figure 87.1 : Bronchoscope rigide.



Figure 87.2 : Introduction d'un bronchoscope rigide sous anesthésie.



Figure 87.3 : Désobstruction d'une sténose trachéale post-intubation par broncholaser.

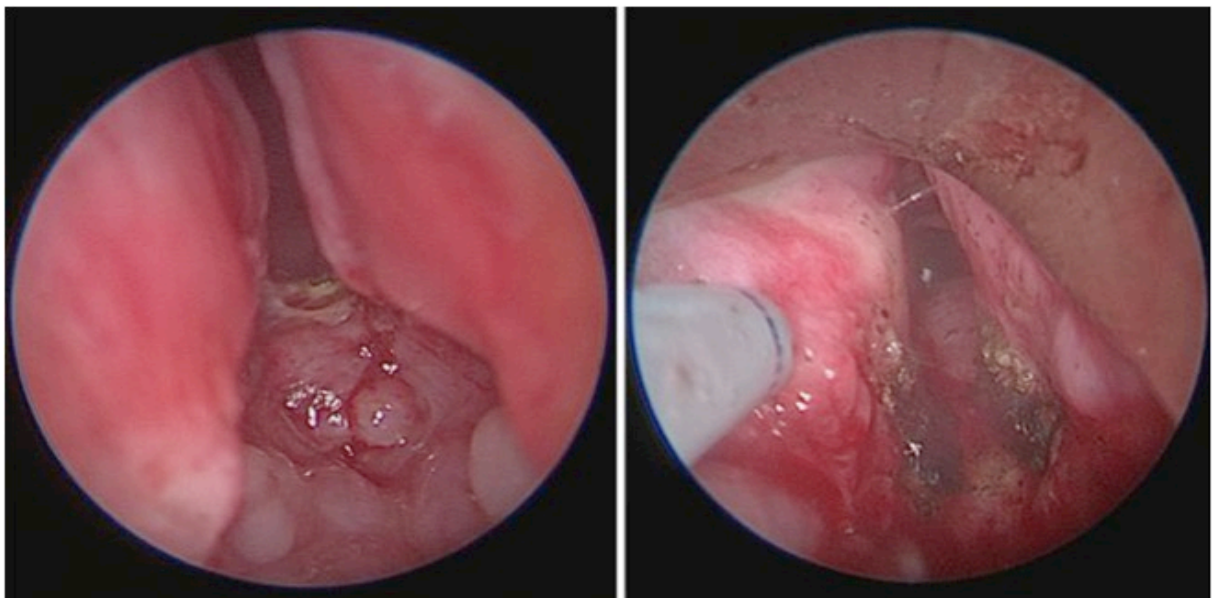


Figure 87.4 : A. Tumeur neuroendocrine endobronchique du tronc intermédiaire droit.
B. Désobstruction hémorragique au laser permettant la reperméabilisation des bronches lobaires inférieures et moyennes droites.

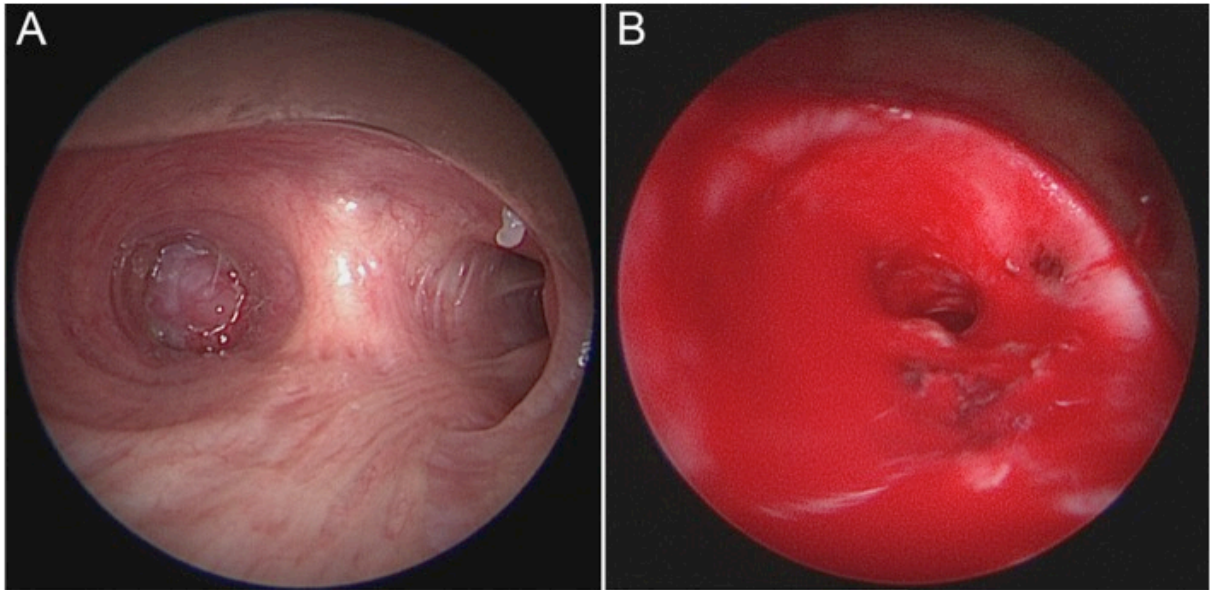


Figure 87.5 : Trachéomalacie isolée, visualisée au bronchoscope sous anesthésie générale en apnée avant pose de prothèse.



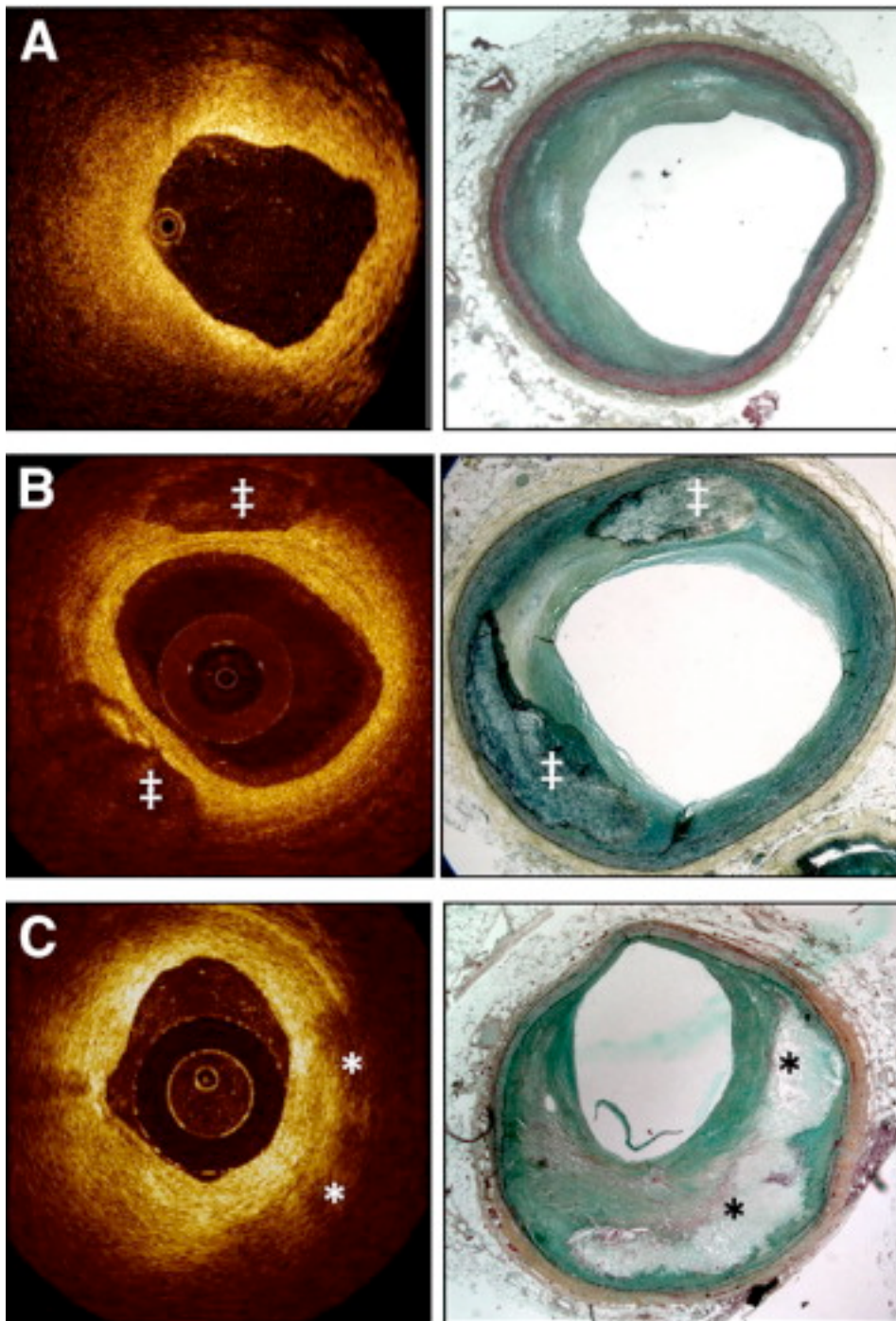
I-C-2 Perspectives

I-C-2-a Diagnostique

L'OCT (optical coherence tomography ou tomographie en cohérence optique) semble être une perspective diagnostique et de recherche fondamentale à partir d'une endoscopie : initialement développée en ophtalmologie, cette technique d'imagerie utilise une onde lumineuse (dans les infrarouges proches) pour capturer des images tridimensionnelles d'un matériel ou tissu biologique qui diffuse la lumière. La résolution est de l'ordre du micromètre voir inférieure en fonction des sources lumineuses utilisées, pour une pénétration sur 1 mm voir plus. Cette technique a été expérimentée pour bilan des sténoses coronariennes(111). L'adaptation sur un fibroscope bronchique semble intéressante (112) pour une étude de l'arbre principal située entre l'échographie (déjà disponible mais sensible aux cartilages trachéo-bronchiques) et la microscopie confocale (nécessite des prélèvements et donc présente des risques de complications et un manque de représentativité générale)(113). On pourrait, par cette technique, avoir une imagerie endoscopique de biomarqueurs, potentiellement reproductible à l'infini et ainsi apprécier les effets directs de nouveaux traitements (mesure d'épaisseur de MLB par exemple).

Par ailleurs, d'autres techniques sont décrites pour de nouveaux prélèvements endoscopiques comme la bronchoaspiration(114) réalisée au cours d'une fibroscopie souple : cela consiste en l'application sur la muqueuse bronchique d'un papier filtre pour analyse de chimiokine, MMP avec une détection bien meilleure que sur un LBA classique.

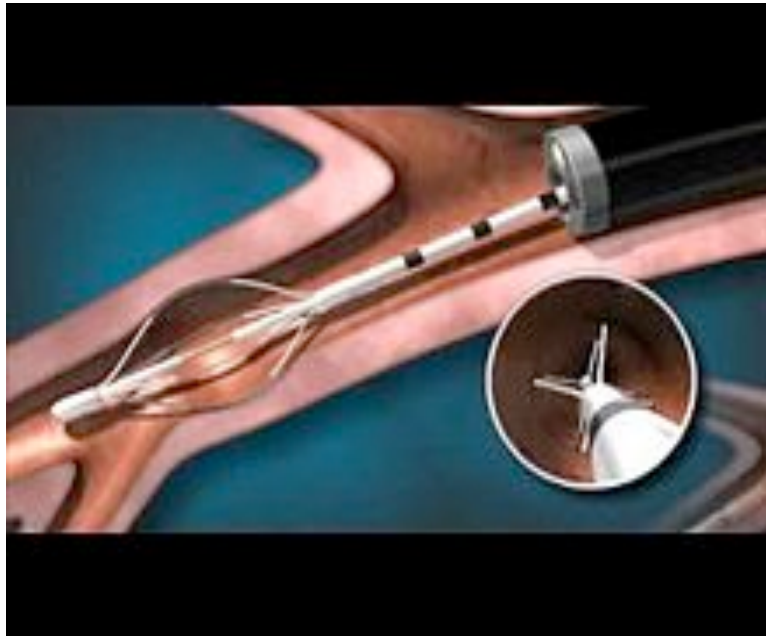
Figure 9 : Corrélation histologique d'image endocoronarienne obtenue par OCT(111) (A : plaque fibreuse, B : plaque calcifiée, C : dépôts lipidiques).



I-C-2-b Thérapeutique

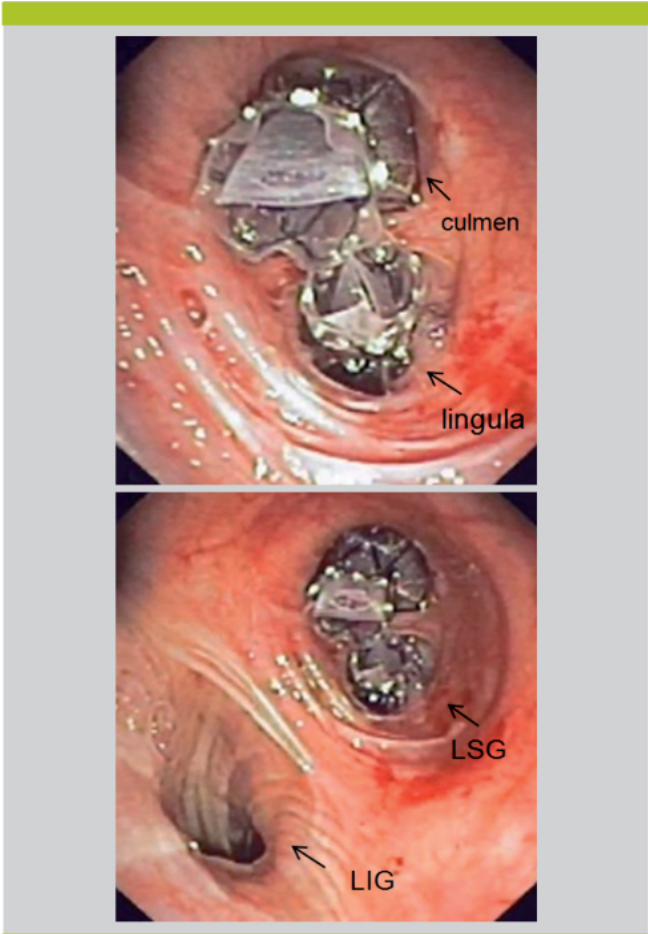
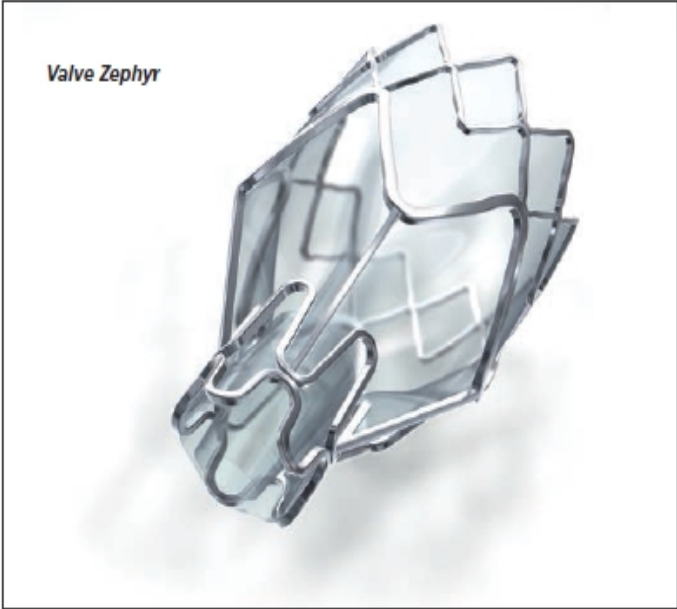
La thermoplastie bronchique est une technique de traitement endoscopique de l'asthme sévère par diminution de la masse de MLB(115). Seuls quelques centres experts en bénéficient à l'heure actuelle. L'évaluation de cette technique fait encore l'objet de nombreuses recherches et publications.

Figure 10 : Cathéter de thermoplastie endobronchique.



Les valves endobronchiques sont une autre thérapeutique prometteuse dans le traitement de la BPCO avec zone emphysémateuse non fonctionnelle cible. Leur probable miniaturisation va étendre un peu plus le champ d'investigation.

Figure 11 : Valve endobronchique Zephyr déployée et intrabronchique au niveau du lobe supérieur gauche (*2).



Chapitre II :

Matériels et

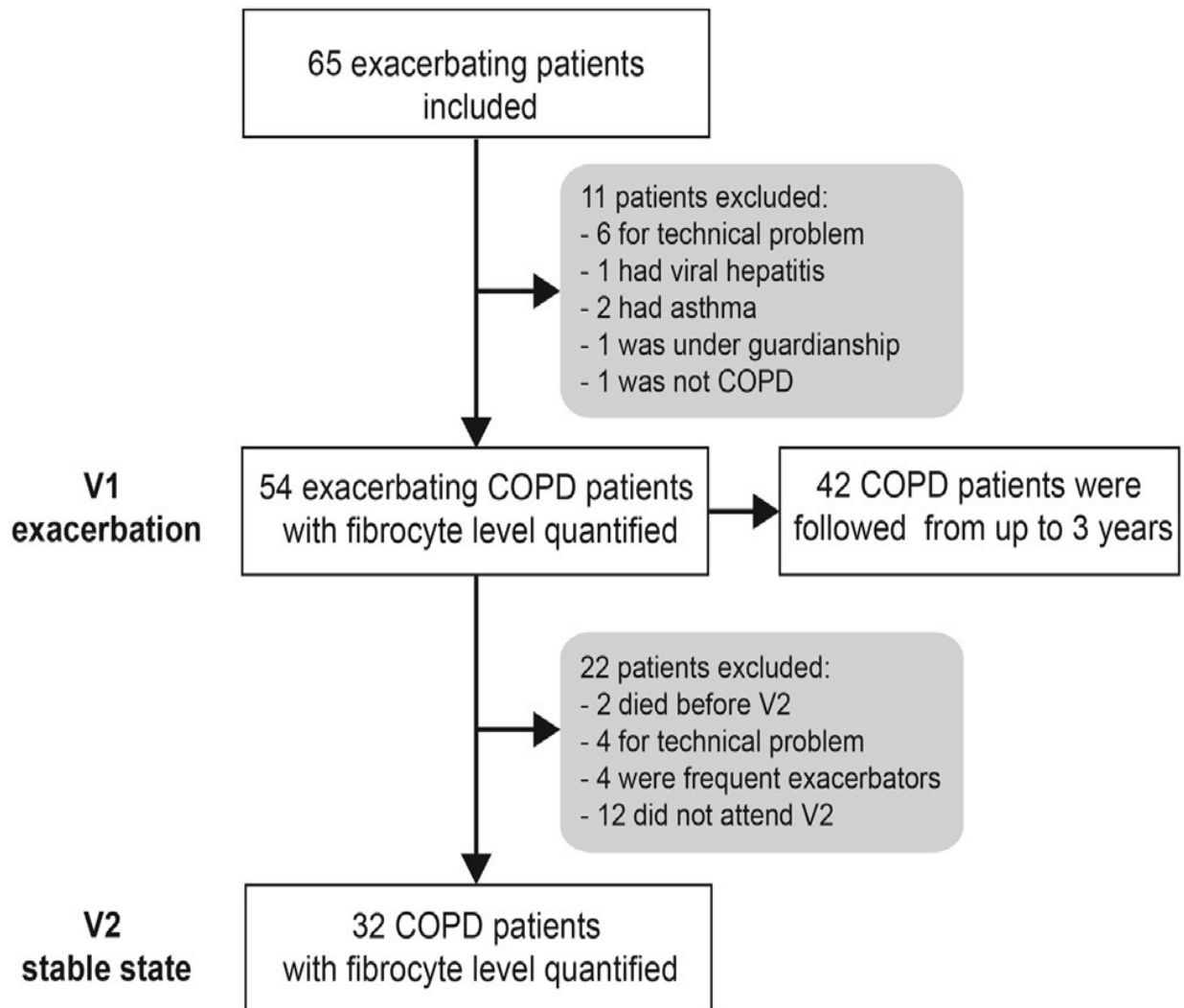
Méthodes

II-A Design des études

II-A-1 Design de Firebrob (chapitre III-A)

Ci-dessous, le résumé schématisé de cette étude, le design complet et la population étant décrits dans le chapitre IIIA :

Figure 12 : Design de l'étude Firebrob.



II-A-2 Design de Fibrochir (chapitre III-B)

Il s'agit d'une étude observationnelle quantitative des fibrocytes sanguins et pulmonaires chez le patient BPCO hors exacerbation comparé à deux groupes témoins fumeur ou non. Cette étude clinique et biologique bénéficie d'une promotion par le CHU de Bordeaux, d'un financement auprès de l'INSERM 1045 et de l'association pour l'encouragement à la recherche en chirurgie et transplantation trachéale et pulmonaire (AERCTP). Elle a l'aval du comité de protection des

personnes du sud-ouest III et outre-mer et tous les patients ont signé un consentement libre et éclairé au moment de l'inclusion. Elle est enregistrée à ClinicalTrials.gov sous le no. NCT01692444.

II-A-2-a Population de l'étude

Les critères d'inclusion étaient :

- les patients de plus de 40 ans
- devant bénéficier d'une chirurgie pulmonaire à type de lobectomie ou segmentectomie pour cancer classé pN0 (les pN1 étaient finalement non-inclus) ou de transplantation pulmonaire (BPCO stade 4).
- ayant signé un consentement éclairé
- soit présentant une BPCO de stade 1 à 4, sans exacerbation depuis 1 mois minimum, soit témoins (EFR normale sans bronchite chronique) fumeur (sevré ou non) ou non-fumeur.

Les critères d'exclusion étaient principalement un antécédent d'asthme, de fibrose pulmonaire, d'hypertension artérielle pulmonaire primitive ou de mucoviscidose (ou l'inclusion dans un autre protocole excluant une étude annexe, une infection virale (hépatites, VIH), la grossesse ou l'allaitement, les patients sous tutelle, curatelle, privés de liberté ou non affilié à un régime de sécurité sociale, protégés par la loi).

Une prévision d'inclusion de 45 patients répartis en 3 groupes a été calculée selon une estimation à partir de données obtenues chez les sujets asthmatiques réfractaires par rapport à des sujets asthmatiques non réfractaires(6). La différence attendue entre les deux groupes d'intérêt (BPCO fumeurs et sujets sains fumeurs) est de 4,5 fibrocytes/mm² de muscle lisse bronchique avec un écart-type de 4,7. Un nombre de 15 sujets par groupe était nécessaire pour une puissance de 80% avec un risque de première espèce alpha de 0,05 ; soit un total de 45 sujets.

- un groupe BPCO (15) (stade GOLD 2011 de 1 à 4)
- un groupe témoin fumeur (15) sevré ou non
- un groupe témoin non-fumeur (15)

La durée totale d'inclusion, de 1 an initialement, a finalement été allongée à deux ans, soit environ 2 inclusions par mois. Les inclusions ont été faites d'avril 2013 à avril 2015 et sont donc terminées. L'étude se poursuit comme le souligne le design.

II-A-2-b Design de l'étude

Elle consiste en 4 visites médicales (V1 à 4), un prélèvement chirurgical pulmonaire et un prélèvement sanguin.

V1 correspondait à la consultation chirurgicale pour explications du projet thérapeutique propre au patient puis de l'étude avec remise du consentement après vérification des critères d'exclusion

V2 correspondait à la veille de la chirurgie ou 8 jours minimum après V1 pour :

- inclusion,
- recueil du consentement signé,
- données cliniques : générales, questionnaire CAT, questionnaire de qualité de vie Saint-Georges, test de marche de 6 min,
- données radiologiques avec la réalisation d'un scanner thoracique en inspiration et expiration, voir une échocardiographie si non réalisée avant pour bilan fonctionnel préopératoire et vérification de l'absence d'HTAP

-données fonctionnelles avec la réalisation d'EFR : pléthysmographie, TLCO, gaz du sang.

La chirurgie a été réalisée après V2 (le lendemain pour la chirurgie néoplasique ou à distance pour les transplantations). Le recueil de l'échantillon sanguin (30ml dans tube EDTA) a été réalisé au moment de la pose de voie veineuse pour l'anesthésie puis acheminé à l'INSERM 1045 pour analyse. Le recueil des échantillons pulmonaires a été réalisé sur pièce opératoire au laboratoire d'anatomopathologie pour un conditionnement rapide après acheminement dès l'exérèse.

V3 correspondait à une consultation de suivi à un mois et demi pour recueil de données cliniques et spirométriques.

V4 correspond à une consultation de suivi à un an pour recueil de données cliniques, questionnaire Saint-Georges, CAT et spirométrie. La dernière inclusion ayant eu lieu en avril 2015, V4 se poursuit jusqu'en avril 2016.

Le suivi de V1 à V3, comprenant les prélèvements, a été effectué dans le service de chirurgie thoracique du CHU de Bordeaux. V4 est réalisée au centre d'investigation clinique (CIC1401). Les données cliniques sont collectées au CIC 1401.

L'objectif principal est l'évaluation du nombre de fibrocytes bronchiques par surface de tissu analysé.

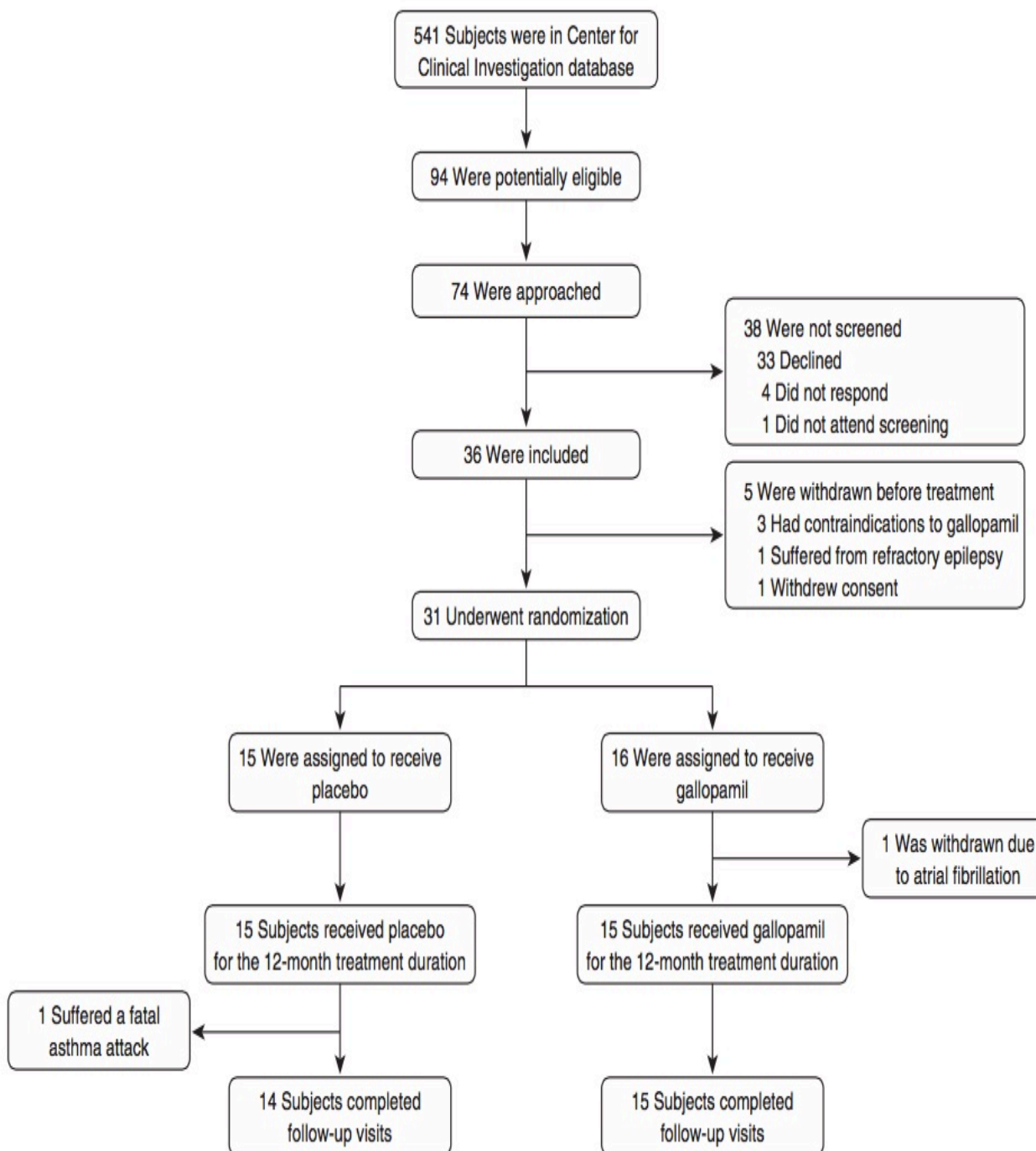
Les objectifs secondaires sont :

- l'évaluation du nombre de fibrocytes sanguins
- la caractérisation des fibrocytes bronchiques
- la corrélation données scannographiques / données fibrocytes
- la corrélation données spirométriques / données fibrocytes
- l'évaluation de données spirométriques et fonctionnelles après chirurgie pulmonaire, notamment la prédiction du VEMS postopératoire en fonction de données scannographiques et l'évolution à un an de la fonction respiratoire après chirurgie.

II-A-3 Design de Remodel'asthme (chapitre III c)

La population et le design de l'étude sont décrits dans l'article dont voici un schéma récapitulatif :

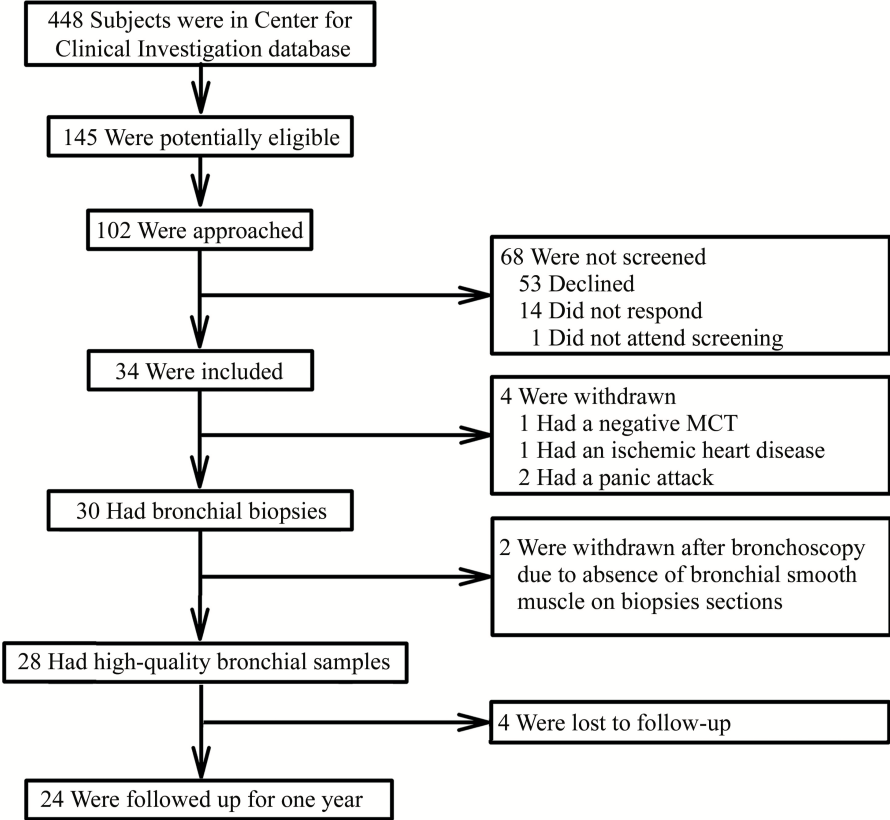
Figure 13 : Design de l'étude Remodelasthme.



II-A-4 Design de Mit'asthme (chapitre III-D)

La population et le design de l'étude sont décrits dans l'article dont voici un schéma récapitulatif :

Figure 14 : Design de l'étude Mitasthme.



II-B Méthodes employées

II-B-1 Firebrob

II-B-1-a Identification des fibrocytes circulants

Comme décrit dans l'article chapitre III A, la technique s'est inspirée des articles de Wang(51) et Moeller(4) pour isoler, par cytométrie en flux, les fibrocytes dans les cellules PBMC (peripheral blood mononuclear cell) et NANT (Non Adherent Non T) du sang total prélevé. La morphologie des fibrocytes a été vérifiée par microscopie en contraste de phase.

II-B-1-b Migration des fibrocytes

Grace à une chambre de Boyden modifiée(78), la migration de fibrocyte après modulation par des antagonistes de CXCR4 (plerixafor) ou CCR3 (SB 328437) a été testée sous condition de stimulation par CXCL12 ou CCL11 ou plasma.

II-B-1-c Dosage de CXCL12 et CCL11

Décrits chapitre IIIA.

II-B-1-d Analyse statistique

Décrite chapitre IIIA

II-B-2 Fibrochir

II-B-2-a Identification des fibrocytes circulants

La technique est la même que celle décrite dans Firebrob (chapitre IIIA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fibrocytes dans les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) ou les NANTc (Non Adherent Non T cells).

II-B-2-b Identification des fibrocytes péri-bronchiques

Une technique en immunohistochimie est réalisée sur les prélèvements pulmonaires réalisés en zone saine (à distance du cancer pour les prélèvements de résection néoplasique) au niveau proximal (bronche segmentaire) et distal (parenchyme). Des conditionnements en paraffine ou en congélation sont réalisés pour analyses ultérieures.

L'analyse immunohistochimique est réalisée sur des coupes tissulaires de 4 µm d'épaisseur effectuées au cryostat. La technique de double marquage immunohistochimique est réalisée sur l'automate Bond-III™ (Bond-III™, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K) en utilisant les réactifs du fournisseur. Les coupes congelées sont incubées avec l'anticorps primaire anti-CD45 (dilution 1/1000; Clone 2B11+PD7/26; DAKO) pendant 15 minutes à température ambiante. Puis pour visualisation de la réaction est utilisé le kit de détection Bond™ Polymer Refine Detection kit (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon

Tyne, U.K) selon les instructions du fournisseur. Le chromogène utilisé est le Mixed Red Refine (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K). Ensuite, est réalisé d'emblée le second marquage avec l'anticorps anti-collagène type I (dilution 1/50; clone 5D8-G9; Millipore) dans les mêmes conditions que pour l'anti-CD45; seule diffère le chromogène utilisé en fin de réaction qui est le Mixed DAB Refine (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K). La réaction se termine par une contre coloration par l'hématoxyline. Un contrôle négative est réalisé parallèlement. Les lames colorées sont examinées au microscope Nikon-Eclipse501. Les photos sont acquises avec le logiciel NDP View 1.2.60 (NanoZoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer, Hamamatsu).

II-B-2-c Mesures scannographiques

Avant les prélèvements biologiques (la veille pour résection néoplasique, sinon avant une transplantation), un scanner thoracique est réalisé. Il s'agit d'un scanner thoracique 16 multi-barrettes (Somatom Sensation 16; Siemens Medical Solution, Forchheim, Allemagne), non injecté, utilisant les paramètres suivants (110-kV tube voltage, 50-mAs tube current and 0.75-mm collimation), en inspiration profonde et expiration profonde, en coupe millimétrique après reconstruction. Grâce au logiciel Myrian, les fichiers images sont traités pour mesures des paramètres parenchymateux suivants :

- volume pulmonaire total et fonctionnel ($\text{total} \times (1 - \text{LAA}\%)$)
- densités pulmonaires totales en inspiration et expiration en unités Hounsfield (UH)
- emphysème pulmonaire sur acquisition en inspiration du pourcentage de parenchyme au dessous de -950 UH(116) ou LAA% (Low Attenuation Area%).
- air trapping 950 ou 1024 sur acquisition en expiration du pourcentage de parenchyme entre -850 UH(117) et -950 UH ou -1024 UH.
- ratio ou différence de densité pulmonaire (Expi/Inspi ou Inspi-Expi)(118)(119).

Grâce au logiciel ImageJ, les fichiers images sont traités pour mesures des paramètres vasculaires pulmonaires suivants :

- nombre et taille moyenne (mm) de vaisseaux pulmonaires entre 1 et 5 mm, de vaisseaux pulmonaires supérieurs à 5 mm et le nombre total de vaisseaux
- surface totale (mm^2) de vaisseaux de 1 à 5 mm, de vaisseaux supérieurs à 5 mm et vasculaire totale
- surface totale (mm^2) pulmonaire.
- rapport de surface de vaisseaux / poumon pour les trois surfaces vasculaires
- mesure de CSA : cross sectional area ou le rapport de l'aire vasculaire sur l'aire pulmonaire d'une coupe, la moyenne des CSA donnant donc une valeur moyenne de l'aire vasculaire par unité de surface. Les CSA sont mesurés pour les vaisseaux inf à 5 mm, sup à 5 mm et totaux
- mesure de CSN : cross sectional number ou le rapport du nombre de vaisseaux sur l'aire pulmonaire d'une coupe, la moyenne des CSN d'un individu donnant donc une valeur moyenne du nombre de vaisseaux par unité de surface. Les CSN sont mesurés pour les vaisseaux inf à 5 mm, sup à 5mm et totaux.

Grâce au logiciel Medical Imaging, les fichiers images sont traités pour mesures de paramètres bronchiques suivants:

- WA (Wall Area) 4 et 5 : mesure en mm^2 de la surface de paroi bronchique des segments 4 et 5 bronchiques. C'est en fait une moyenne de 8 mesures (2 par bronche sur 2 bronches, bilatéralement).

- LA (Lumen Area) 4 et 5 : mesure en mm^2 de la surface de lumière bronchique des segments 4 et 5 bronchiques. C'est en fait une moyenne de 8 mesures (2 par bronche sur 2 bronches, bilatéralement).
- LD (Lumen Diameter) 4 et 5 : mesure en mm du diamètre interne bronchique des segments 4 et 5 bronchiques, calculé par la formule $LD = 2 \cdot \sqrt{(LA/\pi)}$.
- WT (Wall Thickness) 4 et 5 : mesure en mm de l'épaisseur de paroi bronchique des segments 4 et 5 bronchiques, calculé par la formule $WT = \sqrt{((WA+LA)/\pi)} - \sqrt{(LA/\pi)}$.
- WA% 4 et 5 : normalisation de la WA par le diamètre total bronchique calculé par la formule $D = 2 \cdot \sqrt{((WA+LA)/\pi)}$.

II-B-2-d Mesures spirométriques

- Réalisation d'une pléthysmographie corporelle totale avec mesure de la CPT, du VR, du VEMS, de la CVF, des DEMM et du rapport de Tiffeneau
- Capacité de transfert du CO (TLCO)
- Gazométrie artérielle : PaO₂, PaCO₂ et pH

Les mesures sont réalisées la veille de l'intervention ou dans le bilan pré-transplantation, puis à un mois et demi et à un an.

II-B-2-e Analyse statistique

Elle doit permettre de comparer les critères de jugement entre les 3 groupes de patients. Un test d'analyse de variance (ANOVA) sera utilisé pour les variables paramétriques dont on a vérifié l'homogénéité des variances, il sera suivi de test de comparaison multiple type Bonferroni. Un test de Kruskal-wallis permet de comparer les variables non-paramétriques associé à un z test comme test de comparaison multiple. Le test de pearson permet une mesure de corrélation entre les variables, la corrélation étant retenue pour un $p < 0,05$ et exprimée en $r =$ entre -1 et 1. Un seuil de 0,05 pour l'ensemble des tests est considéré comme significatif. Les analyses sont réalisées avec SPSS.

II-B-3 Remodel'asthme

Les méthodes de scannographie, d'endoscopie, de microscopie optique, d'immunohistochimie et de microscopie électronique ainsi que les analyses statistiques sont décrites chapitre IIIC.

II-B-4 Mit'asthme

Les méthodes d'endoscopie, de microscopie optique, d'immunohistochimie et de microscopie électronique ainsi que les analyses statistiques sont décrites chapitre IIID.

Chapitre III :

Résultats et

Discussion

III-A Etude des fibrocytes sanguins pendant et au décours d'une exacerbation de BPCO (Firebrob)

Peu d'études ont été réalisées sur le rôle potentiel que pourraient avoir les fibrocytes sanguins dans la BPCO, notamment après exacerbation qui correspond à une phase inflammatoire puis une phase réparatrice souvent responsable d'un déclin progressif de la fonction respiratoire et d'une augmentation du risque de décès(120). Les exacerbations sévères (avec hospitalisation) de BPCO sont considérées comme un facteur pronostique indépendant de mortalité(121). Elles sont d'autant plus fréquentes que la BPCO s'aggrave et un phénotype de BPCO étiqueté « d'exacerbation fréquente » semble se détacher d'étude épidémiologique sur de larges cohortes(122). Ce phénotype caractérisé par un important statut inflammatoire(123) apparaît être une cible privilégiée d'étude des mécanismes inflammatoires comme l'implication des fibrocytes.

Il n'est pas retrouvé de fibrocytes pulmonaires chez les sujets sains. Par contre, dans des pathologies pulmonaires comme l'asthme ou la fibrose pulmonaire idiopathique, le rôle des fibrocytes en tant qu'immunomodulateur et en tant que potentialisateur ou progéniteur d'une différenciation en fibroblaste/myofibroblaste et donc en tant que réparateur, a été établi. Dans la fibrose idiopathique pulmonaire, il a été montré que le taux de fibrocytes sanguins était corrélé au pronostic de la maladie(4). Le recrutement des fibrocytes sanguins vers le compartiment pulmonaire semble faire interagir principalement l'axe de stimulation CXCL12 sur le récepteur CXCR4 du fibrocyte(46). Toutes ces constatations font que l'étude Firebrob a été élaborée pour tenter d'avoir un début de réponse sur l'implication des fibrocytes au cours d'exacerbation de patient BPCO.

Article 2 : Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4 dependent pathway

Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4-dependent pathway

Isabelle Dupin, PhD,^{a,b} Benoit Allard, PhD,^{a,b,*} Annaig Ozier, MD, PhD,^{a,b,c,*} Elise Maurat, MSc,^{a,b} Olga Ousova, PhD,^{a,b} Eva Delbrel, MSc,^{a,b} Thomas Trian, PhD,^{a,b} Hoang-Nam Bui, MD,^c Claire Dromer, MD,^c Olivier Guisset, MD,^c Elodie Blanchard, MD,^c Gilles Hilbert, MD, PhD,^c Frédéric Vargas, MD, PhD,^c Matthieu Thumerel, MD,^{a,b,c} Roger Marthan, MD, PhD,^{a,b,c} Pierre-Olivier Girodet, MD, PhD,^{a,b,c,†} and Patrick Berger, MD, PhD^{a,b,c,‡} Bordeaux and Pessac, France

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by peribronchial fibrosis. The chronic course of COPD is worsened by recurrent acute exacerbations.

Objective: The aim of the study was to evaluate the recruitment of blood fibrocytes in patients with COPD during exacerbations and, subsequently, to identify potential mechanisms implicated in such recruitment.

Methods: Using flow cytometry, we quantified circulating fibrocytes and characterized their chemokine receptor expression in 54 patients with COPD examined during an acute exacerbation (V1) and 2 months afterward (V2) and in 40 control subjects. The role of the chemokines CXCL12 and CCL11 in fibrocyte migration was investigated by using a chemotaxis assay. Patients were followed for up to 3 years after V1.

Results: We demonstrated a significantly increased number of circulating fibrocytes at V1 compared with control subjects. The number of circulating fibrocytes decreased at V2. A high

percentage of circulating fibrocytes during exacerbation was associated with increased risk of death. The percentage of fibrocytes at V2 was negatively correlated with FEV₁, forced vital capacity, FEV₁/forced vital capacity ratio, transfer lung capacity of carbon monoxide, and PaO₂. Fibrocytes highly expressed CXCR4 and CCR3, the chemokine receptors for CXCL12 and CCL11, respectively. Fibrocytes collected from patients with COPD at V1 had increased chemotactic migration in response to CXCL12 but not to CCL11 compared with those from control subjects. Plerixafor, a CXCR4 antagonist, decreased fibrocyte migration to plasma from patients with exacerbating COPD.

Conclusion: Blood fibrocytes are recruited during COPD exacerbations and related to mortality and low lung function. The CXCL12/CXCR4 axis is involved in such fibrocyte recruitment (Firebrob study; ClinicalTrials NCT01196832). (J Allergy Clin Immunol 2015;■■■:■■■-■■■.)

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease, fibrocyte, mortality, lung function, chemotaxis

From ^aUniv-Bordeaux and ^bINSERM, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, Département de Pharmacologie, Bordeaux, and ^cCHU de Bordeaux, Service d'exploration fonctionnelle respiratoire, Service de pneumologie, Services de réanimation médicale, Service de chirurgie thoracique, Pessac.

*These authors contributed equally to this work.

†These authors contributed equally to this work.

Sponsored by Bordeaux University Hospital (ie, CHU de Bordeaux) and supported by 3 grants from Nycomed, Takeda, and Fondation du Souffle-Fonds de dotation Recherche en Santé Respiratoire.

Disclosure of potential conflict of interest: I. Dupin has received research support from Nycomed, Takeda, and Fondation du Souffle-Fonds de dotation Recherche en Santé Respiratoire and has a patent pending (EP No. 15152886.6; ie, New compositions and methods of treating and/or preventing chronic obstructive pulmonary disease). P.-O. Girodet has received research support from Nycomed, Takeda, Fondation du Souffle-Fonds de dotation Recherche en Santé Respiratoire, Novartis, Pierre Fabre, Almirall, Chiesi, Boehringer Ingelheim, and AstraZeneca and has a patent pending (EP No. 15152886.6; ie, New compositions and methods of treating and/or preventing chronic obstructive pulmonary disease). P. Berger has received research support from Nycomed, Takeda, Fondation du Souffle-Fonds de dotation Recherche en Santé Respiratoire, Novartis, Pierre Fabre, Chiesi, Boehringer Ingelheim, AstraZeneca, and GlaxoSmithKline and has a patent pending (EP No. 15152886.6; ie, New compositions and methods of treating and/or preventing chronic obstructive pulmonary disease). The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication May 26, 2015; revised August 11, 2015; accepted for publication August 24, 2015.

Corresponding author: Isabelle Dupin, PhD, or Patrick Berger, MD, PhD, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: isabelle.dupin@u-bordeaux.fr. Or: patrick.berger@u-bordeaux.fr.

0091-6749/\$36.00

© 2015 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.043>

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a very frequent airway disease that affects more than 200 million persons worldwide.¹ The main risk factor for COPD is tobacco smoking.¹ COPD is currently the fifth leading cause of death but might reach the fourth cause of death toward 2030.² The disease is characterized by chronic bronchial inflammation and remodeling of the distal airways and in particular bronchial and peribronchial fibrosis, leading to persistent airflow limitation.³ Current pharmacologic treatments act on symptoms and quality of life but do not improve mortality or the natural history of the disease, with the latter being characterized by a more rapid decrease in lung function.^{4,5}

The chronic course of COPD is also frequently worsened by acute exacerbations (acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [AECOPDs]) most often related to viral or bacterial infections.⁶ These AECOPDs are associated with various sputum cellular profiles, including neutrophils and eosinophils.⁷ AECOPDs affect nearly 80% of patients with COPD over a 3 year-period, and the frequency of exacerbation is mainly related to the occurrence of previous exacerbations.⁸ AECOPDs generate enormous health care costs, especially related to hospitalizations. AECOPDs dramatically affect quality of life and worsen the disease: lung function decreases more rapidly in patients with frequent exacerbations, with an increased risk of death.⁹ In particular, a high mortality rate has been

Abbreviations used

AECOPD: Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease
 APC: Allophycocyanin
 CAT: Control Assessment Test
 COPD: Chronic obstructive pulmonary disease
 FVC: Forced vital capacity
 NANT: Nonadherent non-T
 SGQLQ: St Georges Quality of Life Questionnaire
 TLCO: Transfer lung capacity of carbon monoxide

reported in patients with COPD admitted to the hospital for AECOPDs¹⁰ and reaches up to 45% within the 4 subsequent years.¹¹ Severe AECOPDs are even considered an independent prognostic factor for mortality.¹⁰ However, the mechanisms underlying these latter findings remain totally unknown.

Fibrocytes are progenitor cells derived from bone marrow.¹² These cells circulate in the bloodstream and are recruited into injured tissues, where they influence tissue inflammation and remodeling.¹² Indeed, fibrocytes could differentiate into fibroblasts and myofibroblasts¹³ in lung tissues. An increased peripheral blood fibrocyte count has been observed in patients with chronic obstructive asthma,¹⁴ idiopathic pulmonary fibrosis,¹⁵ or Hermansky-Pudlak syndrome.¹⁶ In addition, an increase in circulating fibrocyte counts has also been observed during acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis¹⁵ and asthma¹⁷ compared with the stable state, suggesting that exacerbation could play a role in fibrocyte recruitment. To date, the migration of fibrocytes during and after an AECOPD has not been investigated.

Here we report the result of a translational clinical trial in which we studied peripheral blood fibrocyte counts in patients with COPD during an exacerbation and 2 months after an exacerbation in comparison with those in control subjects and patients with nonexacerbating COPD. We also characterized chemokine receptors and investigated the migratory properties of these fibrocytes from patients with COPD and control subjects to unravel the implicated mechanisms.

METHODS

A full description of the methods used in this study is presented in the [Methods](#) section in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

Study populations

A total of 65 patients with AECOPDs, 9 patients with nonexacerbating COPD, and 50 control subjects were prospectively recruited from the University Hospital of Bordeaux. AECOPDs were identified according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease criteria¹ as a change in the patient's baseline dyspnea, cough, and/or sputum that is beyond normal day-to-day variations, is acute in onset, and might warrant a change in regular medication. Patients with nonexacerbating COPD were selected from the Cohorte Obstruction Bronchique et Asthme (COBRA; sponsored by the French National Institute of Health and Medical Research [INSERM]) cohorts and did not experience any exacerbation during a preceding minimal period of 12 months. Healthy volunteers had normal lung function test results and no history of lung disease. All subjects provided written informed consent to participate in the study after the nature of the procedure had been fully explained. The local research ethics committee ("Comité de Protection des Personnes") of the southwest area (France) and the French National Agency

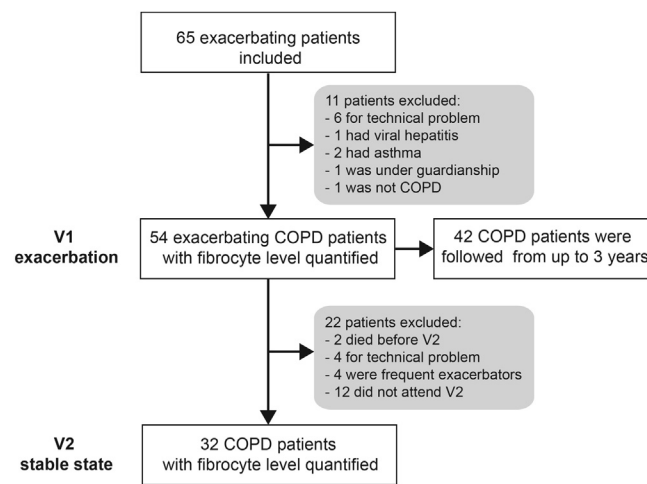


FIG 1. Study design. Numbers of patients who were included and had their fibrocyte counts quantified.

for Medicines and Health Products Safety approved the research protocol in March 2010.

Study design

This clinical trial was sponsored by the University Hospital of Bordeaux. The study has been registered under as no. NCT01196832 at ClinicalTrials.gov.

The study design is summarized in [Fig 1](#). Two visits were scheduled for patients with exacerbating COPD: visit 1 (V1; inclusion) during an exacerbation and visit 2 (V2; stable state) 2 months \pm 7 days after an exacerbation. There was only 1 visit for control subjects and patients with nonexacerbating COPD.

Identification and characterization of circulating fibrocytes

Nonadherent non-T (NANT) cells were obtained, as described previously, with some modifications.¹⁴ Briefly, PBMCs were first separated from whole blood by means of Ficoll-Hypaque (Dutscher, Brumath, France) density gradient centrifugation. After erythrocyte lysis and incubation for 1 hour at 37°C, the nonadherent mononuclear cells were further depleted with an anti-CD3 mAb (Miltenyi Biotec, Paris, France).

Fibrocytes were then identified by using flow cytometry as positive for both the cell-surface marker CD45 and intracellular collagen I (see [Fig E1, A-E](#), in this article's Online Repository at www.jacionline.org), as described previously by Moeller et al.¹⁵ Expression of the CD34 progenitor cell marker and chemokine receptors was also assessed by means of flow cytometry with specific fluorescent antibodies directed against CD34, CCR3, CCR7, CXCR4 (BD Biosciences, San Jose, Calif), and CCR2 (R&D Systems, Lille, France). Blood fibrocyte morphology was checked by using phase-contrast microscopy (Nikon, Champigny sur Marne, France; see [Fig E1, F](#)).

Fibrocyte migration

Fibrocyte chemotaxis was assessed by using a modified Boyden chamber assay.¹⁸ When indicated, NANT cells were pretreated for 1 hour at 37°C with an antagonist of CXCR4 (25 μ g/mL plerixafor; Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) or an antagonist of CCR3 (3.8 μ g/mL SB 328437, R&D Systems). Recombinant human CXCL12- α or CCL11 (both from R&D Systems) or plasma was added to the bottom compartment of each well. After 12 hours, the content of the bottom compartment was removed to assess fibrocyte migration by using flow cytometry, as described above.

Measurement of plasma CXCL12 and CCL11 concentrations

Plasma concentrations of CXCL12- α (R&D Systems), CXCL12- β (Sigma-Aldrich), and CCL11 (R&D Systems) were measured by using an ELISA.

Statistical analysis

Values are presented as means \pm SDs or medians (95% CIs). Statistical significance ($P < .05$) was analyzed by using Fisher exact tests for comparison of proportions, by using t tests and multivariate ANOVA for variables with parametric distribution, and by using the Kruskal-Wallis test with multiple comparison z tests, Mann-Whitney tests, Wilcoxon tests, and Spearman correlation coefficients for variables with nonparametric distribution. Survival in patients with exacerbating COPD was compared by using Kaplan-Meier analysis.

RESULTS

Enrollment and baseline characteristics

[T1] Fig 1 shows the number of patients who were enrolled, excluded, and followed for up to 3 years. From a total of 65 enrolled patients, we successfully quantified fibrocyte counts in 54 patients with exacerbating COPD (V1) and 32 patients with COPD in a stable state (V2). We also enrolled 50 control subjects, and fibrocyte counts were quantified in 40 of them. The 2 groups were well matched for age, sex ratio, and body mass index (Table I). However, as expected, patients with COPD were significantly different from control subjects in terms of smoking habits, hospitalization, breath type, and lung function (FEV₁, forced vital capacity [FVC], FEV₁/FVC ratio, transfer lung capacity of carbon monoxide [TLCO], and Pao₂; Table I). We also quantified fibrocyte counts in 9 patients with nonexacerbating COPD (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org for patients' characteristics).

Circulating fibrocytes and COPD exacerbation

[F2] The percentage of blood fibrocytes (CD45⁺Col1⁺ cells) in PBMCs was higher in patients with COPD during exacerbation (median, 10.2% [95% CI, 9.9% to 15.5%] of PBMCs, $n = 54$) compared with that in patients with nonexacerbating COPD (median, 2.4% [95% CI, 0.8% to 6.3%] of PBMCs, $n = 9$; $P < .01$) or control subjects (median, 3.1% [95% CI, 3.1% to 5.1%] of PBMCs, $n = 40$; $P < .001$; Fig 2, A). Similar results were obtained with fibrocyte count expressed as the number of cells per milliliter of blood (Fig 2, B). Both the percentages (Fig 2, C) and absolute numbers (Fig 2, D) of circulating CD34⁺ fibrocytes were increased in patients with exacerbating COPD compared with those in control subjects. In control subjects, when subgroups were defined on the basis of smoking habits (current and former smokers vs never smokers), no significant difference in fibrocyte counts between the subgroups could be evidenced (data not shown). In patients with exacerbating COPD, when subgroups were defined on the basis of treatment for the exacerbation (antibiotics and oral corticosteroids), ventilation mode (spontaneous breathing, noninvasive ventilation, or orotracheal intubation), or hospitalization, no significant difference in fibrocyte counts between the different subgroups could be evidenced (data not shown).

Two months after exacerbation, in the stable state (V2), both percentages (Fig 2, E) and absolute numbers (Fig 2, F) of

TABLE I. Patients' characteristics

	Patients with COPD	Control subjects	P value
No.	54	40	
Age (y)	65.6 \pm 7.5	63.4 \pm 7.4	.17
Sex (M/F)	37/17	25/15	.66
Body mass index (kg/m ²)	28.0 \pm 7.3	25.9 \pm 3.8	.11
Current smoker (yes/no)	15/39	2/38	.006
Former smoker (yes/no)	39/15	18/22	.01
Pack years (no.)	46.1 \pm 19.9	7.1 \pm 11.1	<.0001
In the previous year, no. of subjects with:			
0 or 1 unscheduled visit/y	15	NR	
≥ 2 unscheduled visits/y	16	NR	
Unknown number of unscheduled visits	23	NR	
COPD exacerbation			
Hospitalization (yes/no)	35/19	0/40	<.0001
Ventilation mode			
Spontaneous ventilation (yes/no)	24/30	40/0	<.0001
Noninvasive ventilation (yes/no)	22/32	0/40	<.0001
Orotacheal intubation (yes/no)	8/46	0/40	.02
Cause, no. (%)			
Respiratory tract infections	42 (77.8)	NR	
Unknown	12 (22.2)	NR	
Treatment			
Use of antibiotics (yes/no)	44/10	NR	
Use of oral corticoids (yes/no)	41/13	NR	
Stable state			
COPD duration (y)	6.1 \pm 5.1	NR	
Severity of airflow limitation, no. (%)			
GOLD 1 (mild)	4 (7.4)	NR	
GOLD 2 (moderate)	16 (29.6)	NR	
GOLD 3 (severe)	14 (25.9)	NR	
GOLD 4 (very severe)	20 (37.1)	NR	
FEV ₁ (% predicted)	45.1 \pm 22.4	109.9 \pm 15.4	<.0001
FEV ₁ /FVC ratio (%)	46.7 \pm 14.1	78.7 \pm 4.9	<.0001
FVC (percent predicted)	76.6 \pm 23.0	112.1 \pm 17.1	<.0001
TLCO (percent predicted)	50.5 \pm 29.2	99.6 \pm 19.8	<.0001
Pao ₂ (mm Hg)	72.1 \pm 14.6	91.9 \pm 14.7	<.0001

Values are presented as means \pm SDs, where shown. Severity of airflow limitation is assessed by using the GOLD classification.¹ P values were calculated with the use of a 2-sided independent t test for variables with a parametric distribution, the Fisher exact test for comparison of proportions, and the Mann-Whitney U test for comparison of nonparametric variables.

F, Female; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; M, male; NR, not relevant.

fibrocytes were significantly reduced compared with those assessed at V1 ($P < .01$). Moreover, there was a significant increase in the percentage of fibrocytes at V2 in a subgroup of patients with 2 or more unscheduled visits for COPD the year before V1 compared with those with 1 or no unscheduled visits (*post hoc* analysis, see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Relationships between fibrocytes, survival, and both functional and clinical parameters

Survival data were collected in patients with COPD for a median period of 1.4 years and up to 3 years after V1. Kaplan-Meier survival analysis was performed in 2 subgroups of patients based on the percentage of fibrocytes assessed at V1. Patients with more than 28% fibrocytes had a significantly reduced life

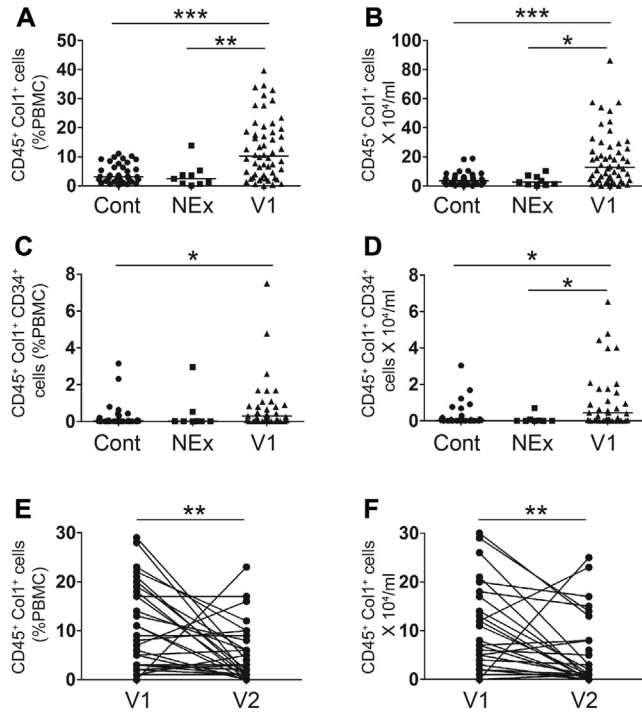


FIG 2. Increased blood fibrocyte counts during COPD exacerbation. **A** and **B**, Circulating fibrocytes (CD45⁺Col1⁺ cells) expressed as a percentage of PBMCs (Fig 2, A) and counts in blood (Fig 2, B) from control subjects (Cont, n = 40), patients with nonexacerbating COPD (NEx, n = 9), and patients with exacerbating COPD (V1, n = 54) are shown. **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001, nonparametric Kruskal-Wallis test. **C** and **D**, CD45⁺CD34⁺Col1⁺ cells expressed as a percentages of PBMCs (Fig 2, C) and counts in blood (Fig 2, D) from control subjects (Cont, n = 29), patients with nonexacerbating COPD (NEx, n = 8), and patients with exacerbating COPD (V1, n = 41). **P* < .05, nonparametric Kruskal-Wallis test. Fig 2, A-D, Medians are represented as horizontal lines. **E** and **F**, Comparison of fibrocytes (CD45⁺Col1⁺ cells) in patients with exacerbating COPD at the time of exacerbation (V1) and 2 months after exacerbation resolution (V2). ***P* < .01, Wilcoxon matched pairs test.

expectancy compared with patients with less than 28% fibrocytes (Fig 3, A). There was no statistical difference between the 2 subgroups in terms of age, sex ratio, FEV₁, and PaO₂ (data not shown). The subgroup of patients with more than 28% fibrocytes consisted of 6 patients with acute exacerbation all requiring hospitalization, whereas the subgroup of patients with less than 28% fibrocytes consisted of 36 patients with acute exacerbation (20 requiring hospitalization and 16 without hospitalization).

We also determined correlation coefficients between the percentage of fibrocytes assessed at the second visit (ie, V2 at 2 months after exacerbation in the stable state) and various functional parameters. The percentage of fibrocytes was negatively and significantly correlated to FEV₁ (percent predicted; Fig 3, B), FVC (percent predicted; Fig 3, C), and PaO₂ (in millimeters of mercury; Fig 3, D). By contrast, there was no significant correlation between the percentage of circulating fibrocytes from exacerbating patients with age, body mass index, and pack years smoked (data not shown).

Fibrocyte expression of chemokine receptors

Expression of chemokine receptors was further evaluated in fibrocytes by using flow cytometry. CXCR4, CCR2, and CCR3

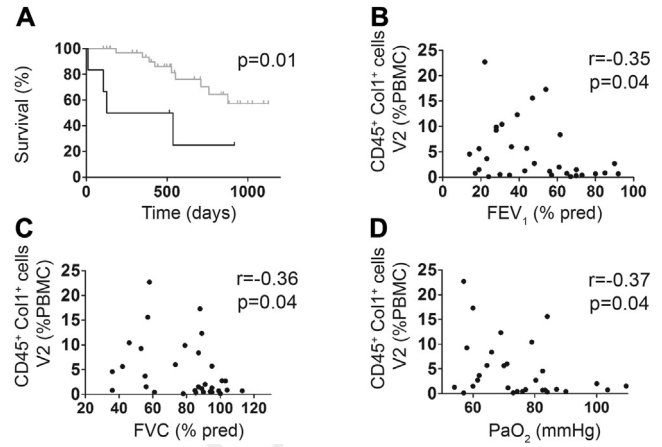


FIG 3. Consequences of increased fibrocyte percentages on survival and lung function in patients with COPD. **A**, Kaplan-Meier survival analysis comparing patients with exacerbating COPD and greater than 28% CD45⁺Col1⁺ cells among PBMCs measured at the time of exacerbation (n = 36; gray curve) with patients with less than 28% CD45⁺Col1⁺ cells among PBMCs (n = 6; black curve). **B-D**, Relationships between FEV₁ (Fig 3, B), FVC (Fig 3, C), PaO₂ (Fig 3, D), and the percentage of CD45⁺Col1⁺ cells in PBMCs in patients with exacerbating COPD at V2. Correlation coefficient (*r*) and significance level (*P* value) were obtained by using nonparametric Spearman analysis.

were expressed by a large proportion of fibrocytes (Fig 4, A, C and E), whereas CCR7 was only found in a small proportion of fibrocytes (Fig 4, G). There were more of both CXCR4⁺ and CCR3⁺ fibrocytes in patients with exacerbating COPD than in control subjects (Fig 4, B and F), whereas CCR2⁺ and CCR7⁺ fibrocyte numbers were similar in both populations (Fig 4, D and H).

Role of the CXCL12/CXCR4 and CCL11/CCR3 axes in fibrocyte migration

Because we found more CXCR4⁺ and CCR3⁺ fibrocytes in the blood of patients with exacerbating COPD, we investigated the role of both CXCR4 and CCR3 in plasma-induced fibrocyte migration in an *in vitro* assay. The CXCR4 antagonist plerixafor significantly reduced plasma-induced recruitment of fibrocytes obtained from patients with exacerbating COPD but not that of fibrocytes obtained from healthy subjects (Fig 5, A). By contrast, plasma-induced migration of fibrocytes from either patients with exacerbating COPD or control subjects was not affected by SB 328437, an antagonist of CCR3 (see Fig E3, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). We also compared the plasma concentration of some ligands of CXCR4 and CCR3. Plasma concentrations of CXCR4 ligands (ie, CXCL12- α [Fig 5, B] and CXCL12- β [see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org]) and a CCR3 ligand (ie, CCL11; see Fig E3, B) did not differ significantly between groups. Therefore we examined the migratory response of fibrocytes to increasing concentrations of CXCL12- α and CCL11. CXCL12- α (Fig 5, C), but not CCL11 (see Fig E3, C), significantly increased fibrocyte migration in a concentration-dependent manner. Interestingly, 100 ng/mL CXCL12- α triggered a significantly higher migration of fibrocytes from patients with exacerbating COPD compared with that seen in fibrocytes from control subjects (Fig 5, C), suggesting that CXCL12- α

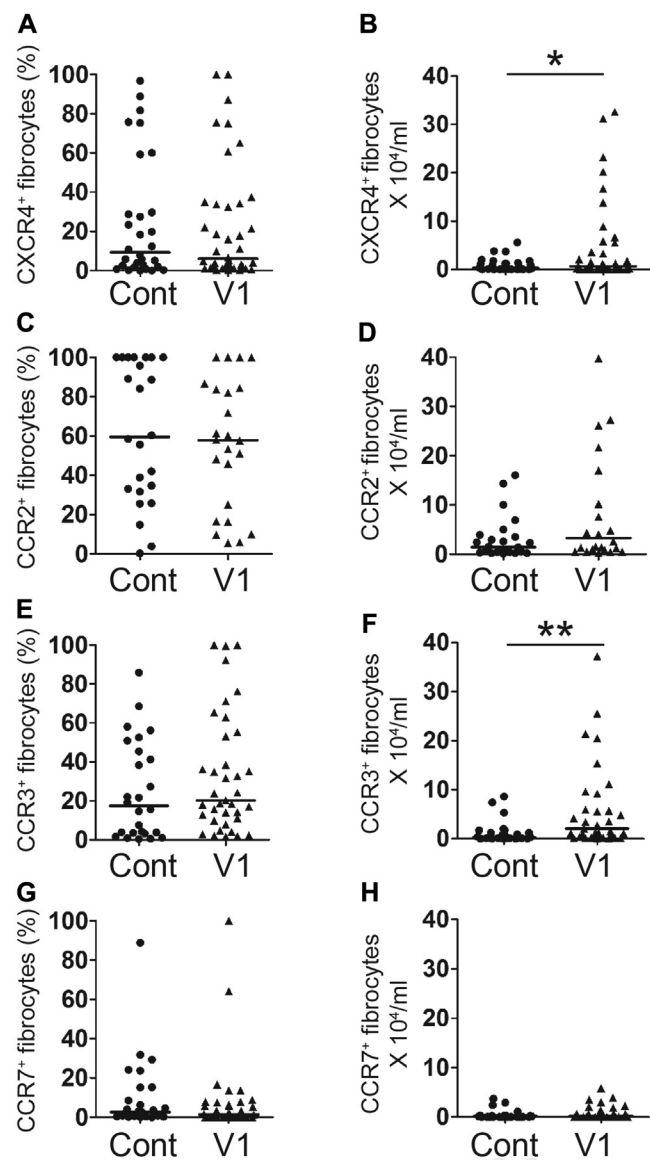


FIG 4. Analysis of fibrocyte marker expression by means of flow cytometry. Expression of CXCR4 (A and B), CCR2 (C and D), CCR3 (E and F), and CCR7 (G and H) in fibrocytes from control subjects (Cont) and patients with exacerbating COPD (V1). Fibrocytes are CD45⁺Col1⁺ cells. Results were expressed as percentages of PBMCs (Fig 4, A, C, E, and G) and counts in blood (Fig 4, B, D, F, and H). **P* < .05 and ***P* < .01, Mann-Whitney tests.

specifically contributes to fibrocyte recruitment during COPD exacerbations. This upregulated response was completely abolished by pretreatment with the CXCR4 antagonist plerixafor (Fig 5, D). Not surprisingly, the CCR3 antagonist SB 328437 had no significant effect on fibrocyte migration from patients with exacerbating COPD induced by CCL11 (see Fig E3, D).

DISCUSSION

For the first time, these results indicate that the percentage of circulating fibrocytes is significantly increased in patients with COPD during an exacerbation and associated with an increased risk of death. The remaining circulating fibrocyte percentage decreases 2 months after exacerbation resolution and is negatively correlated to various functional parameters.

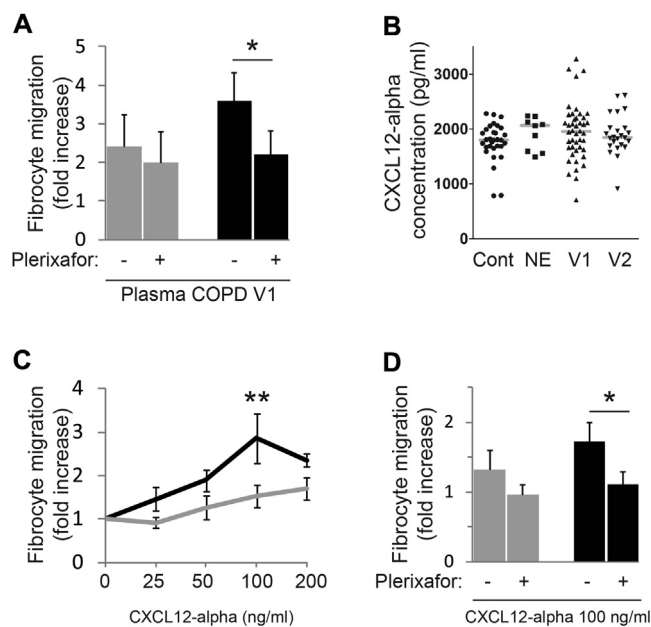


FIG 5. Analysis of fibrocyte chemotaxis. A, Migration of fibrocytes from control subjects (*n* = 8, gray bars) and patients with exacerbating COPD (*n* = 6, black bars) in response to plasma from patients with exacerbating COPD in the presence or absence of 25 μg/mL plerixafor. **P* < .05, paired *t* test. B, Plasma CXCL12-α levels in individual subjects. Cont, Control subjects; NE, patients with nonexacerbating COPD; V1, patients with exacerbating COPD during an AECOPD; V2, patients with exacerbating COPD in the stable state. C, Migration of fibrocytes from control subjects (*n* = 8, gray lines) and patients with exacerbating COPD (*n* = 5, black lines) in response to CXCL12. ***P* < .01, 2-way ANOVA with Bonferroni tests. D, Migration of fibrocytes from control subjects (*n* = 5) and patients with exacerbating COPD (*n* = 7) in response to CXCL12 in the presence or absence of 25 μg/mL plerixafor. **P* < .05, paired *t* test. Results were expressed as means ± SEMs (Fig 5, A, C, and D) or with symbols indicating individual subject values and horizontal gray lines representing medians (Fig 5, B).

We have demonstrated that the migration induced by the CXCL12/CXCR4 axis is upregulated in fibrocytes from patients with exacerbating COPD.

In this study we paid special attention to quantifying fibrocytes by using the most accurate available methodology. Although fibrocytes are described as the unique cell expressing both CD45 and the extracellular matrix collagen-1,¹² these markers can also be present in other cell types (ie, macrophages and monocytes). Our quantification approach takes advantage of the method previously described by Wang et al,¹⁴ quantifying fibrocytes in the NANT cell portion of the blood. We checked that the T-cell fraction and adherent fraction contain mainly CD3⁺ (ie, T cells) and CD14⁺ (ie, monocytes) cells, respectively (data not shown). Therefore removing the T-cell fraction and the adherent fraction allowed us to optimize fibrocyte detection. Moreover, removing the T-cell population also allowed us to avoid any variation in the percentage of fibrocytes caused by modifications of the T-lymphocyte subsets in patients with exacerbating COPD. As described previously by Moeller et al,¹⁵ we used the minimum criteria to identify circulating fibrocytes (ie, coexpression of collagen-1 and CD45). Nevertheless, we also found an increase in CD34⁺ fibrocyte counts in patients with exacerbating COPD compared with counts in control subjects, showing that coexpression of collagen-1 and CD45 was the reliable minimum criteria for fibrocyte identification in our study.

During episodes of acute exacerbation, fibrocyte counts in the blood of patients with COPD are increased and return to a level similar to those in control subjects 2 months later. These findings are reminiscent of data obtained in patients with idiopathic pulmonary fibrosis¹⁵ and asthmatic patients,¹⁷ in whom fibrocyte counts were significantly increased during acute disease exacerbation. Nevertheless, fibrocyte counts are also significantly increased in the blood of patients with stable idiopathic pulmonary fibrosis¹⁵ or patients with stable chronic obstructive asthma^{14,17} compared with those in control subjects. In the present study, by contrast, we found no difference in the percentage of blood fibrocytes in patients with exacerbating COPD in the stable state compared with either patients with nonexacerbating COPD or control subjects. We believe that this latter observation might constitute an interesting specificity to assess COPD pathophysiology and provide a framework to unravel the consequences of acute exacerbations in patients with COPD.

In patients with fibrotic interstitial lung disease, CXCL12 expression is enhanced in plasma and lungs, which is associated with a high CXCR4⁺ fibrocyte pool.¹⁹ In contrast, the CCR7/CCL19 axis plays a critical role for fibrocyte recruitment in the blood of patients with chronic obstructive asthma.¹⁷ However, the chemotactic mechanism for recruitment of circulating fibrocytes might differ for asthmatic patients without airflow obstruction during acute exacerbation. Indeed, there were more CXCR4⁺ fibrocytes in patients with chronic obstructive asthma, and the expression of CXCL12 was also increased in their airways.¹⁷ In the present study we have shown that the CXCR4/CXCL12 axis is also important for fibrocyte chemotaxis during an AECOPD. However, there was no increase in blood CXCL12 levels, and the augmented CXCL12-induced migratory activity of fibrocytes from patients with exacerbating COPD did not seem to be caused by an upregulation of CXCR4 expression. Whether a modification of the signaling pathway downstream of CXCR4 or a differential incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts²⁰ is implicated in this migratory response deserves further study.

By using a large cohort of well-characterized patients with COPD in a stable state, a variety of clinical, functional, or biological parameters have been previously related to mortality, including age; the body mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise index (BODE index); IL-6 concentrations; neutrophil counts; and levels of fibrinogen, C-reactive protein, CCL18, and surfactant protein D.²¹ Here we have observed that a high percentage of circulating fibrocytes during an AECOPD is associated with a lower survival. However, it is noteworthy that this result is a secondary outcome of the present clinical trial. Whether this level is actually independent of the previously identified biomarkers needs to be confirmed in larger cohorts. Interestingly however, the percentage of circulating fibrocytes 2 months after the AECOPD was not related to mortality but rather to a more pronounced bronchial obstruction and a more degraded hematosis.

The present study has some limitations, which deserve further comment. The initial cause of AECOPDs has not been initially explored. From the literature, viral and bacterial infections are responsible for 40% and 21% of AECOPDs, respectively.²² Furthermore, we did not perform bronchoalveolar lavage during AECOPDs. Bronchoalveolar lavage samples from patients with AECOPDs might show increased CXCL12 levels to confirm the notion that this chemokine could be important in fibrocyte

recruitment to the lungs. Moreover, we did not systematically measure airway wall thickness using a computed tomographic scan or pulmonary arterial pressure²³ in the present study because circulating fibrocyte counts have been shown to be increased during pulmonary hypertension only in very young patients and never in patients with COPD.²⁴ One might suggest that a large proportion of the enrolled patients were not tested at V2, which could limit the results from the stable state. However, only 12 from the 54 enrolled patients were lost at follow-up, whereas the remaining 10 patients were either frequent exacerbators, deceased before V2, or had attended V2 but their fibrocyte quantification failed. In addition, we limit the *in vitro* experiments to the analysis of migration, and thus we did not explore other fibrocyte functions, such as production of extracellular matrix components or proinflammatory mediators. Such further results might precisely define the role of fibrocytes in COPD exacerbation.

In conclusion, this study demonstrates that circulating fibrocytes are recruited during COPD exacerbations and are related to mortality and lung function. From the *in vitro* experiments, the CXCL12/CXCR4 axis appears to be involved in such fibrocyte recruitment. Thus targeting CXCR4 to limit the recruitment of fibrocytes could be of potential interest. Nevertheless, further studies are required to assess the efficacy of CXCR4 antagonists *in vivo* on both mortality and lung function decline, which represent the 2 most relevant COPD outcomes.

We thank the study participants, the staffs of intensive care units and respiratory and lung function testing departments from the University Hospital of Bordeaux, and Virginie Niel and Thomas Royo-Lazaro for technical assistance. Q4

Clinical implications: There are higher numbers of circulating fibrocytes in patients with exacerbating COPD. A high fibrocyte count during a COPD exacerbation is associated with an increased risk of death.

REFERENCES

- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). From the global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Available at: <http://www.goldcopd.org>. Accessed October 1, 2010.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442.
- 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;350:2645-53.
- Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007;356:775-89.
- Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhardt D, Kesten S, Menjoge S, et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:1543-54.
- George SN, Garcha DS, Mackay AJ, Patel AR, Singh R, Sapsford RJ, et al. Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2014;44:87-96.
- Gao P, Zhang J, He X, Hao Y, Wang K, Gibson PG. Sputum inflammatory cell-based classification of patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2013;8:e57678.
- Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010;363:1128-38.
- Wedzicha JA, Brill SE, Allinson JP, Donaldson GC. Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med* 2013;11:181.

- 721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
10. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman Sanchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochoa R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005;60:925-31.
 11. Piquet J, Chavaillon JM, David P, Martin F, Blanchon F, Roche N, et al. High-risk patients following hospitalisation for an acute exacerbation of COPD. *Eur Respir J* 2013;42:946-55.
 12. Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011;11:427-35.
 13. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 2003; 171:380-9.
 14. Wang CH, Huang CD, Lin HC, Lee KY, Lin SM, Liu CY, et al. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:583-91.
 15. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:588-94.
 16. Trimble A, Gochuico BR, Markello TC, Fischer R, Gahl WA, Lee JK, et al. Circulating fibrocytes as biomarker of prognosis in Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1395-401.
 17. Wang CH, Punde TH, Huang CD, Chou PC, Huang TT, Wu WH, et al. Fibrocyte trafficking in patients with chronic obstructive asthma and during an acute asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1154-62, e1-5.
 18. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, et al. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:715-22.
 19. Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:104-8.
 20. Wysoczynski M, Reca R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, et al. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005;105:40-8.
 21. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, Miller BE, Bakke P, et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1065-72.
 22. Wark PA, Tooze M, Powell H, Parsons K. Viral and bacterial infection in acute asthma and chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission. *Respirology* 2013;18:996-1002.
 23. Dournes G, Laurent F, Coste F, Dromer C, Blanchard E, Picard F, et al. Computed tomographic measurement of airway remodeling and emphysema in advanced chronic obstructive pulmonary disease. Correlation with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:63-70.
 24. Yeager ME, Nguyen CM, Belchenko DD, Colvin KL, Takatsuki S, Ivy DD, et al. Circulating fibrocytes are increased in children and young adults with pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2012;39:104-11.

781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840

METHODS

Study populations

Subjects aged more than 40 years were eligible for enrollment if they had a clinical diagnosis of COPD exacerbation according to the GOLD guidelines,^{E1} which was defined as change in the patient's baseline dyspnea, cough, and/or sputum that is beyond normal day-to-day variations, is acute in onset, and might warrant a change in regular medication. Patients with COPD with exacerbation have been recruited during hospitalization in the intensive care unit, in the respiratory department, or as outpatients in the clinical investigation center of the University Hospital of Bordeaux. Fifty healthy volunteers without any history of lung disease and with normal lung function testing (ie, FEV₁ and FVC >80% of predicted value and FEV₁/FVC ratio >0.70) were recruited. The main exclusion criteria for patients with COPD and healthy subjects were history of asthma, lung fibrosis, idiopathic pulmonary hypertension, and chronic viral infections (hepatitis and HIV). Both patients with exacerbating COPD and control subjects were enrolled within the Firebrob study. Additionally, patients with COPD without any exacerbations during a preceding minimal period of 12 months were also recruited from the Cohorte Obstruction Bronchique et Asthme (COBRA; Bronchial Obstruction and Asthma Cohort; sponsored by the French National Institute of Health and Medical Research [INSERM]) cohort as control outpatients in the Clinical Investigation Centre of the University Hospital of Bordeaux by using the same exclusion criteria. They are designated as patients with nonexacerbating COPD in the following text.

All subjects provided written informed consent to participate to the study after the nature of the procedure had been fully explained. All clinical data were collected in the Clinical Investigation Center (CIC1401) from the University Hospital of Bordeaux. The study protocol was approved by the local research ethics committee and the French National Agency for Medicines and Health Products Safety.

Design of the Firebrob study

The study was a clinical trial conducted from May 2011 to May 2015. Patients were recruited from (1) the Intensive Care Unit of Pellegrin Hospital, (2) the Intensive Care Unit of Saint André Hospital, (3) the Respiratory Department of Haut-Lévêque Hospital, and (4) the Clinical Investigation Centre of the University Hospital of Bordeaux. The study was sponsored by the University Hospital of Bordeaux (ie, CHU de Bordeaux) and funded by Nycomed and Takeda. All authors were academic and made the decision to submit the manuscript for publication and vouch for the accuracy and integrity of the contents. The study has been registered at ClinicalTrials.gov as no. NCT01196832 (ie, Firebrob study).

The study design is summarized in [Fig 1](#). There were 2 visits for patients with exacerbating COPD: a visit during an exacerbation (inclusion [V1]) and a visit 2 months \pm 7 days after an exacerbation (stable state [V2]). The inclusion visit (V1) consisted of patient information, signature of the informed consent form, and venous blood sample (50 mL) for fibrocyte analysis. The second visit (V2) consisted of a clinical (Control Assessment Test [CAT] and St Georges Quality of Life Questionnaire [SGQLQ]) and functional (plethysmography, TLCO, and arterial gas) evaluation and venous blood samples (50 mL) for fibrocyte analysis. Subjects who experienced a COPD exacerbation (as defined by the study protocol) between V1 and V2 had to be seen 2 months after the last exacerbation for V2. There was only 1 visit for control subjects and patients with nonexacerbating COPD, during which the informed consent form was signed, a clinical (CAT and SGQLQ) and functional (plethysmography, TLCO, and arterial gas) evaluation was performed, and a blood sample was taken for fibrocyte analysis.

The primary outcome was the percentage of blood fibrocytes among PBMCs. Secondary outcomes included characterization of fibrocyte chemokine receptor expression.

Circulating fibrocytes

NANT cells were obtained, as described previously, with some modifications.^{E2} PBMCs were first separated from whole blood by means of

Ficoll-Hypaque (Dutscher) density gradient centrifugation. After the first centrifugation at 150g for 15 minutes, the top plasma layer was harvested and kept at -80°C for further analysis. Mononuclear cells at the interface were harvested and washed once with PBS. Erythrocyte lysis was performed by adding 20 mL of hypotonic 0.2% NaCl solution for 30 seconds, followed by adding 20 mL of 1.6% NaCl to end with an isotonic solution. Mononuclear cells were again washed with PBS; resuspended in Dulbecco modified Eagle medium (Sigma-Aldrich) containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine; supplemented with 20% FBS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), penicillin/streptomycin (Invitrogen), and MEM nonessential amino acid solution (Sigma-Aldrich); and incubated for 1 hour at 37°C . The nonadherent mononuclear cell fraction was taken and washed in cold PBS containing 0.5% BSA (Sigma-Aldrich) and 2 mmol/L EDTA (Invitrogen). T cells were further depleted with anti-CD3 mAb (Miltenyi Biotec, Paris, France). At least 0.2×10^6 NANT cells were distributed in each FACS tube and fixed overnight with Cytotfix/Cytoperm (eBioscience, Paris, France).

Identification and characterization of circulating fibrocytes

Fibrocytes were identified by means of flow cytometry as double positive for the surface marker CD45 and the intracellular marker collagen I (see [Fig E1](#)). Fixed blood NANT cells were washed in permeabilization buffer (eBioscience) and incubated either with mouse anti-human collagen I antibody (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France) or matched IgG₁ isotype control (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), followed by fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse antibodies (Beckman Coulter, Villepinte, France). Next, the cell pellet was incubated with either allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD45 antibodies (BD Biosciences) or matched APC-conjugated IgG₁ isotype control (BD Biosciences). The cell suspension was analyzed with a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Offline analysis was performed with FACSDiva (BD Biosciences) and FlowJo (TreeStar, Ashland, Ore) software. The negative threshold for CD45 was set by using a matched APC-conjugated IgG₁ isotype control, and all subsequent samples were gated for the CD45⁺ region (see [Fig E1](#)). Cells gated for CD45 were analyzed for collagen-1 expression, with negative control thresholds set by using fluorescein isothiocyanate-stained cells. Specific staining for collagen-1 was determined as an increase in positive events over this threshold. Fibrocyte numbers were expressed as both a percentage of total PBMC counts^{E3} and the absolute number of cells.^{E4} Antigen CD34 progenitor cell marker and chemokine receptor expressions were also assessed by means of flow cytometry with specific fluorescent antibodies directed against CD34, CCR3, CCR7, CXCR4 (BD Biosciences), and CCR2 (R&D Systems) and their corresponding irrelevant antibodies. Blood fibrocyte morphology was checked by using phase-contrast microscopy (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Fibrocyte migration

Fibrocyte migration was assessed by using a modified Boyden chamber assay. The transwell inserts (pore size, 8 μm ; Dutscher) and wells were coated for 1 hour at room temperature with polylysine-ethylene glycol (SuSoS, Dübendorf, Switzerland) to prevent cell adhesion. The inserts and wells were rinsed with PBS. In total, 0.3×10^6 NANT cells resuspended in 0.2 mL of Dulbecco modified Eagle medium containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine supplemented with Insulin Transferrin Solution (Dutscher), penicillin/streptomycin, and MEM nonessential amino acid solution were added to the upper compartments of each well. When indicated, NANT cells were pretreated for 1 hour at 37°C with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ plerixafor (Sigma-Aldrich), an antagonist of CXCR4,^{E5} or 3.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SB 328437 (R&D Systems), an antagonist of CCR3,^{E6} before being added to the upper compartment. Recombinant human CXCL12- α (25-200 ng/mL, R&D Systems), recombinant human CCL11 (25-200 ng/mL, R&D Systems), or plasma (50% diluted from blood) from patients with exacerbating COPD or control subjects was added to the bottom compartment of each well. After 12 hours, the content of the bottom compartment was removed to assess fibrocyte

migration by using flow cytometry with double labeling with CD45–collagen I, as described above. Flow cytometric counts for each condition were obtained during a constant predetermined time period to obtain absolute values of migratory cells (1 minute).^{E7} The fraction of migratory fibrocytes was defined as the number of CD45⁺Col1⁺ cells counted in the bottom chamber divided by the number of CD45⁺Col1⁺ cells added in the upper compartment. These values were normalized to the fraction of migratory fibrocytes obtained in the basal condition (medium only).

Measurement of plasma CXCL12 and CCL11 concentrations

Concentrations of plasma CXCL12- α (R&D Systems), CXCL12- β (Sigma-Aldrich), and CCL11 (R&D Systems) were measured by means of ELISA, according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The primary outcome was the percentage of blood fibrocytes among PBMCs. Secondary outcomes were number of deaths, CAT score, SGQLQ score, FEV₁, FVC, FEV₁/FVC ratio, FEF₂₅₋₇₅, PaO₂, and TLCO. Statistical analysis was performed with Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, Calif). Values are presented as means \pm SDs. Statistical significance ($P < .05$) was analyzed by using Fisher exact tests for comparison of proportions, by using 2-sided independent t tests and multivariate ANOVA for variables with a parametric distribution, and by using the Kruskal-Wallis test with multiple comparison z tests, Mann-Whitney U tests, paired Wilcoxon tests, and Spearman correlation coefficients for variables with a nonparametric

distribution. Survival in patients with exacerbating COPD with high versus low blood fibrocyte counts was compared by using Kaplan-Meier analysis.

REFERENCES

- E1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). From the global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Available at: <http://www.goldcopd.org>. Accessed October 1, 2010.
- E2. Wang CH, Huang CD, Lin HC, Lee KY, Lin SM, Liu CY, et al. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:583-91.
- E3. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gaudie J, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:588-94.
- E4. Trimble A, Gochuico BR, Markello TC, Fischer R, Gahl WA, Lee JK, et al. Circulating fibrocytes as biomarker of prognosis in Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1395-401.
- E5. De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:581-7.
- E6. White JR, Lee JM, Dede K, Imburgia CS, Jurewicz AJ, Chan G, et al. Identification of potent, selective non-peptide CC chemokine receptor-3 antagonist that inhibits eotaxin-, eotaxin-2-, and monocyte chemoattractant protein-4-induced eosinophil migration. *J Biol Chem* 2000;275:36626-31.
- E7. Sehmi R, Dorman S, Baatjes A, Watson R, Foley R, Ying S, et al. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34⁺ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology* 2003;109:536-46.

UNCORRECTED

961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020

1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080

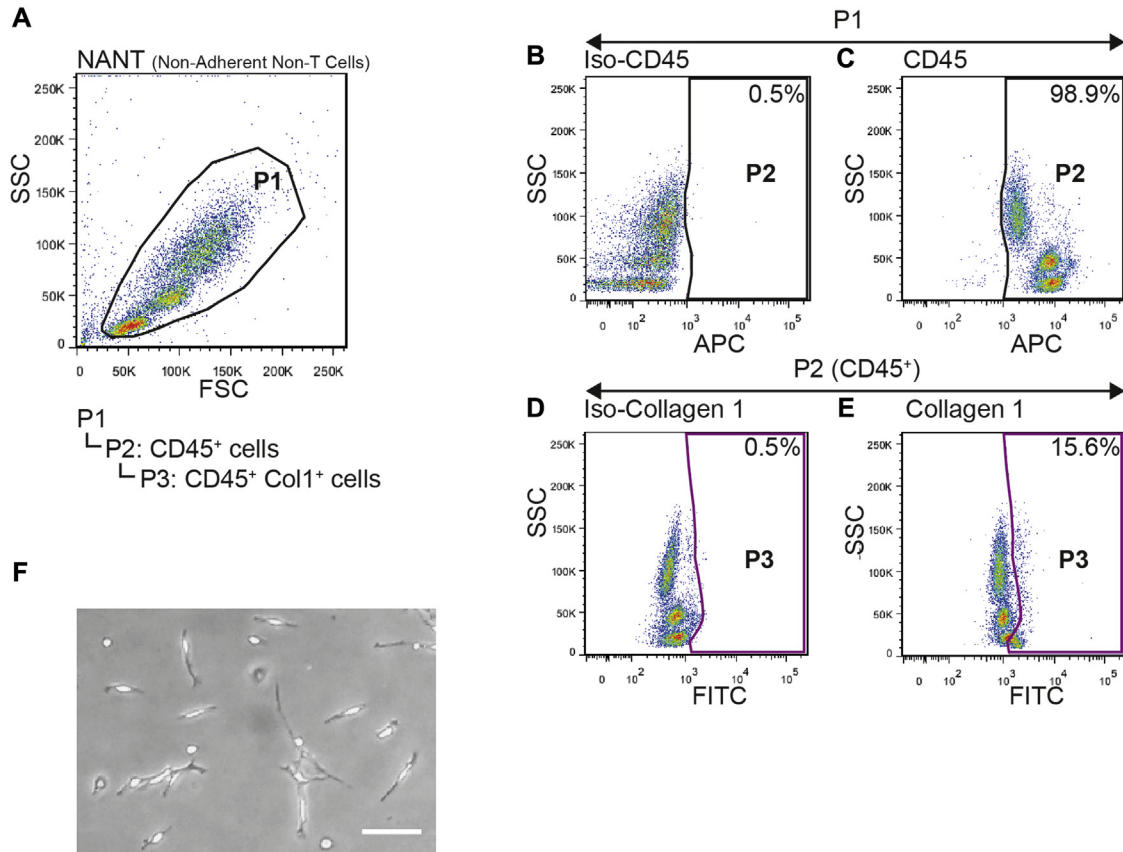


FIG E1. Identification of fibrocytes by using flow cytometry and phase-contrast microscopy. Representative dot plots of flow cytometry for fibrocyte quantification from a patient with COPD exacerbation. **A**, Total NANT cell population selected on unstained cells. **B**, Isotype control for CD45 set on unstained cells. **C**, positive population for CD45. **D**, Isotype control for collagen-1 set on a CD45-gated population. **E**, Positive population for both CD45 and collagen-1. *FITC*, Fluorescein isothiocyanate; *FSC-A*, forward scatter; *SSC-A*, side scatter. **F**, Representative image of cultured blood fibrocytes taken with a phase-contrast microscope, showing their morphology as spindle-shaped adherent cells. *Bar* = 20 μ m.

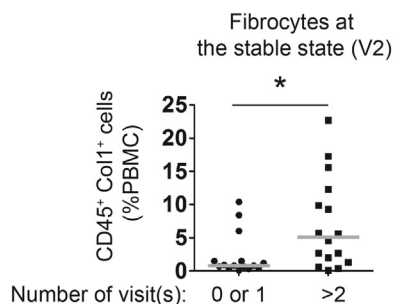


FIG E2. Percentage of CD45⁺Col1⁺ cells among PBMCs of patients with exacerbating COPD at V2 with 1 or no unscheduled visits (n = 15) or with 2 or more unscheduled visits (n = 16) the year before V1. Medians are represented as *gray horizontal lines*. **P* < .05, Mann-Whitney test.

UNCORRECTED PROOF

1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260

1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320

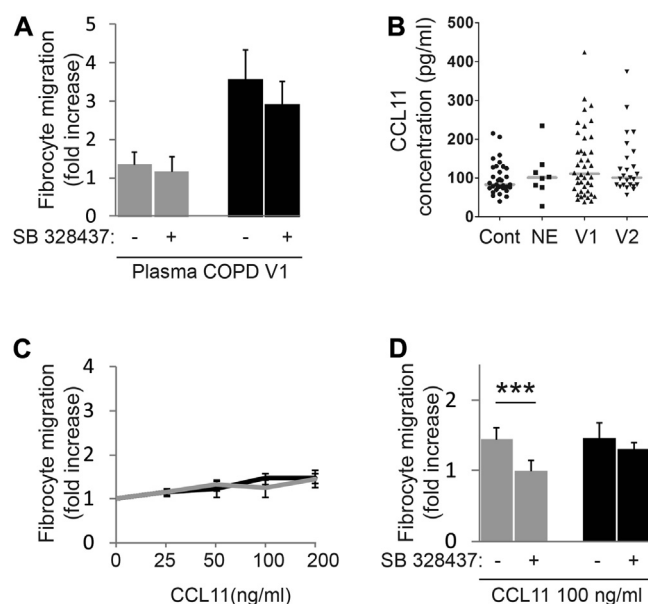


FIG E3. **A**, Migration of fibrocytes from control subjects ($n = 3$, gray bars) and patients with exacerbating COPD ($n = 6$, black bars) in response to plasma of patients with exacerbating COPD in the presence or absence of $3.8 \mu\text{g/mL}$ SB 328437 (paired t test). **B**, Plasma CCL11 levels in individual subjects. Cont, Control subjects; NE, patients with nonexacerbating COPD; V1, patients with exacerbating COPD during an AECOPD; V2, patients with exacerbating COPD in the stable state. **C**, Migration of fibrocytes from control subjects ($n = 4$, gray lines) and patients with exacerbating COPD ($n = 6$, black lines) in response to CCL11. **D**, Migration of fibrocytes from control subjects ($n = 4$) and patients with exacerbating COPD ($n = 5$) in response to CCL11 in the presence or absence of $3.8 \mu\text{g/mL}$ SB 328437. $P < .001$, paired t test. Results are expressed as means \pm SEMs (Fig E3, A, C, and D) or with symbols indicating individual subject values and horizontal gray lines representing medians (Fig E3, B).

UNCORRECTED PROOF

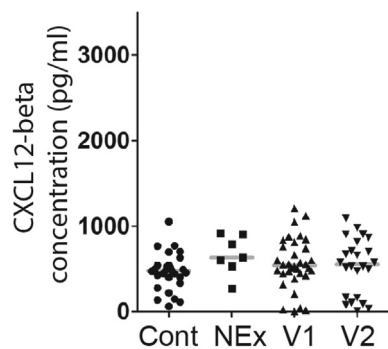


FIG E4. Individual CXCL12- β plasma concentrations. *Cont*, Control subjects; *NEx*, patients with nonexacerbating COPD; *V1*, patients with exacerbating COPD during an AECOPD; *V2*, patients with exacerbating COPD in the stable state. *Symbols* indicate individual subjects, and *horizontal gray lines* represent medians.

UNCORRECTED PROOF

1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500

1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560

1561 **TABLE E1.** Characteristics of patients with nonexacerbating
1562 COPD

	Patients with nonexacerbating COPD
No.	9
Age (y)	61.3 ± 6.4
Sex (M/F)	8/1
Body mass index (kg/m ²)	31.9 ± 8.1
Current smoker (yes/no)	3/6
Former smoker (yes/no)	6/3
Pack years smoked (no.)	39.7 ± 17.1
In the previous year, no. of subjects with:	
0 unscheduled visit/y	9
Hospitalization (yes/no)	0/9
Ventilation mode	
Spontaneous ventilation (yes/no)	9/0
Noninvasive ventilation (yes/no)	0/9
Orotracheal intubation (yes/no)	0/9
Stable state	
COPD duration (y)	6.8 ± 4.8
FEV ₁ (percent predicted)	68.0 ± 16.1
FEV ₁ /FVC ratio (%)	60.4 ± 7.7
FVC (percent predicted)	89.9 ± 16.9
TLCO (percent predicted)	75.4 ± 41.9
PaO ₂ (mm Hg)	76.6 ± 10.5

1585 Values are presented as means ± SDs where shown.

1586 F, Female; M, male.



UNCORRECTED PROOF

Cette étude est la première à décrire le recrutement de fibrocytes sanguins chez des patients en exacerbation de BPCO. Ce recrutement semble suivre une voie de signalisation dépendante de CXCR4 comme cela a été décrit dans l'asthme ou la fibrose pulmonaire idiopathique. Il existe dans l'étude un risque accru de décès corrélé aux taux de fibrocytes sanguins. La voie de signalisation du CXCR4 pourrait être une cible thérapeutique intéressante en supplément des traitements habituels de l'exacerbation de BPCO pour prévenir les conséquences des exacerbations sur le remodelage bronchique voir la mortalité.

III-B Etude des fibrocytes sanguins et pulmonaires dans la BPCO à l'état stable (Fibrochir)

En parallèle de l'étude Firebrob, nous avons mis en place une autre étude, Fibrochir, pour analyser les fibrocytes sanguins mais aussi pulmonaires dans la BPCO à l'état stable. Etant donné qu'il n'a jamais été retrouvé à l'heure actuelle de fibrocyte pulmonaire chez le sujet sain, il nous a semblé intéressant de comparer la distribution des fibrocytes pulmonaires entre un groupe de témoins sains, un groupe témoins fumeurs (pour éventuellement établir un rôle entre tabac et fibrocyte) et un groupe de patients BPCO. De plus, il était important de recruter des patients BPCO de tous stades afin de statuer sur une variabilité de distribution des fibrocytes entre les stades.

Les facteurs confondants comme l'asthme(49), la fibrose pulmonaire idiopathique(5), l'hypertension artérielle pulmonaire(124)(125), la mucoviscidose ont été exclus. De plus, certaines situations cliniques pouvant interagir avec les fibrocytes ont été relevées comme : rhumatisme articulaire chronique(126), brûlures cutanées(25)(127), pneumopathie dans les 12 mois précédents, artériopathie, valvulopathie(128), maladie inflammatoire et allergie. Cette étude implique une proportion très importante de patients atteints de cancer pulmonaire, même si nous nous sommes limités aux stades précoces (tous pN0M0, donc limités aux tumeurs localisées au poumon) pour lesquels le référentiel thérapeutique reste un traitement local isolé (chirurgie si possible sinon radiothérapie)(129).

Les premiers résultats de cette étude dont les inclusions sont terminées depuis avril 2015 mais dont les visites se poursuivent jusqu'en avril 2016 sont présentés ci-après.

III-B-1 Caractéristiques des patients

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et fonctionnelles des patients Fibrochir

	Témoin non fumeur	Témoin fumeur	BPCO	p
n	10	15	14	
Sexe M/F	1/9	5/10	12/2	°0,001
Age	67 +/- 2,2	56,9 +/- 1,8	67,9 +/- 2,3	*0,001^{N-F/F-B}
Taille (cm)	158 +/- 2,2	163 +/- 2,6	167 +/- 1,6	*0,037^{N-B}
Poids (kg)	73,9 +/- 7,2	66,3 +/- 4,9	70,4 +/- 3,2	*0,58
Allergie (%)	40	27	21	°0,60
Nbr de paquet-années	0	27 +/- 3,3	51,1 +/- 4,5	*<0,001
VEMS (%)	106,3 +/- 6,1	96,1 +/- 3,5	64,4 +/- 4,6	*<0,001^{N-B/F-B}
CVF (%)	112,4 +/- 6,1	103,8 +/- 3,2	85,6 +/- 3,9	*<0,001^{N-B/F-B}
VEMS/CVF	0,8 +/- 0,03	0,77 +/- 0,02	0,58 +/- 0,03	*<0,001^{N-B/F-B}
DEMM 25/75 (%)	75,4 +/- 7,9	72,8 +/- 5,6	32 +/- 3,4	*<0,001^{N-B/F-B}
CPT (%)	108,4 +/- 5	105,3 +/- 2,9	108,4 +/- 5,3	*0,84
VR (%)	113,3 +/- 7,8	110,4 +/- 7,7	147,1 +/- 14,2	*0,034^{F-B}
PaO2 (mmHg)	78,1 +/- 4,3	87,7 +/- 3,2	81,2 +/- 2,56	*0,12
PaCO2 (mmHg)	35,8 +/- 0,8	35,8 +/- 0,8	38,5 +/- 0,8	*0,038^{F-B}
pH	7,44 +/- 0,01	7,44 +/- 0,01	7,41 +/- 0,01	*0,054
TLCO (%)	97,4 +/- 7,1	70,8 +/- 3,6	59,1 +/- 5,5	*<0,001^{N-F/N-B}
TDM6M (m)	507 +/- 16	508 +/- 21	472 +/- 18	*0,33
Saint-Georges (%)	15,6 +/- 4,7	14,2 +/- 4,4	17,3 +/- 6,4	*0,90
CATest	9 +/- 1,8	8,5 +/- 2	9,6 +/- 2,2	*0,92
MRC	0,2 +/- 0,13	0,3 +/- 0,12	1,2 +/- 0,32	*0,008^{N-B/F-B}

Résultats en moyenne +/- erreur standard ; p : * par anova, + par kruskal-wallis, ° test exact de Fisher, en indice : bonferroni ou z test (N : non-fumeur, F : fumeur, B : BPCO).

Au total, 39 inclusions sur les 45 prévues initialement ont été enregistrées avec une bonne répartition entre les groupes. Dans le groupe de patient BPCO, on dénombre 3 patients stades 1 de GOLD, 8 stades 2, 1 stade 3 et 2 stade 4. On retrouve beaucoup plus d'hommes dans le groupe BPCO que dans les groupes témoins et la taille des patients est plus grande chez les BPCO que chez les non-fumeurs. Une différence attendue est retrouvée entre d'une part les données spirométriques, le nombre de PA-tabac et d'autre part les groupes. Le questionnaire CAT, initialement réalisé pour les patients BPCO, ne met pas en évidence de différence entre les groupes. Cependant, des questions comme « je dors bien », « je suis plein d'énergie », « je ne suis pas inquiet quand je quitte la maison en dépit de mes problèmes respiratoires » peuvent être biaisées en cas de patient opéré de cancer. Le questionnaire Saint-Georges est initialement réalisé pour les patients BPCO. Les groupes témoins sont moins dyspneiques que le groupe BPCO selon l'échelle MRC.

Les caractéristiques des patients BPCO selon les stades d'obstruction fonctionnelle sont répertoriées ci-dessous.

Tableau 9 : Caractéristiques cliniques et fonctionnelles des patients BPCO de Fibrochir

	BPCO stade 1	BPCO stade 2	BPCO stade 3	BPCO stade 4
n	3	8	1	2
Sexe M/F	2/1	8/0	1/0	1/1
Age	61,7 +/- 2,3	71,9 +/- 2	78	56,8 +/- 6,5
Taille (cm)	165,3 +/- 5,7	167 +/- 2,1	168	169,5 +/- 0,5
Poids (kg)	63,3 +/- 5,2	72,9 +/- 4,9	75	69 +/- 9
Allergie (%)	0	25	0	50
Nbr de paquet-années	46,7 +/- 8,8	52,9 +/- 7,8	50	52,5 +/- 7,5
VEMS (%)	83,7 +/- 0,9	67,5 +/- 1,9	48	31 +/- 1
CVF (%)	107,3 +/- 5,2	80,1 +/- 2,9	69	83,5 +/- 8,5
DEMM 25/75 (%)	39 +/- 2,1	36,2 +/- 3,4	22	9,5 +/- 0,5
CPT (%)	120,3 +/- 7	96 +/- 3,1	104	142,5 +/- 10,5
VR (%)	144,7 +/- 25,4	122,7 +/- 8,7	146	248,5 +/- 41,5
PaO2 (mmHg)	79,1 +/- 2,2	82 +/- 3,2	84	80,3 +/- 16,5
PaCO2 (mmHg)	38 +/- 1,5	37,4 +/- 0,7	42,8	41,6 +/- 3,35
pH	7,42 +/- 0,01	7,42 +/- 0,01	7,39	7,41 +/- 0,01
TLCO (%)	66,3 +/- 12,4	63 +/- 7,4	55	37 +/- 13
TDM6M (m)	488 +/- 34	494 +/- 17	400	397 +/- 82
Saint-Georges (%)	6,9 +/- 3	20,3 +/- 10	1,46	49,3
CATest	8,7 +/- 2	8,6 +/- 3,5	5	22
mMRC	0,7 +/- 0,3	0,7 +/- 0,2	1	3,5 +/- 0,5

Résultats en moyenne +/- erreur standard

Le score de BODE n'est pas indiqué dans ce tableau car seuls les patients BPCO stade 4 présentaient un score de 6 et 7, le patient stade 3 un score de 2 sinon le score était de 0 ou 1 pour tous les autres patients.

III-B-2 Quantification des fibrocytes sanguins

Tableau 10 : Répartition des cellules sanguines chez les patients Fibrochir

	Témoin non fumeur	Témoin fumeur	BPCO	p
n	8	14	12	
PBMC (%)	34,5 +/- 9,8	22,8 +/- 4,1	14,1 +/- 3	*0,054
NANT (%)	12,6 +/- 2,9	10,2 +/- 2,4	4,1 +/- 0,8	*0,031 ^{N-B}
Fibrocyte dans PBMC (%)	9 +/- 2,6	7,2 +/- 2,4	10,5 +/- 2,7	*0,64
Fibrocyte dans NANT (%)	25,2 +/- 8,5	15,3 +/- 3,4	34,6 +/- 8,7	+0,22
Nbr absolu de PBMC (10 ⁶ /ml)	1,12 +/- 0,25	0,99 +/- 0,16	0,62 +/- 0,11	*0,13
Nbr absolu de Fibrocytes (10 ⁴ /ml)	7,8 +/- 2	7,7 +/- 3,1	7,9 +/- 2,8	*0,99

Résultats en moyenne +/- erreur standard ; p : * par anova, + par kruskal-wallis, en indice : bonferroni ou z test (N : non-fumeur, F : fumeur, B : BPCO). PBMC : peripheral blood mononuclear cells, NANT : non-adherent non-T cells.

Il existe une baisse significative des NANT entre les patients non-fumeurs et les patients BPCO. On ne retrouve pas de différence dans les concentrations sanguines de fibrocytes des différents groupes. Il existe une bonne corrélation entre la concentration de fibrocytes dans les NANT et celle dans les PBMC ($r=0,803$; $p<0,001$). L'analyse par le test de Pearson retrouve une corrélation entre la partie 2S6 ($r=0,436$; $p=0,014$) et la partie 2S7 ($r=0,531$; $p=0,002$) du questionnaire Saint-Georges et le pourcentage de fibrocytes dans les NANT ; sans corrélation sur le total, ni en prenant en compte le nombre absolu de fibrocytes.

Tableau 11 : Corrélations de Pearson entre le pourcentage de fibrocytes sanguins dans les NANT et les sous-sections 2S6 et 2S7 du questionnaire Saint-Georges.

Corrélations					
		Fibrocytes dans NANT	P2S6	P2S7	Saint-Georges total
Fibrocytes dans NANT	Corrélations de Pearson	1	,436*	,531**	,313
	Sig. (bilatérale)		,014	,002	,087
	N	34	31	31	31

En analysant le groupe BPCO, il existe une corrélation forte entre le pourcentage de fibrocytes dans les PBMC et les NANT et la partie 1 « symptômes » ($r=0,7$ et $r=0,76$; $p<0,05$ respectivement), la partie 2S1 ($r=0,68$ et $r=0,72$; $p<0,05$ respectivement) et la partie 2S7 ($r=0,77$ et $r=0,76$; $p<0,05$ respectivement) du questionnaire Saint-Georges ; sans corrélation sur le total. Le pourcentage de fibrocytes sanguins dans les NANT est aussi corrélé à l'antécédent « allergie » des patients BPCO ($r=0,744$; $p=0,005$). Le paramètre « allergie » a été renseigné de manière large en prenant en compte tout type d'allergie (pollen, médicament, autre) décrite par le patient sans autres explorations.

Tableau 12 : Corrélations de Pearson entre les pourcentages de fibrocytes sanguins et les sous-sections du questionnaire Saint-Georges.

Corrélations					
		partie1 symptômes	P2S1	P2S7	Saint-Georges total
Fibrocytes dans NANT	Corrélations de Pearson	,763*	,722*	,760*	,639
	Sig. (bilatérale)	,017	,028	,018	,064
	N	9	9	9	9
Fibrocytes dans PBMC	Corrélations de Pearson	,698*	,680*	,766*	,580
	Sig. (bilatérale)	,037	,044	,016	,101
	N	9	9	9	9

Il n'est pas retrouvé de corrélation entre les différents stades GOLD de BPCO et les pourcentages ou le nombre absolu de fibrocytes sanguins. Cependant, ce résultat est à tempérer car les analyses des 2 patients stade 4 n'ont pu être réalisées (prélèvement le week-end ou le vendredi au cours de transplantation pulmonaire, pour une analyse sur 2 jour impossible) et qu'il existe un seul patient stade 3 pour

lequel le taux de fibrocytes sanguins est plutôt bas comparé à la hausse qui semble se dessiner en comparant le stade 1 au stade 2.

Tableau 13 : Répartition des cellules sanguines chez les patients BPCO de Fibrochir

	BPCO stade 1	BPCO stade 2	BPCO stade 3
n	3	8	1
PBMC (%)	8,6 +/- 0,6	17,8 +/- 3,9	0,9
NANT (%)	3,2 +/- 0,5	5 +/- 1	0,2
Fibrocyte dans PBMC (%)	3,5 +/- 2	13,5 +/- 3,5	7,3
Fibrocyte dans NANT (%)	7,9 +/- 3,2	44,9 +/- 11,2	32,8
Nbr absolu de PBMC (10⁶/ml)	0,6 +/- 0,1	0,7 +/- 0,15	0,04
Nbr absolu de Fibrocytes (10⁴/ml)	2,5 +/- 1,7	10,9 +/- 3,7	0,3

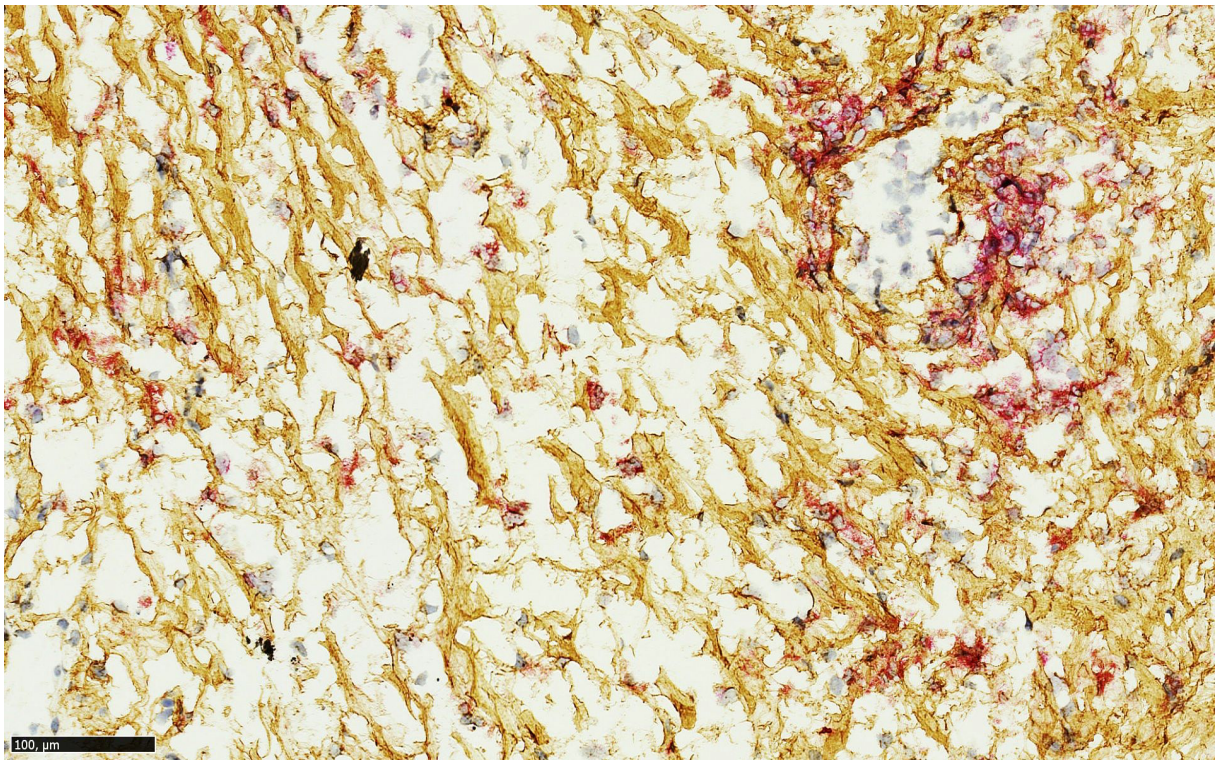
Résultats en moyenne +/- erreur standard

PBMC : peripheral blood mononuclear cells, NANT : non-adherent non-T cells

III-B-3 Quantification des fibrocytes péri-bronchiques

L'analyse en IHC des prélèvements pulmonaires se heurte à un problème de lisibilité des lames avec un marquage collagène (marron) diffus sans pouvoir isoler clairement des cellules doublement marquées CD45+ (rouge) (figure 15). Une première tentative d'IHC avec un anticorps de rat anti-humain pro-collagène I n'a pas fonctionné. La théorie d'un marquage collagène marron en intracellulaire pour une différenciation avec le CD45 rouge membranaire semble, elle aussi, difficile à exploiter. Une alternative est de réaliser un double marquage CD34+/CD45+ en étant tout de même conscient qu'il s'agit d'un double marquage membranaire. Une autre voie de quantification est l'immunofluorescence non testée à ce jour, voire une quantification en FACS après tamisage des prélèvements non testée à ce jour et moins démonstrative.

Figure 15 : IHC de parenchyme pulmonaire doublement marqué CD45 en rouge et collagène en marron.



S'agissant de l'objectif principal de cette étude, c'est bien sur l'axe de recherche à privilégier et éclaircir.

III-B-4 Mesures scannographiques

Tableau 14 : Caractéristiques scannographiques du parenchyme des patients Fibrochir

	Témoin non fumeur	Témoin fumeur	BPCO	p
n	10	14	14	
LAA (%)	4,1 +/- 1,1	4 +/- 1,15	17,3 +/- 3,5	+<0,001 ^{N-B/F-B}
Densité inspiratoire (UH)	-820 +/- 10	-818 +/- 9	-861 +/- 6	*0,001 ^{N-B/F-B}
Densité expiratoire (UH)	-806 +/- 15	-828 +/- 7	-844 +/- 14	*0,11
Ratio E/I densité	0,982 +/- 0,016	0,999 +/- 0,002	0,982 +/- 0,012	*0,52
Différence I-E densité (UH)	14,7 +/- 13,9	0,6 +/- 0,68	15,2 +/- 10,3	*0,52
Volume pulmonaire (cm3)	4365 +/- 204	5044 +/- 282	6180 +/- 192	*<0,001 ^{N-B/F-B}
Volume fonctionnel (cm3)	4175 +/- 176	4816 +/- 234	5015 +/- 171	*0,02 ^{N-B}
Air trapping 950 (%)	17,8 +/- 3,6	12,7 +/- 2,2	34,9 +/- 3,6	*<0,001 ^{N-B/F-B}
Air trapping 1024 (%)	18,4 +/- 3,7	13,2 +/- 2,3	38,2 +/- 4,1	*<0,001 ^{N-B/F-B}

Résultats en moyenne +/- erreur standard, p : * par anova, + par kruskal-wallis, en indice : bonferroni ou z test (N : non-fumeur, F : fumeur, B : BPCO). LAA : Low Attenuation Area, Volume fonctionnel = Volume*(1-LAA%).

Ces différences étaient attendues et sont largement documentées dans la littérature(130)(131). Le volume pulmonaire est difficilement analysable car les caractéristiques sexe et taille sont différentes entre les groupes. Ce travail confirme un emphysème plus marqué chez les BPCO (LAA% augmentée et baisse de la densité pulmonaire inspiratoire) ainsi qu'un trappage de l'air plus important en expiration. Le test de Pearson ne retrouve pas de corrélation entre les paramètres parenchymateux mesurés et les pourcentages ou le nombre absolu de fibrocytes

sanguins dans les PBMC ou les NANT, sur les patients Fibrochir et les patients BPCO.

Tableau 15 : Caractéristiques scannographiques des bronches des patients Fibrochir

	Témoin non fumeur	Témoin fumeur	BPCO	p
n	10	13	10	
WA 4 (mm²)	27,8 +/- 2,6	34,3 +/- 2,8	35,7 +/- 2	*0,1
WA 5 (mm²)	17,2 +/- 1,2	21,6 +/- 1,6	22,6 +/- 1,7	*0,048^{N-B}
LA 4 (mm²)	17,1 +/- 2,4	23,5 +/- 2,8	20,2 +/- 2	*0,21
LA 5 (mm²)	8,5 +/- 0,9	11,8 +/- 1,4	9,6 +/- 0,9	*0,13
LD 4 (mm)	4,6 +/- 0,3	5,33 +/- 0,3	5 +/- 0,2	*0,23
LD 5 (mm)	3,3 +/- 0,2	3,8 +/- 0,2	3,5 +/- 0,2	*0,17
WT 4 (mm)	1,45 +/- 0,1	1,56 +/- 0,1	1,69 +/- 0,1	*0,07
WT 5 (mm)	1,21 +/- 0,1	1,33 +/- 0,1	1,44 +/- 0,1	*0,01^{N-B}
WA4%	3,67 +/- 0,15	3,98 +/- 0,17	4,23 +/- 0,12	*0,06
WA5%	2,99 +/- 0,1	3,3 +/- 0,1	3,5 +/- 0,1	*0,018^{N-B}

Résultats en moyenne +/- erreur standard, p : * par anova, + par kruskal-wallis, en indice : bonferroni ou z test (N : non-fumeur, F : fumeur, B : BPCO). WA : Wall Area, LA : Lumen Area, LD : Lumen diameter, WT : Wall Thickness, WA% : WA normalisée sur le diamètre total ($2 \cdot \sqrt{(WA+LA) / \pi}$).

Comme attendu, il y a une augmentation de l'épaisseur bronchique de la 5^{ème} génération chez le patient BPCO vs témoin non fumeur. Il n'est pas retrouvé de corrélation entre les pourcentages ou le nombre absolu de fibrocytes sanguins dans les PBMC ou NANT et les paramètres de paroi bronchique mesurés, sur les patients Fibrochir et les patients BPCO.

Tableau 16: Caractéristiques scannographiques de la vascularisation pulmonaire des patients Fibrochir

	Témoin non fumeur	Témoin fumeur	BPCO	p
n	10	14	14	
Nbr Vx 1-5mm	18140 +/- 2151	22188 +/- 2589	17497 +/- 1284	*0,21
Nbr Vx >5mm	1116 +/- 99	1314 +/- 99	1087 +/- 39	+0,20
Nbr total de Vx	19257 +/- 2234	23502 +/- 2649	18584 +/- 1307	*0,20
Surface Vx 1-5mm (dm²)	2,19 +/- 0,24	2,71 +/- 0,28	2,12 +/- 0,14	*0,14
Surface Vx >5mm (dm²)	0,75 +/- 0,07	0,90 +/- 0,07	0,74 +/- 0,03	+0,18
Surface vasculaire (dm²)	2,94 +/- 0,30	3,61 +/- 0,34	2,87 +/- 0,16	*0,1
Surface pulm totale (dm²)	492,7 +/- 39,7	602,4 +/- 43,4	678,7 +/- 47,4	*0,028^{N-B}
Rapport Surf Vx1-5/poumon (%)	0,45 +/- 0,03	0,46 +/- 0,05	0,32 +/- 0,02	*0,02^{F-B}
Rapport Surf Vx>5/poumon (%)	0,15 +/- 0,01	0,15 +/- 0,01	0,11 +/- 0,005	*0,001^{N-B/F-B}
Rapport Surf Vx/poumon (%)	0,60 +/- 0,04	0,61 +/- 0,06	0,43 +/- 0,02	*0,008^{N-B/F-B}
CSA%5	0,54 +/- 0,05	0,52 +/- 0,06	0,38 +/- 0,02	*0,026
CSA%>5	0,16 +/- 0,01	0,15 +/- 0,01	0,11 +/- 0,01	*0,006^{N-B/F-B}
CSA%T	0,70 +/- 0,06	0,67 +/- 0,06	0,49 +/- 0,03	*0,015^{N-B/F-B}
CSN%5	0,48 +/- 0,05	0,47 +/- 0,06	0,33 +/- 0,02	*0,047

CSN%>5	0,023 +/- 0,002	0,021 +/- 0,002	0,016 +/- 0,001	*0,006 ^{N-B/F-B}
CSN%T	0,50 +/- 0,05	0,49 +/- 0,06	0,35 +/- 0,02	*0,042

Résultats en moyenne +/- erreur standard, p : * par anova, + par kruskal-wallis, en indice : bonferroni ou z test (N : non-fumeur, F : fumeur, B : BPCO). CSA : Cross sectional Area. CSN : Cross sectional number.

Il n'y a pas de différence en nombre de vaisseaux mesurés toutes tailles, ni en surface vasculaire entre les groupes. La surface pulmonaire est augmentée dans le groupe BPCO vs non-fumeur, cela étant probablement le fait de caractéristiques patients différentes (sexe, taille). Le calcul des CSA et CSN permet une normalisation du nombre et de la surface vasculaire par rapport à la surface pulmonaire. La diminution des CSA et CSN chez le patient BPCO est significative, témoignant d'une raréfaction des vaisseaux en nombre et surface. Il n'est pas retrouvé de corrélation entre les pourcentages ou le nombre absolu de fibrocytes sanguins dans les PBMC ou NANT et les paramètres de vascularisation pulmonaire mesurés, sur tous les patients Fibrochir et les patients BPCO.

III-B-5 Discussion

Selon les résultats de cette étude, il y a relativement peu de corrélation entre les pourcentages ou le nombre absolu de fibrocytes sanguins et les données cliniques ou radiologiques de patient sain, fumeur ou BPCO à l'état stable, hormis avec des valeurs de sous-sections du questionnaire Saint-Georges :

- Pour l'ensemble des patients inclus, la partie 2S6 du questionnaire Saint-Georges correspond aux activités quotidiennes qui pourraient être gênées par la respiration et la partie 2S7 correspond à une description avec quelle intensité l'état respiratoire retentit d'ordinaire sur la vie quotidienne.

- Pour les patients BPCO, la partie 1 « symptômes » et la partie 2S1 et 2S7 du questionnaire Saint-Georges, la partie 2S1 correspondant à ce que les patients pensent de leur état respiratoire ; et l'antécédent « allergie ».

Pour autant, ces corrélations ne sont pas retrouvées sur les sections « impact » ou « activités » ni sur le total du questionnaire Saint-Georges.

L'objectif primaire de l'étude des fibrocytes bronchiques reste dépendant de la réussite d'une analyse correcte en IHC des prélèvements réalisés. De nombreux tests avec des paramètres différents (incubation, dilution, perméabilisation) ont été réalisés avec le marquage pro-collagène, sans succès (diffusion extracellulaire majeure empêchant toute analyse). De nouvelles analyses immunohistochimiques sont en élaboration, notamment avec un double marquage membranaire CD34 et CD45. La technique de cytométrie en flux est bien établie mais non démonstrative sur la localisation des fibrocytes intra-pulmonaires. D'autres techniques comme l'immunofluorescence donnent de bons résultats(6)(132) mais n'ont pour le moment pas été testées dans Fibrochir.

Les analyses scannographiques (compte tenu d'une absence de corrélation avec les fibrocytes sanguins) vont essentiellement servir de base pour un projet d'étude de prédiction du VEMS post-opératoire basé sur le scanner préopératoire.

III-C Etude de l'effet d'inhibiteur calcique sur le remodelage bronchique du patient asthmatique sévère (Remodel'asthme)

Les précédentes études fondamentales réalisées au laboratoire Inserm 1045 sur le remodelage bronchique de patients asthmatiques sévères ont permis de montrer l'implication du calcium au niveau de la cellule musculaire lisse bronchique asthmatique(133) et le bénéfice in vitro de l'application de Gallopamil sur l'inhibition de prolifération des CML(104). C'est dans un but d'évaluation clinique, in vivo, de l'effet d'un médicament inhibiteur calcique (Gallopamil) chez les patients asthmatiques sévère que l'étude Remodel'asthme a été élaborée. Cette évaluation a porté sur l'histologie (épaisseur de muscle lisse bronchique), l'épaisseur scannographique des bronches et la clinique (exacerbation), entre deux groupes traités et analysés en double aveugle (un groupe placebo et un groupe Gallopamil) pendant un an.

Article 4: Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma: a proof-of-concept study

Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma: a proof-of-concept study

Pierre-Olivier Girodet^{1,2,3}, Gael Dournes^{1,2,3}, Matthieu Thumerel^{1,2,3}, Hugues Begueret³, Pierre Dos Santos^{1,2,3}, Annaig Ozier^{1,2,3}, Isabelle Dupin^{1,2}, Thomas Trian^{1,2}, Michel Montaudon^{1,2,3}, François Laurent^{1,2,3}, Roger Marthan^{1,2,3} and Patrick Berger^{1,2,3}

¹Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, Département de Pharmacologie, CIC1401, F-33000 Bordeaux, France

²INSERM, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, CIC1401, F-33000 Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, CIC1401, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Service d'Imagerie Diagnostique et Thérapeutique, Service d'Anatomopathologie, Service de Chirurgie Thoracique, Service de Cardiologie, F-33604 Pessac, France

Correspondence to: Patrick Berger, MD, PhD, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat. 33076 Bordeaux Cedex, France

Phone: +33 557571694

Fax: +33 557571695

Email: patrick.berger@u-bordeaux.fr

Author's contributions: Conception and design: P.O.G., P. B.; Analysis and interpretation: P.O.G., G.D., M.T., H.B., P.D.S., A.O., I.D., T.T., M.M., F.L., R.M. and P.B.; Drafting the manuscript for important intellectual content: P.O.G., R.M., P. B.; Revising the manuscript for important intellectual content: P.O.G., G.D., M.T., H.B., P.D.S., A.O., I.D., T.T., M.M., F.L., R.M. and P.B.; Final approval of the manuscript: P.O.G., G.D., M.T., H.B., P.D.S., A.O., I.D., T.T., M.M., F.L., R.M. and P.B.

Source of support: This study was sponsored by Bordeaux University Hospital (*i.e.* "CHU de Bordeaux"). The funding organization did not include any pharmaceutical company. This study was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC Remodel'asthme, 2008, N° CHUBX 2008/09) and a grant from the French National Institute of Health and Medical Research (Recherche clinique translationnelle INSERM/INCa/DHOS N° A08032GS). The Ministry of Health, the French National Institute of Health and Medical Research and Bordeaux University Hospital had no role in the design and conduct of the study.

Running head: Gallopamil and airway remodeling in severe asthma.

Descriptor number: 1.04

Word count: 3538

At a glance commentary:

Scientific knowledge on the subject:

- Severe asthma is major cause of chronic morbidity, mortality and health care costs.
- Increased bronchial smooth muscle (BSM) mass, a key feature of airway remodeling, is associated with the risk of asthma exacerbations and lung function decrease.
- The Ca²⁺-channel blocker gallopamil decreased the proliferation of BSM cells from severe asthmatics *in vitro*.

What this study adds to the field:

- This translational clinical trial is the first to assess the long-term (12 months) effect of a Ca²⁺-channel blocker on airway remodeling in severe asthmatics.
- Compared to placebo, gallopamil added to conventional anti-inflammatory treatment significantly reduced normalized BSM thickness.
- This potential add-on treatment may provide a new, safe, and beneficial approach to BSM remodeling consequences in severe asthma.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org

Abstract

Rationale: Severe asthma is a major public health issue throughout the world. Increased bronchial smooth muscle (BSM) mass, a characteristic feature of airway remodeling in severe asthma, is associated with resistance to high intensity treatment and poor prognosis. *In vitro*, the Ca²⁺-channel blocker gallopamil decreased the proliferation of BSM cells from severe asthmatics.

Objective: We conducted a double-blind, randomized, placebo-controlled study to evaluate the effect of gallopamil on airway remodeling in patients with severe asthma.

Methods: Subjects received either gallopamil (n=16) or placebo (n=15) for 1 year and were monitored for an additional 3-month period. Airway remodeling was analyzed at baseline and after treatment phase using both fiberoptic bronchoscopy and CT scan. The primary endpoint was the BSM area. Secondary endpoints included normalized BSM thickness and frequency of asthma exacerbations.

Measurements and Main Results: BSM area was reduced in the gallopamil group (baseline vs. end of treatment) but was unchanged in the placebo group. Between-group differences in BSM area were not significantly different in gallopamil vs. placebo groups. By contrast, between-group differences in normalized BSM thickness were significantly different between the 2 groups. The mean number of exacerbations per month was not different during the treatment phase in gallopamil vs. placebo group but was significantly lower in patients previously treated with gallopamil during the follow-up period. There were no differences between the groups with respect to overall side effects.

Conclusion: Gallopamil treatment for 12 months reduces BSM remodeling and prevents the occurrence of asthma exacerbations (ClinicalTrials.gov number, NCT00896428).

Key words: asthma; remodeling; smooth muscle; mitochondria; exacerbation

Abstract word count: 248

Introduction

Severe asthma is a chronic airway disease that generates major consequences on morbidity, quality of life, and economic burden (1, 2). One of its main prognostic factors is the occurrence of bronchial smooth muscle (BSM) remodeling, corresponding to an increased BSM mass (3). BSM remodeling results from a complex process, mainly involving an increased proliferation of BSM cells, which has been demonstrated both *ex vivo* (4) and *in vitro* (5). To date, active pharmaceutical compounds able to decrease BSM size within the whole bronchial tree are still lacking (6). In particular, corticosteroids, which represent the gold standard of asthma therapy, remain unable to decrease the proliferation of asthmatic BSM cells (7).

Using BSM cells obtained from severe asthmatics, we have previously demonstrated that such an increased proliferation is triggered by extracellular calcium (Ca^{2+}) influx, which subsequently activates mitochondrial biogenesis (8). The Ca^{2+} -channel blocker gallopamil, also known as D600 or methoxyverapamil, abolished this Ca^{2+} rise and inhibited transcription factors expression involved in mitochondrial biogenesis, resulting in a reduction in mitochondrial mass and BSM cell proliferation. However, the clinical effect of gallopamil on BSM remodeling has not yet been evaluated in clinical trials of sufficient duration and power. The objectives were to study the efficacy and safety of adding oral gallopamil for 12 months, as compared with placebo, to a treatment regimen of inhaled corticosteroids and Long-Acting Beta Agonists (LABAs) in severe asthmatics, in a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. We evaluated the effect of gallopamil on BSM mass, wall thickness assessed by computed tomography, exacerbation frequency and other endpoints during a 15-month period in patients with severe asthma. Indeed, we hypothesized that gallopamil could decrease BSM size. Since BSM represents a large proportion of the bronchial wall thickness in severe asthmatics, this reduced BSM size could also decrease wall thickness.

Methods

Participants

Subjects aged more than 18 years were eligible for enrolment if they had a clinical diagnosis of asthma including characteristic symptoms (*i.e.* wheezing and breathlessness) (9), as well as bronchial hyperresponsiveness confirmed either by a significant improvement by >15% in the forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) 10 min after the inhalation of 200 µg of salbutamol, or a provocative concentration of methacholine required to lower the FEV₁ by 20% (PC₂₀) of <4 mg/ml according to the American Thoracic Society criteria (10). Main inclusion criterion was a diagnosis of severe asthma according to the American Thoracic Society criteria (11). Main exclusion criteria were current smoking or former smoking with more than 10 pack-years or less than 3 years after quitting and recent asthma exacerbation (less than 6 weeks). Additional criteria for exclusion were those related to contraindications to gallopamil or bronchoscopy. Details of inclusion and exclusion criteria and permitted and excluded concomitant medications are provided in the online data supplement.

All clinical investigations have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All subjects provided written informed consent. The ethics committee (Comité de Protection des Personnes) of South West area (France) approved the research protocol on 24 June 2009.

Study Design and Treatment

The study was a single-center, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group clinical trial conducted from December 2009 through February 2014. Bertin Pharma (Artigues-Près-Bordeaux, France) provides contract pharmaceutical services including gallopamil importation (Abbott, Wiesbaden, Germany), placebo manufacturing and stability testing according to Europe and US FDA Good Manufacturing Practices standards.

The statistician of the Methodology & Data management Centre established the randomization list before the start of the study. Eligible patients were initially enrolled by clinical investigators (*i.e.*, POG, AO and PB) and were randomly assigned in a 1:1 ratio to receive either 100 mg of oral gallopamil hydrochloride twice daily or a matching placebo. The allocation sequence was created using SAS[®] (version 9.0) with a block size of four. A document describing the randomization procedure was kept, confidentially, by the Methodology & Data management Centre. Gallopamil and placebo tablets were identical in color, shape, and taste. All patients and investigators were masked to treatment allocation. To ensure full masking, an independent nurse and a qualified cardiologist were involved in the trial. At each patient visit, investigators were not aware of heart rate, blood pressure and electrocardiogram results.

A 3-month run-in period was designed to optimize treatments of both asthma and comorbidities. There were then fifteen visits: a visit at the start of the trial (inclusion visit 3 months before randomization (M-3)), a visit at randomization (baseline, Month 0 (M0)), twelve visits every month during the 12-month treatment period (M1 to M12), and one additional visit at the end of the 3-month follow up at the 15th month (M15). During the 12-month treatment period, a prevention of exacerbation plan was followed (see Table E1 in the online data supplement). Such an action plan has been shown to decrease bronchial inflammation (12). Indeed, it was our hypothesis that mitochondrial biogenesis could be activated not only by gallopamil-

dependent calcium pathway but also by inflammatory pathways (13). Each randomized patient underwent two fiberoptic bronchoscopies and two CT scans at M0 and M12. Airway remodeling was assessed by two complementary methods: first, on bronchial specimens, the BSM area was automatically assessed on 6 to 8 sections per biopsy and 3 biopsies per subject using optic microscopy, alpha-smooth muscle staining by immunohistochemistry and Quancoul® software, this latter being able to automatically recognize any pre-specified color, as described previously (14, 15), and, second, on CT images, the wall thickness was assessed using a Laplacian of Gaussian algorithm (16) and a 3D analysis software (17).

Outcome Measures

The primary endpoint was the BSM area assessed as the percentage of BSM surface on the whole bronchial sections surface.

Secondary outcomes were bronchial wall thickness, normalized BSM thickness, frequency of asthma exacerbations, Asthma Control Questionnaire (ACQ), Short-acting beta-agonists (SABA) use, Asthma Quality of Life Questionnaire (AQLQ), FEV₁, Fractional exhaled nitric oxide (FeNO), lung hyperinflation (VI950) or air trapping (VE850, difference or ratio between inspiratory and expiratory mean lung density), epithelial area, subepithelial membrane thickness and lamina propria thickness (see Methods in the online data supplement for a complete description). Normalized BSM thickness was calculated and expressed in μm . The BSM thickness was obtained by multiplying the % BSM area, by the bronchial wall thickness measured by CT, both from the 4th generation (see Figure E1 in the online data supplement).

Statistical analysis

We determined that with 16 patients in each group, the study would have a power of 80% to detect an absolute between-group difference of 13.45 ± 12.70 percentage points in the percent decrease in normalized BSM size, taking into account a 10% drop out rate.

According to Bland-Altman analysis (18, 19), the reproducibility and the repeatability of BSM area measurements were evaluated after log transformation of data. Comparisons between groups (*i.e.* placebo vs. gallopamil) were performed by Fisher's exact test or Khi-2 for comparison of proportions, unpaired t tests for comparison of parametric variables and Mann-Whitney U tests for comparison of nonparametric variables. Comparisons within group after and before treatment were performed by means of paired t tests or Wilcoxon Rank tests for parametric or nonparametric variables respectively. Pearson or Spearman correlation matrix was built for parametric or nonparametric variables, respectively. Exacerbation frequency was calculated and compared between the study groups with the use of a negative binomial model and verified with the Mann-Whitney U test. Values are presented as mean \pm SD in the tables and mean \pm SEM in the figures. The statistical analysis was performed with NCSS 2001 software. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00896428.

Results

Enrolment and baseline characteristics

Figure 1 shows the numbers of patients who were screened, enrolled, and randomly assigned to a study group and who completed the study. A total of 31 of the 36 patients who were included started treatment. Fifteen patients were randomly assigned to receive placebo. Only one patient from each group was withdrawn (*i.e.* at the 10th month (M10) in the gallopamil group and after the 12th month (M12) in the placebo group). Subjects in the two groups were well matched with respect to baseline characteristics at M0 (table 1, see also the study protocol Figure E2 in the online data supplement). Moreover, there was no difference between the placebo and gallopamil groups, in terms of intensity of inhaled or oral corticosteroid during the first 3-month run-in period and during the 12-month treatment phase of the study. The trial ended when the last patient performed the last visit.

Efficacy

BSM remodeling

BSM area was assessed at baseline (M0) and after a 12-month treatment period (M12) (see Figure E3 in the online data supplement). The median treatment period was 352 days in the gallopamil group and 345 days in the placebo group ($p=0.36$). Intra-observer and inter-observers reproducibility of BSM area was assessed (see Table E2 in the online data supplement). Between and within-biopsies variability of BSM area were similar in gallopamil *vs.* placebo groups at both M0 and M12 (see Table E3 in the online data supplement).

First, the comparison between the within group differences in BSM area between M12 and M0 were not significantly different in gallopamil ($-3.4\pm 1.3\%$, 95% confidence interval [CI], -6.1

to -0.8) vs. placebo groups (-2.8 ± 1.6 %, 95% CI, -6.1 to 0.5) (Figure 2B, $p=0.75$). However, BSM area assessed at M12 was reduced as compared to that assessed at baseline within gallopamil group only (Figure 2A). This effect of gallopamil was restricted to the BSM layer, since it did not alter the epithelial area, the subepithelial membrane thickness or the lamina propria thickness assessed at M12 as compared to those assessed at baseline (see Figure E4, in the online data supplement).

In order to define a more robust parameter of BSM mass, we assessed the normalized BSM thickness, as a secondary outcome. Such a normalized BSM thickness (presented in μm) was calculated by multiplying normalized BSM area (in %) by the bronchial wall thickness (in mm) measured by CT at the same bronchial generation *i.e.* the 4th generation. The median normalized BSM thickness, significantly decreased from 402 μm at baseline to 330 μm at the end of the treatment period in the gallopamil group ($p=0.01$), whereas that of the placebo group remained unchanged from 351 μm to 363 μm ($p=0.56$) (Figure 2C). Moreover, the within group difference in normalized BSM thickness between M12 and M0, *i.e.* the delta of the placebo (5.5 ± 28.5 μm , 95% CI, -55.5 to 66.6) versus the delta of the gallopamil (-70.4 ± 22.9 μm , 95% CI, -119.5 to -21.3), was significantly different ($p=0.03$; Figure 2D). The mean percentage of variation in the normalized BSM thickness decreased by 13.7% within the gallopamil group, whereas it remained nearly stable *i.e.*, increased by only 2.2% within the placebo group.

We also assessed the number of mitochondria per BSM cell surface (see Figure E5, panel A, in the online data supplement), but neither gallopamil nor placebo altered it (see Figure E5, panel B, in the online data supplement). However, the number of mitochondria was significantly and positively correlated with BSM area and normalized BSM thickness at both M0 and M12 (see Figure E6 in the online data supplement).

Wall thickness

Wall thickness of bronchi from multiple generations (2nd, 3rd and 4th) was assessed at both M0 and M12 using CT and dedicated softwares (see Figure E7 in the online data supplement). The significant decrease in normalized BSM thickness induced by gallopamil was not related to a significant decrease in wall thickness assessed at the 4th bronchial generation (See Table E4 in the online data supplement). By contrast, the mean wall thickness, assessed from the 2nd to the 4th generation, was significantly decreased at M12 as compared to that assessed at baseline in the gallopamil group ($p=0.04$; Figure 3A), whereas that of the placebo group remained unchanged. However, the comparison between the within group differences, *i.e.* the delta of the placebo *versus* the delta of the gallopamil effect on mean wall thickness between M12 and M0, were not significantly different in gallopamil (-0.08 ± 0.04 mm, 95% CI, -0.16 to 0.0004) *vs.* placebo groups (0.01 ± 0.02 mm, 95% CI, -0.04 to 0.05, $p=0.06$; Figure 3B). Similar results were obtained when the mean wall thickness was normalized to bronchial diameter ($p=0.03$; Figure 3C). Again, the comparison between the within group differences were not significantly different in gallopamil ($-1.2\pm 0.5\%$, 95% CI, -2.2 to -0.1) *vs.* placebo groups ($0.1\pm 0.6\%$, 95% CI, -1.1 to 1.3, $p=0.10$; Figure 3D). Furthermore, other CT parameters (see methods in the online data supplement) reflecting lung hyperinflation (VI950) or air trapping (VE850, difference or ratio between inspiratory and expiratory mean lung density) were unchanged (see Figure E8 in the online data supplement).

Frequency of exacerbations

During the treatment period between M0 and M12, which also included the prevention of exacerbation plan based on monitoring of eosinophilic airway inflammation, a total of 51 exacerbations occurred in the group of patients who were assigned to receive gallopamil and 60 in the group assigned to receive placebo (Figure 4A). During this period, the mean number of exacerbations per subject and per month was 0.28 in the gallopamil group, as compared with

0.33 in the placebo group (relative risk, 0.81; 95% CI, 0.47 to 1.42; $p=0.46$) (Figure 4A&B; see Figure E9, panel A, in the online data supplement). Moreover, the number of exacerbations between M0 and M12 was significantly and positively correlated with normalized BSM area assessed at M0 in the placebo group (Spearman correlation coefficient $r=0.55$, $p=0.03$). By contrast, there was no correlation in the gallopamil group (Spearman correlation coefficient $r=0.35$, $p=0.20$).

However, during the follow up period between M12 and M15, which did not include the prevention of exacerbation plan, an additional 5 exacerbations occurred in the gallopamil group, as compared with 20 in the placebo group (Figure 4A). During this second period, the mean number of exacerbations per subject and per month was 0.10 in the gallopamil group, as compared to 0.45 in the placebo group (relative risk, 0.23; 95% CI, 0.081 to 0.68; $p=0.008$) (Figure 4A&B). Moreover, none of the patients in the gallopamil group had more than 1 exacerbation during the follow up period, as compared with 26.7% in the placebo group ($p=0.03$) (Figure 4C). As for the treatment period, the number of exacerbations between M12 and M15 was still significantly correlated with normalized BSM area assessed at M12 in the placebo group (Spearman correlation coefficient $r=0.75$, $p=0.001$) and there was no correlation in the gallopamil group too (Spearman correlation coefficient $r=0.23$, $p=0.41$).

Other outcomes

During the treatment period, gallopamil did not alter any other outcomes such as ACQ, SABA use, AQLQ, FEV₁ and FeNO (see Figure E9, panels B-F, in the online data supplement).

Safety

During the treatment period, the frequency of adverse events was not significantly different between patients assigned to receive gallopamil or placebo (see Table E5 in the online data supplement). In particular, gallopamil did not alter cardiovascular outcomes such as heart rate, blood pressure and PR interval (see Figure E10 in the online data supplement).

Discussion

The present study demonstrates that an orally administered pharmacological compound (*i.e.* gallopamil) significantly decreases the secondary outcome BSM thickness in a placebo-controlled double blind 12 months trial, performed in severe asthmatics. However, while the primary outcome (*i.e.*, BSM area) was significantly decreased in the gallopamil group, there was no difference in the delta of BSM area between placebo and gallopamil groups. This decrease in BSM remodeling resulted in a significant reduction in bronchial wall thickness and was associated with a reduction in subsequent asthma exacerbations during the follow-up.

To date, pharmacological compounds able to target BSM remodeling in asthma are still lacking (6). Bronchial thermoplasty, which is supposed to reduce BSM mass, significantly decreases the exacerbation rate (20). Since we previously demonstrated the anti-proliferative effect of gallopamil *in vitro* using BSM cells obtained from severe asthma patients (8), we thus undertook the present clinical trial in severe asthmatics.

The study was powered to assess BSM size difference from baseline to post-treatment values by means of paired comparisons of BSM size determined invasively using biopsies obtained per bronchoscopy. We paid a special attention to analyze BSM size in 3 different biopsies from each patient and in 6 to 8 sections for each biopsy in order to limit the effect of within patient variability (21). Moreover, we also attempted to evidence the significant reduction of BSM mass, in a non-invasive manner, by assessing a concomitant reduction of bronchial wall thickness measured by CT. To this end, we used customized three-dimensional software enabling bronchial tree skeletonization, orthogonal reconstruction of the main bronchial axis, and measurement of cross-sectional wall thickness, as previously described (17). One may suggest however that, wall area would have been more appropriate than wall thickness. However, wall area is more complex to analyze since it can be influenced by bronchial perimeter and/or wall thickness. Indeed, bronchial perimeter may be altered by bronchodilation

(22). Nevertheless, it is unlikely that gallopamil could have induced BSM relaxation since, neither FEV₁ nor lumen area assessed by CT (data not shown) was altered.

We have used an innovative method to normalize BSM size by assessing BSM thickness, combining BSM area from various bronchial biopsies and sections, all originating from the 4th bronchial generation (*i.e.*, the sum of BSM areas divided by the sum of whole section areas) and normalized this percentage with the bronchial thickness assessed by CT at the same 4th bronchial generation. We thus have measured a homogeneous parameter, which is normalized BSM thickness at the 4th bronchial generation and showed that the mean percentage of variation in the normalized BSM thickness selectively decreased within the gallopamil group. Whereas gallopamil did significantly decrease bronchial wall thickness, it should be kept in mind that bronchial wall thickness in asthma can also be influenced by bronchial inflammation in addition to remodeling (23). In the present study, there was however no difference between gallopamil and placebo groups in bronchial inflammation assessed by FeNO and eosinophilic blood count. In addition, there was a significant and positive correlation between BSM mass and wall thickness thus suggesting that the decrease in wall thickness was mainly due to the decrease in BSM mass. Moreover, we also assessed other components of the bronchial remodeling (*i.e.*, epithelium, subepithelial membrane and lamina propria thickness) and did not find any effect induced by gallopamil, further supporting that its effect was restricted to the BSM layer. However, BSM size in severe asthma depends on complex mechanisms involving increased BSM cell proliferation, BSM cell migration, fibrocytes recruitment, extracellular matrix protein deposition and potentially decreased BSM cell apoptosis (24).

During the 12 months treatment phase, we monitored eosinophilic airway inflammation to prevent asthma exacerbations. Indeed, it was our hypothesis that reversing BSM remodeling required the control of inflammatory pathways, which could induce BSM cell proliferation (15), in addition to the inhibition of the calcium-induced transduction pathway, previously

demonstrated *in vitro* (8). For this purpose, we adapted for severe asthmatics (see Table E1 in the online data supplement) the treatment hierarchy previously developed by Green *et al* (12). As a consequence, the significant reduction in the exacerbation frequency occurred subsequently to the gallopamil treatment phase, not only when the BSM mass has been significantly decreased but also when the prevention of exacerbation plan has been withdrawn. Likewise, in the anti-IL-13 dupilumab clinical trial, the efficacy of dupilumab on the exacerbation frequency appeared only when the corticosteroid treatment was withdrawn (25). By contrast, in the present study, the significant reduction in exacerbation frequency only occurred when gallopamil was withdrawn, which deserves further comments. It should be noted that, the present study was not powered to show a significant reduction in asthma exacerbation frequency and that a minimal number of exacerbations before enrolment was not required as an inclusion criteria. Moreover, it can be speculated that, a treatment phase of 12 months was not enough to decrease exacerbation frequency. In addition, the dose of gallopamil could have been not sufficient to demonstrate a significant effect on exacerbations. In the present study however, gallopamil was unable to significantly alter any clinical parameter.

In terms of safety, gallopamil did not induce noticeable adverse events. For instance, there was no significant reduction in heart rate or blood pressure. Accordingly, no effects on blood pressure or heart rate were reported in healthy volunteers (26, 27).

In conclusion, this pioneer clinical trial provides a proof-of-concept that gallopamil, which is able to block BSM cell proliferation *in vitro* (8), is also able to significantly reduce normalized BSM thickness *in vivo* after 12 months treatment in severe asthmatic patients. Whereas the other secondary outcomes (*i.e.*, ACQ, AQLQ, FEV₁, exacerbations...) were not significantly altered by gallopamil during the treatment phase, there was however a significant decrease in asthma exacerbations during the follow-up. Further studies using larger cohorts of patients are needed to confirm these results and to investigate the preventive and/or the curative effect of

the Ca²⁺-channel blocker gallopamil on asthma exacerbations. However, this proof of concept study validates that, besides the invasive bronchial thermoplasty procedure, a pharmacological strategy can reverse BSM remodeling leading to beneficial clinical outcomes. Moreover, since reduction in bronchial wall thickness has also been non-invasively confirmed using CT, alternative calcium inhibitors or combinations of gallopamil with new anti-inflammatory compounds may now be undertaken to optimize such pharmacological strategy.

Acknowledgments: The authors thank the study participants, Regis Lassalle for statistical support, the staffs of both pathology and surgery departments, Elise Maurat, Virginie Niel and Thomas Royo-Lazaro for technical assistance.

Abbreviations: ACQ, Asthma Control Questionnaire; AQLQ, Asthma Quality of Life Questionnaire; BSM, bronchial smooth muscle; Ca^{2+} , calcium; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; ICS, inhaled corticosteroids; LABAs, long-acting beta agonists; PC₂₀: provocative concentration of methacholine required to lower the FEV₁ by 20%; SABA, short-acting beta-agonists.

References

1. Currie GP, Douglas JG, Heaney LG. Difficult to treat asthma in adults. *BMJ* 2009;338:b494.
2. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *Lancet* 2013;382:1360-1372.
3. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Hamid Q, Martin J. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:45-51 e41-44.
4. Ramos-Barbon D, Fraga-Iriso R, Brienza NS, Montero-Martinez C, Vereza-Hernando H, Olivenstein R, Lemiere C, Ernst P, Hamid QA, Martin JG. T cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:317-324.
5. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burgess JK, Black JL. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:474-477.
6. Girodet PO, Ozier A, Bara I, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther* 2011;130:325-337.
7. Roth M, Johnson PR, Berger P, Bihl MP, Rudiger JJ, King GG, Ge Q, Hostettler K, Burgess JK, Black JL, Tamm M. Dysfunctional interaction of c/ebpalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 2004;351:560-574.
8. Triani T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling

involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;204:3173-3181.

9. Global strategy for asthma management and prevention, global initiative for asthma (gina). 2012; Available from: <http://www.ginasthma.org>.

10. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, Cockcroft DW, Fish JE, Sterk PJ. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309-329.

11. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: Current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-2351.

12. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-1721.

13. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: The role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003;299:896-899.

14. Berger P, Lavalley J, Rouiller R, Laurent F, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 1999;14:1394-1402.

15. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, Thumerel M, Ousova O, Kolbeck R, Coyle AJ, Woods J, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Role of γ -H2AX in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:715-722.

16. Berger P, Perot V, Desbarats P, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Laurent F. Airway wall thickness in cigarette smokers: Quantitative thin-section ct assessment. *Radiology* 2005;235:1055-1064.
17. Montaudon M, Berger P, de Dietrich G, Braquelaire A, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Laurent F. Assessment of airways with three-dimensional quantitative thin-section ct: In vitro and in vivo validation. *Radiology* 2007;242:563-572.
18. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.
19. Bland JM, Altman DG. Measurement error and correlation coefficients. *BMJ* 1996;313:41-42.
20. Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Niven RM, Corris PA, Siersted HC, Olivenstein R, Pavord ID, McCormack D, Chaudhuri R, Miller JD, Laviolette M. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med* 2007;356:1327-1337.
21. Jones RL, Elliot JG, James AL. Estimating airway smooth muscle cell volume and number in airway sections. Sources of variability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:246-252.
22. Dournes G, Berger P, Laurent F. Airway compliance studied by lumen area changes alone cannot discriminate between collapsibility and elasticity. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:107-108.
23. Montaudon M, Lederlin M, Reich S, Begueret H, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Berger P, Laurent F. Bronchial measurements in patients with asthma: Comparison of quantitative thin-section ct findings with those in healthy subjects and correlation with pathologic findings. *Radiology* 2009;253:844-853.
24. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J* 2010;36:1174-1184.

25. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, Wang L, Kirkesseli S, Rocklin R, Bock B, Hamilton J, Ming JE, Radin A, Stahl N, Yancopoulos GD, Graham N, Pirozzi G. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 2013;368:2455-2466.
26. Gross AS, Eichelbaum M, Morike K, Mikus G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of r- and s-gallopamil during multiple dosing. *Br J Clin Pharmacol* 2000;49:132-138.
27. Schweizer MW, Brachmann J, Kirchner U, Walter-Sack I, Dickhaus H, Metze C, Kubler W. Heart rate variability in time and frequency domains: Effects of gallopamil, nifedipine, and metoprolol compared with placebo. *Br Heart J* 1993;70:252-258.

Figure legends

Figure 1. Flowchart of study design.

Numbers of patients, who were screened, enrolled, assigned to a study group and who completed the study.

Figure 2. Effect of gallopamil on BSM remodeling.

The area of bronchial smooth muscle (BSM) layer was assessed using Quancoul® software on bronchial biopsy sections at a magnification of x100. This BSM area was expressed as percentages of BSM area on the whole bronchial section area (Panels A, B). Computed tomography (CT) normalized BSM thickness is BSM area multiplied by bronchial thickness of 4th generation assessed by 3D-CT (Panels C, D). The within group (Panels A, C) and the between groups (Panels B, D) differences are shown. The delta of the placebo and the delta of the gallopamil effect are the differences between post-treatment values (Month 12) and pre-treatment values (Month 0) and are expressed as Mean \pm SEM (Panels B, D). White circles and white bars: placebo (n=15); black circles and black bars: gallopamil (n=15). Medians are represented as horizontal lines (Panels A, C). NS: non statistically significant. *: $p < 0.05$ using paired Wilcoxon test (Panels A, C) and Mann-Whitney test (Panels B, D).

Figure 3. Effect of gallopamil on wall thickness.

Bronchial wall thickness (WT) and normalized wall thickness (WT%) were assessed by using 3D-CT on bronchial cross sections of right lung from the second to the fourth bronchial generation according to the Boyden classification. WT% is the ratio of WT to bronchial diameter. The within group (Panels A, C) and the between groups (Panels B, D) differences are shown. The delta of the placebo and the delta of the gallopamil effect are the differences between post-treatment values (Month 12) and pre-treatment values (Month 0) and are

expressed as Mean \pm SEM (Panels B, D). White circles and white bars: placebo (n=15); black circles and black bars: gallopamil (n=15). Medians are represented as horizontal lines (Panels A, C). NS: non statistically significant. *: $p < 0.05$ using paired Wilcoxon test (Panels A, C) and Mann-Whitney test (Panels B, D).

Figure 4. Effect of gallopamil on asthma exacerbations.

Panel A shows the cumulative number of severe exacerbations that occurred in placebo (dashed line) and gallopamil (solid line) groups. The vertical grey line represents the start of follow-up. Panel B shows the number of exacerbations per month in placebo (white bars, n=15 and n=14) and gallopamil (black bars, n=15 and n=15) groups over investigational product administration (M0-M12) and follow-up (M12-M15) periods, respectively. Values are means \pm SEM. NS: non statistically significant. *: $p < 0.05$ using Mann-Whitney test. Panel C shows the distribution of the number of exacerbations among subjects in placebo (white bars) and gallopamil (black bars) groups during the follow-up period of the study.

Table**Table 1. Patient characteristics**

	Placebo	Gallopamil	P values
n	15	16	
Age (yr)	58.7 ± 11.9	55.1 ± 13.7	0.45
Sex (M/F)	2/13	4/12	0.65
Score on Juniper Asthma Control Questionnaire	2.3 ± 1.5	2.3 ± 1.5	0.98
Age at onset of symptoms (Early/late)	6/9	6/10	1.00
(yr)	17.1 ± 13.3	17.0 ± 14.9	0.74
Asthma duration (yr)	41.6 ± 19.4	38.1 ± 16.9	0.60
High eosinophil status (Y/N)	9/6	11/5	0.72
Blood eosinophil count (×10 ⁹ /liter)	0.22 ± 0.20	0.22 ± 0.23	0.77
FeNO (ppb)	28.8 ± 26.7	22.2 ± 17.6	0.71
Prebronchodilator FEV ₁ (% of pred. value)	69.8 ± 23.1	78.0 ± 23.5	0.34
FEV ₁ :FVC ratio (%)	62.5 ± 11.4	69.4 ± 8.6	0.06
Obesity (Y/N)	4/11	4/12	0.27
Body-mass index (kg/m ²)	27.6 ± 5.0	28.9 ± 7.0	0.92
Smoking status			
Current smoker (Y/N)	0/15	0/16	1.00
Ex-smoker (Y/N)	2/13	4/12	0.65
Pack-years (no.)	0.7 ± 1.9	1.2 ± 2.6	0.47
Frequent exacerbations > 2 /yr (Y/N)	6/9	11/5	0.16
Severe exacerbations per subject in previous year (no.)	2.9 ± 3.0	3.6 ± 2.9	0.28
Treatment			
Dose of ICS - beclomethasone equivalent (µg/day)	3000 ± 1732	2744 ± 1029	0.97
Use of LABAs (Y/N)	15/0	16/0	1.00
Regular use of oral prednisolone (Y/N)	5/10	1/15	0.08
Use of montelukast (Y/N)	7/8	8/8	1.00
Use of omalizumab (Y/N)	6/9	5/11	0.72

Plus-minus values are means ± SD. FeNO denotes the fraction of nitric oxide in exhaled air, FEV₁ forced expiratory volume in 1 second, FVC forced vital capacity, ICS inhaled corticosteroids and LABAs long-acting beta-agonists. P values were calculated with the use of

a two-sided independent t-test for variables with a parametric distribution, Fisher's exact test for comparison of proportions, and the Mann–Whitney U test for comparison of nonparametric variables.

Figures

Figure 1

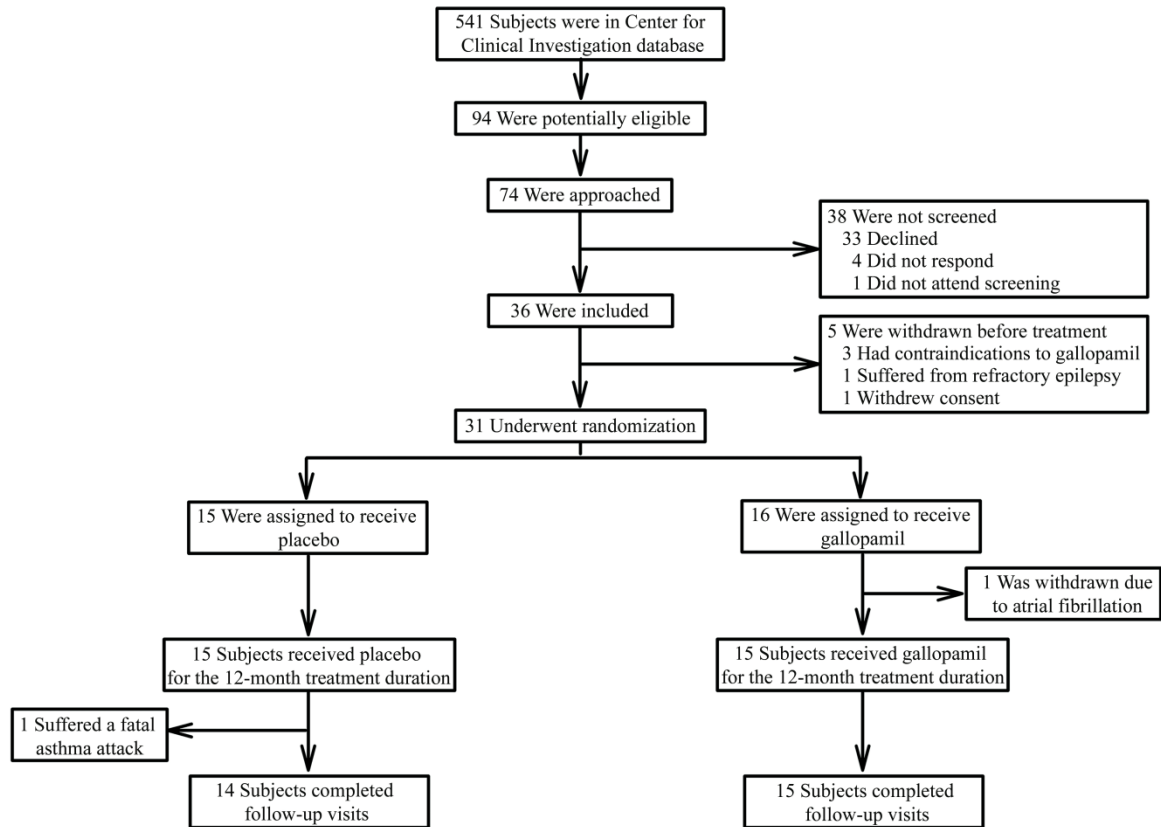


Figure 2

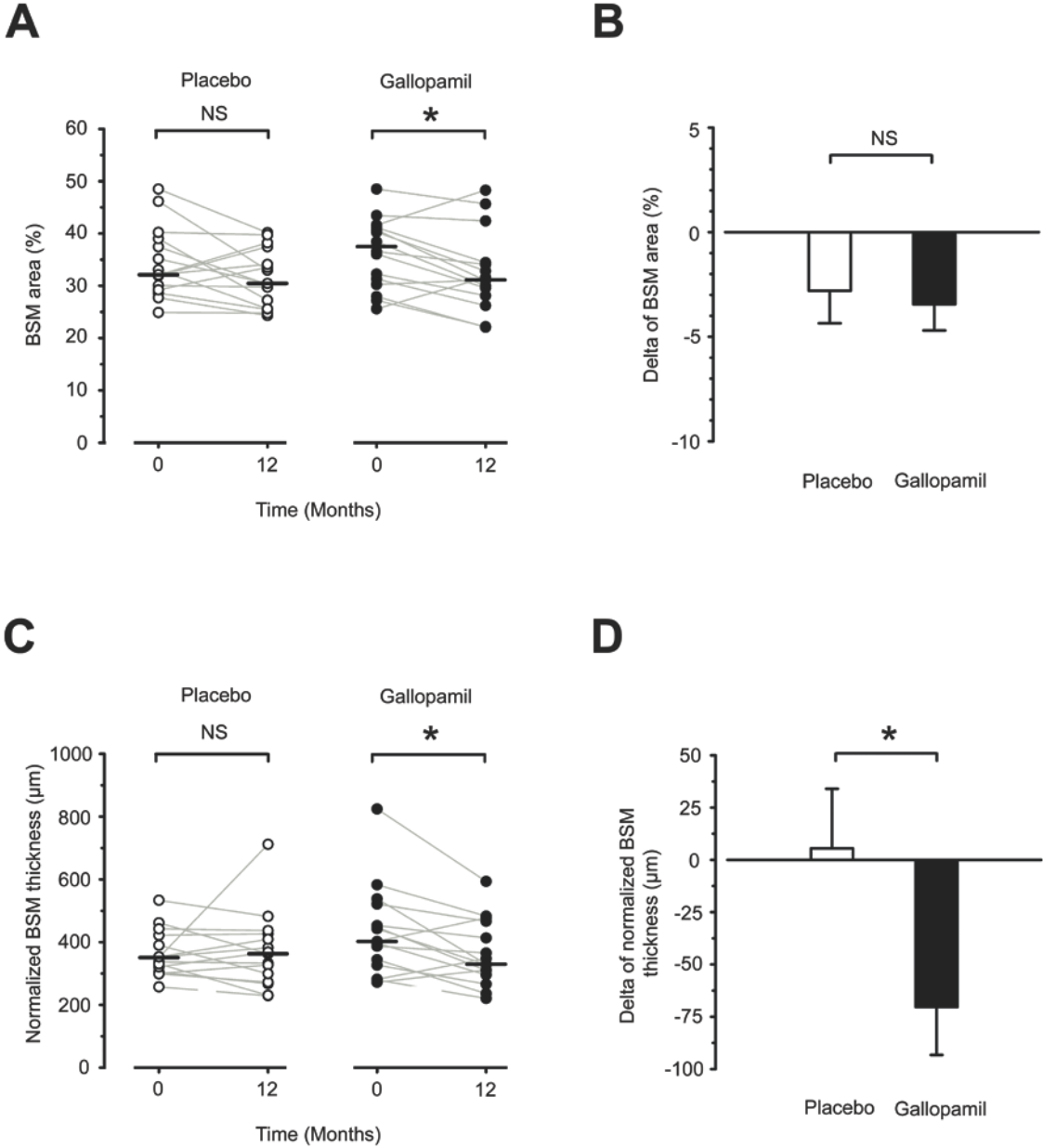


Figure 3

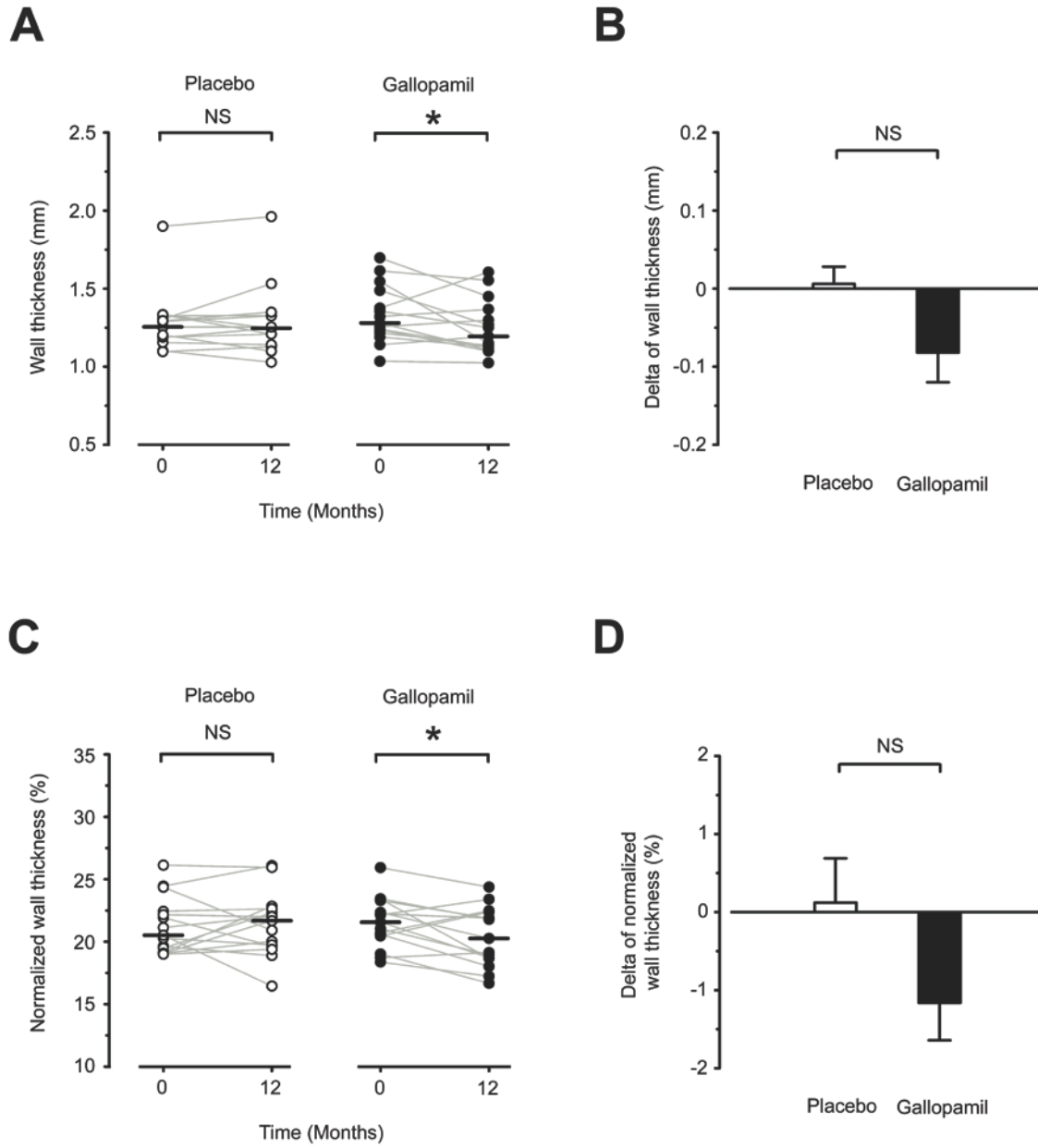
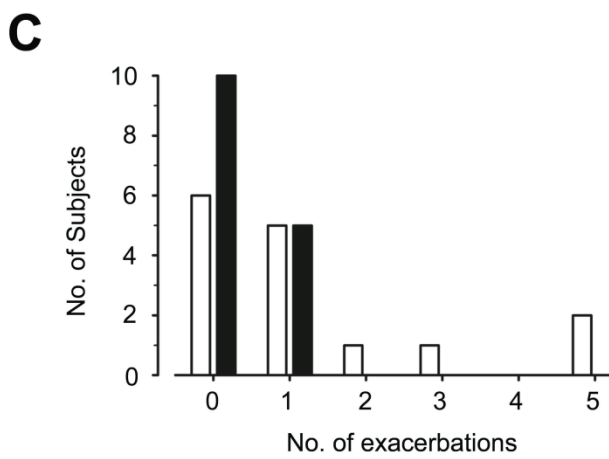
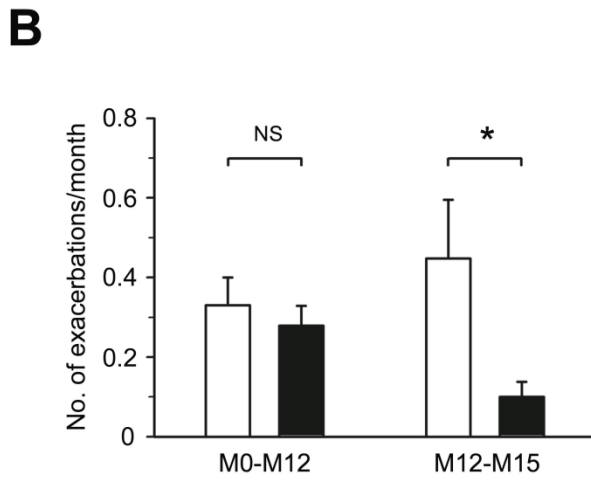
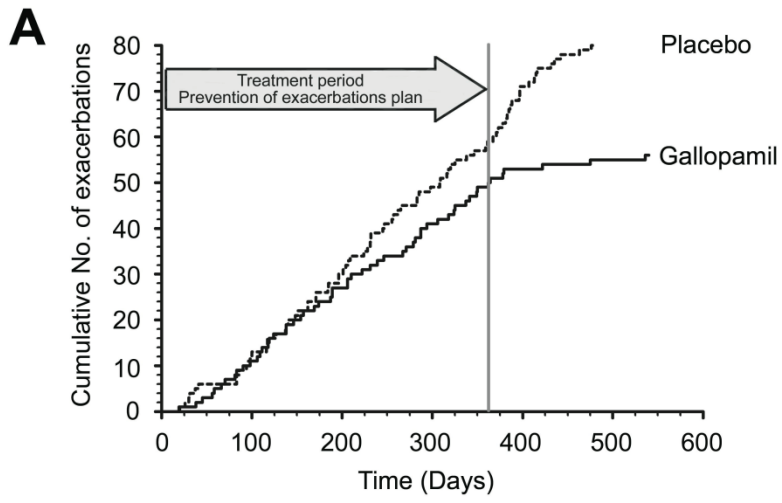


Figure 4



Online Data Supplement

Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma: a proof-of-concept study

Pierre-Olivier Girodet, Gael Dournes, Matthieu Thumerel, Hugues Begueret, Pierre Dos Santos, Annaig Ozier, Isabelle Dupin, Thomas Trian, Michel Montaudon, François Laurent, Roger Marthan and Patrick Berger

Corresponding author: Pr. Patrick Berger, MD, PhD Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat. 33076 Bordeaux Cedex, France

Phone: +33 557571694

Fax: +33 557571695

Email: patrick.berger@u-bordeaux.fr

Methods

Subjects

Subjects aged more than 18 years were eligible for enrolment if they had a clinical diagnosis of asthma including characteristic symptoms (*i.e.*, wheezing and breathlessness) (1), as well as bronchial hyperresponsiveness confirmed either by a significant improvement by >15% in the forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) 10 min after the inhalation of 200 µg of salbutamol, or a provocative concentration of methacholine required to lower the FEV₁ by 20% (PC₂₀) of <4 mg/ml according to the American Thoracic Society criteria (2).

Inclusion criteria were a diagnosis of severe asthma according to the American Thoracic Society criteria (3). At least one major criterion and at least two minor criteria must be fulfilled.

Major criteria:

1. Treatment with continuous or near continuous ($\geq 50\%$ of year) oral corticosteroids.
2. Requirement for treatment with high-dose inhaled corticosteroids (> 1260 µg/d beclomethasone dipropionate or equivalent).

Minor criteria:

1. Requirement for daily treatment with a controller medication in addition to inhaled corticosteroids, *e.g.*, long-acting beta2-agonist, theophylline, or leukotriene antagonist.
2. Asthma symptoms requiring short-acting beta2-agonist use on a daily or near daily basis.
3. Persistent airway obstruction (FEV₁ < 80% predicted; diurnal PEF variability > 20%).
4. One or more urgent care visits for asthma per year.
5. Three or more oral steroid “bursts” per year.
6. Prompt deterioration with $\leq 25\%$ reduction in oral or inhaled corticosteroid dose.
7. Near fatal asthma event in the past.

Exclusion criteria were current smoking or former smoking with more than 10 pack-years or less than 3 years after quitting, recent asthma exacerbation (less than 6 weeks), chronic viral infections (HBV, HCV, HIV), aspergillosis, pregnant or nursing (lactating) women, women of child-bearing potential, prisoners, protected adults, no affiliation to the French Social Security System, patients who have received any investigational drugs within five half-lives prior to enrolment, compensation for clinical trials participation that exceed €3,800 within the previous year.

Additional exclusion criteria were those related to gallopamil treatment (*i.e.*, severe conduction disorders (2nd or 3rd degree atrioventricular block and sick-sinus syndrome, except in patients with a pacemaker), atrial fibrillation/flutter, Wolff-Parkinson-White syndrome, uncontrolled congestive heart failure, cardiogenic shock, acute coronary syndrome, hypotension (systolic blood pressure <90 mmHg), bradycardia (heart rate <50 beats/min), intraventricular conduction delay, hepatopathy, porphyria, excluded concomitant treatment and those related to bronchoscopy (*i.e.*, coagulation disorders, unstable cardiovascular conditions, a fasting state of less than 6 hours).

Permitted concomitant medications were treatment of asthma comorbidities including that of rhinosinusitis (nasal corticosteroids, anti-histaminic), gastroesophageal reflux disease (proton pump inhibitors) and *mycoplasma pneumoniae* infection (antibiotic). Excluded concomitant medications were beta-blocker, digoxin, other calcium channel blockers, other antiarrhythmic drugs, ivabradine, triazolam and dantrolene.

All subjects provided written informed consent to participate to the study, after the nature of the procedure had been fully explained. All clinical data were collected in the clinical investigation center (CIC 1401) from the University hospital of Bordeaux (CHU). The study

protocol was approved by the local research ethics committee and the French National Agency for Medicines and Health Products Safety. The study has been registered under the N° NCT00896428 at ClinicalTrials.gov (*i.e.*, “Remodel’asthme” study).

Design of the study

The study was a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group clinical trial conducted from December 2009 through February 2014. The funding organization did not include any pharmaceutical company. The study was supported by the French Ministry of Health and the French National Institute of Health and Medical Research and sponsored by University Hospital of Bordeaux (*i.e.*, “CHU de Bordeaux”). All authors were academic and made the decision to submit the manuscript for publication and vouch for the accuracy and integrity of the contents. Bertin Pharma (Artigues-Près-Bordeaux, France) provides contract pharmaceutical services including gallopamil importation (Abbott, Wiesbaden, Germany), placebo manufacturing and stability testing according to Europe and US FDA Good Manufacturing Practices standards.

The study protocol is summarized in figure E1. There were fifteen visits: a visit at the start of the trial (inclusion, M-3), a visit at randomization (baseline, M0), twelve visits every month during the 12-month treatment period (M1 to M12), and one additional visit at the end of the 3-month follow up (M15).

We designed a 3-month run-in period, to optimize treatments of both asthma and comorbidities. At the inclusion visit, we initially assessed asthma control questionnaire (ACQ) (4), asthma quality of life questionnaire (AQLQ) (5), the presence of comorbidities, the concomitant treatments, the number of exacerbations in the previous year, spirometry, Fractional exhaled NO (FeNO), induced sputum and blood eosinophils.

At both the randomization visit (M0) and at the end of the treatment period (M12), we performed ACQ, AQLQ, assessment of previous exacerbations number, concomitant treatments and adverse events, spirometry, FeNO, induced sputum, blood eosinophils, computed tomography and fiberoptic bronchoscopy.

At visits M1-M11 and M15, we performed ACQ, AQLQ, assessment of previous exacerbations number, concomitant treatments and adverse events, spirometry, FeNO, induced sputum and blood eosinophils.

In order to prevent asthma exacerbations, the anti-inflammatory treatment was reinforced by 1 step, at each visit from M-3 to M11, if FeNO > 20 ppb and/or if the percentage of induced sputum eosinophils > 3%, according to the optimization process plan (Supplemental table E1), which was adapted for severe asthmatics from that developed by Green *et al* (6). Otherwise, asthma treatment remained unchanged in the absence of exacerbation. From M12 to M15, anti-inflammatory asthma treatment was unchanged in the absence of exacerbation.

Asthma exacerbations were defined as events of worsening asthma requiring oral or parenteral corticosteroids and/or antibiotics for 5 to 10 days. During the study, asthma exacerbations were managed according to GINA recommendations (1).

Computed tomography

CT protocol

CT examinations of the chest were performed with a 16-section multidetector CT scanner (Somatom Sensation 16; Siemens Medical Solution, Forchheim, Germany) without contrast medium administration by using the following parameters: 110-kV tube voltage, 50-mAs tube current and 0.75-mm collimation. Data were acquired in the supine position under spirometric gating at full inspiration (TLC) and full expiration (RV). CT datasets were reconstructed with

both high-spatial-frequency and standard algorithm, with a 1-mm reconstruction section thickness, 1-mm reconstruction interval, 320x320-mm field-of-view, and 512x512 matrix.

CT datasets of images were performed at M0 and M12 and were available in all patients enrolled in the study. The scanner was calibrated regularly with air and a water phantom to allow reliable measurements. CT datasets of images were anonymized and analyzed in random order.

Quantitative CT analysis of proximal bronchi

Datasets of images acquired at full inspiration and reconstructed with high-spatial-frequency algorithm were transferred into a workstation and images were displayed with a parenchymal window width (1800 HU) and level (-600 HU), and analyzed in three dimensions by using dedicated and validated software (7). CT measurements of intrapulmonary airways were performed within the right lung from the second to the fourth bronchial generation including three lobar, ten segmental and twenty sub-segmental bronchi according to the Boyden Classification (8). Automatic quantification of bronchial wall area (WA) and lumen area (LA) were obtained on orthogonal bronchial cross sections by using the Laplacian-of-Gaussian algorithm (9) and 3D reconstruction (10). Briefly, Laplacian filters are second derivative filters used to find areas of rapid change (edges) on images. Since they are very sensitive to noise, it is common to smooth the image (e.g., by using a Gaussian filter) before application of the Laplacian filter, a one-step process called the Laplacian of Gaussian operation (DacLoG). We have previously validated DacLoG in a two-dimensional approach (9). Neko3D is a second dedicated software tool for analyzing bronchi in three-dimensional using a skeletonization of the bronchial tree and reconstruction in two-dimensional thin-section CT images orthogonal to the main bronchial axis of bronchi in order to measure WA and LA using DacLoG. Neko3D software enables analysis of the bronchial tree according to bronchial generation.

Reproducibility of bronchial tree skeletonization has been previously evaluated in vivo. The accuracy of measurements has been previously assessed in vitro with a phantom made with silicone tubes and an excised human lung (10). Reproducibility and reliability of WA and LA has also been determined previously (10). Bronchial wall thickness (WT), bronchial diameter (D) and normalized bronchial wall thickness (WT%) were calculated as follows:

$$WT = \{\sqrt{[(WA+LA)/\pi]} - \sqrt{(LA/\pi)}\} \text{ (expressed in mm)}$$

$$D = \{\sqrt{[(WA+LA)/\pi]}\} \times 2 \text{ (expressed in mm)}$$

$$WT\% = WT/D \text{ (expressed in \%)}$$

For each bronchus, measurements were performed at three different locations into the middle third of bronchi length and averaged. WT and WT% global values per patient were calculated after averaging the whole right lung bronchi analyzed in order to give a single mean value.

Quantitative CT analysis of lung parenchyma

Automatic quantification of lung parenchyma indices of lung hyperinflation and air trapping was performed on CT images reconstructed with standard algorithm by using whole-lung densitometry at full inspiration (TLC) and full expiration (RV) with Myrian[®] software. A threshold-based technique was used to isolate lungs from the rest of thoracic structures using CT attenuation values of -500 and -1024 HU. Densitometric indices were derived from the voxel frequency distribution histogram as follows:

1. Voxel index at a threshold of -950 HU at TLC (VI950) represents the proportion of voxels of low density and expressed as a percentage of less than a threshold of -950 HU. It indicates areas of lung hyperinflation (11).
2. Voxel index at a threshold of -850 HU at RV (VE850) represent the proportion of voxels of low density expressed as a percentage of less than a threshold of -850 HU. VE850 must represent areas of air trapping (12).

3. E/I MLD and I-E MLD are indicators of air trapping calculated respectively as the ratio and the difference of mean lung density (MLD) measured at TLC (I) and RV (E) (13, 14).

Fiberoptic bronchoscopy

Bronchial specimens from all subjects were obtained by fiberoptic bronchoscopy. The subjects received 400 µg of salbutamol with the aid of an aerosol chamber to open up the airways before the procedure. Anesthesia of the upper airways was achieved with lidocaine 5% spray. The total amount of lidocaine per subject was limited to 225 mg. For 15/31 patients (6/15 and 9/16 in the placebo and gallopamil groups respectively), an additional general anesthesia was necessary using propofol (average dose of 1.5 to 2 mg/kg). The fiberoptic bronchoscope (Pentax BF 15V, Argenteuil, France) was introduced and biopsies were taken from 6 bronchial carinae from the middle lobe and from the lower right lobe. Specimens were immediately transferred to the laboratory in sterile container containing Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Optic microscopy and immunohistochemistry

Bronchial specimens were fixed in 10% buffered formalin and processed in standard fashion for paraffin embedding as described previously (15). Sections, 3-µm thick, were cut and stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) or processed for immunohistochemistry. After deparaffinization and rehydration through graded alcohols, endogenous peroxidase was inhibited using a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide (both from Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) for 30 min, followed by 2 rinses in phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen). Non specific staining was blocked using 10% bovine serum albumin (BSA, Dako, Trappes, France) for 30 min. Sections were incubated for 2 h at room temperature with mouse anti-human smooth muscle actin (clone 1A4) or the unrelated mouse

antibody (both from Sigma-Aldrich). After rinsing in PBS, biotinylated rabbit anti-mouse F(ab')₂ (Dako) was applied to the sections for 2 h, and followed by the streptavidin-biotin horseradish-peroxidase complex (Dako) for a further 2 h period. After rinsing in PBS, 1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako) plus 0.02% hydrogen peroxide for 6 min were used as substrate to develop a peroxide-dependent brown color reaction at room temperature. Finally, the sections were rinsed and counterstained with Mayer's hematoxylin.

The total area of BSM layer was assessed, automatically in a blinded fashion using Quancoul[®] software (Quant'Image, Bordeaux, France) at a magnification of x 100, as described previously (13, 15-18). Briefly, each section was blinded and the area of BSM was automatically assessed using pre-specified ranges for the 3 parameters (i.e., optic density, hue and hue density (16) determined previously (18)). Sometimes however, smooth muscle actin staining from blood vessels must be discarded manually. For each patient, 3 biopsies were collected and the BSM was analyzed in 6 to 8 sections in each biopsy. The primary outcome, which was the total BSM area, assessed in the multiple sections and biopsies, was normalized by the corresponding whole tissue area and presented as percentages of whole area. The normalized BSM thickness (secondary outcome) was calculated and expressed in μm . Such a BSM thickness was obtained by multiplying the % BSM area, by the bronchial wall thickness measured by CT, both from the 4th generation.

In addition, we also assessed other components of airway remodeling using Quancoul[®] software at a magnification of x 100 (epithelial area, lamina propria thickness) and x 400 (subepithelial membrane thickness). As for BSM area, the epithelial area, assessed in the multiple sections and biopsies, was normalized by the corresponding whole tissue area and presented as percentages of whole area. For subepithelial membrane thickness and lamina propria thickness, a minimum of 20 measurements were performed and averaged on each section (19).

Electron microscopy

Specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Epon as described previously (20). For each specimen, semi-thin sections (1 μm -thick) were cut and stained with alkaline toluidine blue. We selected the first semi-thin section large enough to span from the epithelium to the muscular layer. Five ultrathin serial sections (60 nm-thick) were then cut on diamond knives. Four of these latter sections were subsequently randomly selected and placed on grids. Staining was performed with uracile acetate and lead citrate. Grids were then scanned by transmission electron microscopy (EM, Tecnai 12, Philips) and examined by a pathologist from left to right and from top to bottom to locate every whole nucleated BSM. Each ultrathin section was examined in its entirety. To evaluate the number of mitochondria, computerized photographs and measurements were performed in a blinded fashion by using Scanview software (Soft Imaging System) at a standard magnification of $\times 4200$. Mitochondrial densities were performed using ImageJ 1.42q free software.

Statistical analysis

We determined that with 16 patients in each group, the study would have a power of 80% to detect an absolute between-group difference of 13.45 ± 12.70 percentage points in the percent decrease in normalized BSM size, taking into account a 10% drop out rate.

According to Bland-Altman analysis (21, 22), the reproducibility of BSM area was evaluated by two authors (P.O.G. and T.T.) after log transformation of data by using (a) the Pearson correlation coefficient, (b) the lack of agreement (*i.e.*, bias estimated with the mean difference and the standard deviation of the difference), and (c) the intraclass correlation coefficient. The repeatability of BSM area was also analyzed by the same two authors as follows: (a) The

measurement error was evaluated with the Spearman rank correlation coefficient between the individual subject standard deviations and their means, (b) The mean within-subject standard deviation also was evaluated.

Comparisons between groups (*i.e.* placebo *vs.* gallopamil) were performed by Fisher's exact test or Khi-2 for comparison of proportions, unpaired t tests for comparison of parametric variables and Mann-Whitney U tests for comparison of nonparametric variables. Comparisons within group before and after treatment were performed by means of paired t tests or Wilcoxon Rank tests for parametric or nonparametric variables respectively. Pearson or Spearman correlation matrix was built for parametric or nonparametric variables, respectively. Exacerbation frequency was calculated and compared between the study groups with the use of a negative binomial model and verified with the Mann-Whitney U test. Values are presented as mean \pm SD in the tables and mean \pm SEM in the figures. The statistical analysis was performed with NCSS 2001 software. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00896428.

References

1. Global strategy for asthma management and prevention, global initiative for asthma (gina). 2012; Available from: <http://www.ginasthma.org>.
2. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, Cockcroft DW, Fish JE, Sterk PJ. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS board of directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309-329.
3. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: Current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-2351.
4. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 1999;14:902-907.
5. Juniper EF, Guyatt GH, Cox FM, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of the mini asthma quality of life questionnaire. *Eur Respir J* 1999;14:32-38.
6. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-1721.
7. Montaudon M, Lederlin M, Reich S, Begueret H, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Berger P, Laurent F. Bronchial measurements in patients with asthma: Comparison of quantitative thin-section CT findings with those in healthy subjects and correlation with pathologic findings. *Radiology* 2009;253:844-853.
8. Boyden E. Segmental anatomy of the lungs. A study of the patterns of the segmental bronchi and related pulmonary vessels. *New York, NY McGraw-Hill* 1956.

9. Berger P, Perot V, Desbarats P, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Laurent F. Airway wall thickness in cigarette smokers: Quantitative thin-section ct assessment. *Radiology* 2005;235:1055-1064.
10. Montaudon M, Berger P, de Dietrich G, Braquelaire A, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Laurent F. Assessment of airways with three-dimensional quantitative thin-section ct: In vitro and in vivo validation. *Radiology* 2007;242:563-572.
11. Matsuoka S, Yamashiro T, Washko GR, Kurihara Y, Nakajima Y, Hatabu H. Quantitative ct assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Radiographics* 2010;30:55-66.
12. Busacker A, Newell JD, Jr., Keefe T, Hoffman EA, Granroth JC, Castro M, Fain S, Wenzel S. A multivariate analysis of risk factors for the air-trapping asthmatic phenotype as measured by quantitative ct analysis. *Chest* 2009;135:48-56.
13. Berger P, Girodet PO, Begueret H, Ousova O, Perng DW, Marthan R, Walls AF, Tunon de Lara JM. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J* 2003;17:2139-2141.
14. Bommart S, Marin G, Bourdin A, Molinari N, Klein F, Hayot M, Vachier I, Chanez P, Mercier J, Vernhet-Kovacsik H. Relationship between ct air trapping criteria and lung function in small airway impairment quantification. *BMC Pulm Med* 2014;14:29.
15. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;204:3173-3181.
16. Berger P, Lavalley J, Rouiller R, Laurent F, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 1999;14:1394-1402.

17. El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006;176:1860-1868.
18. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, Thumerel M, Ousova O, Kolbeck R, Coyle AJ, Woods J, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Role of ykl-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:715-722.
19. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1360-1368.
20. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 2007;62:8-15.
21. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.
22. Bland JM, Altman DG. Measurement error and correlation coefficients. *BMJ* 1996;313:41-42.

Supplemental figures legends

Figure E1. Schematic representation of normalized bronchial smooth muscle thickness calculation.

Representative images of a bronchial biopsy section (4th generation) stained with an anti-human smooth muscle actin antibody at a magnification of x40 (A, B). Bronchial smooth muscle (BSM) appears in yellow following automatic color recognition by Quancoul software (B). BSM area was expressed in % of the whole biopsy area. IHC: immunohistochemistry. Bars represent 50 μ m. Wall thickness (WT) was assessed in mm from CT scan images (C, D). C is a representative image obtained from a 4th generation bronchus after an orthogonal reconstruction to the main bronchial axis using Neko3D software. Bronchial wall area was automatically recognized using DacLoG software (D). Virtual representation of the bronchial wall (E). The normalized BSM thickness was obtained by multiplying the % BSM area by the bronchial WT, both from the 4th generation.

Figure E2. Schematic representation of the study design.

Treatments of asthma and comorbidities were optimized during a 3-month run-in period. This period was followed by a double-blind, randomized, placebo-controlled treatment period (day 1 to month 12). Computed tomography and fiberoptic bronchoscopy were performed before and after treatment period. At monthly study visits, assessments included asthma control questionnaire, asthma quality of life questionnaire, number of exacerbations, concomitant treatments and adverse events, spirometry, FeNO, induced sputum and blood eosinophils. Efficacy and safety continued to be monitored during the follow-up period (month 12 to month 15).

Figure E3. Effect of gallopamil on bronchial smooth muscle area.

Representative optic microscopic images from bronchial sections stained with HES were obtained from severe asthmatics in placebo (A, B) and gallopamil (C, D) groups at baseline (A, C) and at the end of 12-months treatment period (B, D). Smooth muscles were visualized (SM). Magnification: 400x. Bars: 10 μ m.

Figure E4. Effect of gallopamil on other components of bronchial remodeling.

The epithelial layer area (Panel A), the subepithelial membrane thickness (Panel B) and the lamina propria thickness (Panel C) were assessed using Quancoul[®] software on bronchial biopsy sections at a magnification of x100. The areas were expressed as percentages on the whole bronchial section area, the thicknesses were expressed in μ m. White circles: placebo (n=15); black circles: gallopamil (n=15). Medians are represented as horizontal lines. NS: not statistically significant using paired Wilcoxon tests.

Figure E5. Effect of gallopamil on the number of smooth muscle mitochondria.

Representative electronic microscopic images from bronchial sections were obtained from a severe asthmatic before (left) and after (right) 12 months treatment with gallopamil and observed at x4200 magnification (panel A). Some smooth muscle mitochondria were visualized (arrows). Bars: 1 μ m. The number of mitochondrial sections normalized on BSM cells surface was assessed from electronic microscopic images using ImageJ software (panel B). White circles: patients from placebo group (n=14). Black circles: patients from gallopamil group (n=13). Medians are represented as horizontal lines. NS: non statistically significant.

Figure E6. Correlation between BSM area and number of mitochondria in BSM cells from patients with severe asthma.

BSM area, CT normalized BSM thickness and numbers of mitochondria in BSM cells were assessed before starting treatment (visit M0, panels A and C, n=15 for both groups) and after 12 months of treatment (visit M12, panels B and D, n=14 for both groups). The correlation coefficient is from a Pearson (panels A and B) or a Spearman (panels C and D) correlation analysis. White circles: patients from placebo group. Black circles: patients from gallopamil group. BSM: bronchial smooth muscle; CT: computed tomography.

Figure E7. Effect of gallopamil on bronchial thickness.

Representative thin-section 3D-CT images from severe asthmatics obtained before (left) and after (right) 12 months treatment with placebo (panels A and B) and gallopamil (panels C and D). For each panel, left image corresponds to the original right upper lobe image after orthogonal reconstruction, black rectangle indicates RB1 bronchus, right upper and right lower images represent results from semi-automatic segmentation at x3 magnification. Quantification by using the Laplacian-of-Gaussian algorithm of both WT and WT% are given at the bottom right of each panel before (panels A and C) and after 12 months treatment (panels B and D).

Figure E8. Effect of gallopamil on densitometric CT indices of lung hyperinflation and air trapping.

Densitometric indices derived from voxel frequency histogram of lung parenchyma were quantified by using Myrian[®] software. There was no difference after 12 months in both patients treated with gallopamil (black circles, n=15) or placebo (white circles, n=15) regarding inspiratory index of emphysematous changes (VI950, panel A), expiratory index of air trapping (VE850, panel B), or air trapping indices related with mean lung density variation between

inspiration and expiration (E/I MLD, I-E MLD, panels C-D). Medians are represented as horizontal lines. NS: non statistically significant using paired *t* tests.

Figure E9. Effect of gallopamil on clinical, functional and inflammatory outcomes.

As compared with placebo (white circles, n=15), gallopamil (black circles, n=15) did not induce significant differences on number of exacerbations per month (panel A), Juniper Asthma Control Questionnaire (ACQ) score (panel B), Short-acting beta-agonists (SABA) use score (panel C), Asthma Quality of Life Questionnaire (AQLQ) score (panel D), forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) before bronchodilator use (panel E) and Fractional exhaled nitric oxide (FeNO, panel F) over the 12 months treatment period. The term ppb denotes parts per billion. Values are means \pm SEM.

Figure E10. Effect of gallopamil on cardiovascular outcomes.

Safety data show that heart rate (panel A), systolic and diastolic blood pressure (BP, panels B-C) and PR interval on electrocardiogram were not significantly different between asthmatics from placebo (white circles, n=15) group and gallopamil (black circles, n=15) group during the 12 months treatment period. Values are means \pm SEM.

Supplemental tables

Table E1. Prevention of exacerbation plan

Step 1: High doses inhaled corticosteroids alone

- beclomethasone: > 1260 µg/d and ≤ 2000 µg/d
- or budesonide: > 1200 µg/d and ≤ 1600 µg/d
- or fluticasone: > 880 µg/d and ≤ 1000 µg/d

Step 2: High doses inhaled corticosteroids (as step 1) plus long acting beta-2 agonist (salmeterol or formoterol)

Step 3: Very high doses inhaled corticosteroids plus long acting beta-2 agonist

- beclomethasone: > 2000 µg/d
- or budesonide: > 1600 µg/d
- or fluticasone: > 1000 µg/d

Step 4: same as step 3 + anti-leukotriene (montelukast 10 mg/d)

Step 5: same as step 4 + short course of oral corticosteroids (prednisolone 30 mg/d for 15 d)

Step 6: same as step 4 + continues oral corticosteroids (prednisolone 30 mg/d)

Adapted from Green *et al* (6).

Table E2. Reproducibility and repeatability of BSM area in severe asthmatics

Reproducibility	Pearson	Mean Difference	ICC
	r values	± SD	
Intra-observer	0.999	0.003 ± 0.007	0.999
Inter-observer	0.993	0.005 ± 0.026	0.992

Repeatability	SD against mean - Spearman		Mean within subject SD
	r values	p values	
Intra-observer	0.168	0.249	0.004
Inter-observer	0.087	0.554	0.012

Values were obtained after log transformation of BSM areas. BSM areas were assessed from a random selection of 50 biopsies obtained at either M0 or M12. Each image collected from these biopsies was analyzed by one observer at 2 time points and by 2 observers. ICC: intraclass coefficient, Pearson: Pearson correlation coefficient, SD: standard deviation, Spearman: Spearman correlation coefficient. A low, non significant, Spearman correlation coefficient between the SD and the mean, corresponds to a reliable measurement according to Bland and Altman.

Table E3. Between and within-biopsies variability of BSM area in severe asthmatics

Variability	M0			M12		
	Placebo	Gallopamil	<i>P</i>	Placebo	Gallopamil	<i>P</i>
Between-biopsy	0.23	0.25	0.52	0.26	0.22	0.67
Within-biopsy	0.30	0.34	0.32	0.39	0.33	0.31

Data are coefficients of variation. M0: Month 0 (before treatment start); M12: Month 12 (end of treatment). *P* values are obtained using Mann-Whitney tests.

Table E4. Within-group comparisons of wall thickness assessed per bronchial generation on CT scan

Bronchial generation	Placebo			Gallopamil		
	M0	M12	<i>P</i>	M0	M12	<i>P</i>
2 nd	17.7 ± 2.5	17.5 ± 2.4	0.77	16.4 ± 1.1	16.4 ± 1.6	0.15
3 rd	21.9 ± 2.7	20.6 ± 1.9	0.13	21.2 ± 1.8	20.1 ± 1.9	0.02
4 th	21.4 ± 2.5	22.2 ± 3.8	0.18	22.4 ± 2.8	21.1 ± 2.9	0.11

Plus-minus data are mean ± SD. M0: Month 0 (before treatment start); M12: Month 12 (end of treatment). Comparisons between M0 and M12 within each group are performed using paired t tests.

Table E5. Selected adverse events and laboratory abnormalities

Events	Treatment group		P values
	Placebo	Gallopamil	
n	15	16	
Pulmonary event – no. (%)			
Acute bronchitis	2 (13.3)	3 (18.8)	1.00
Asthma exacerbation	13 (86.7)	15 (93.8)	0.60
Breathlessness	8 (53.3)	9 (56.3)	1.00
Bronchospasm	2 (13.3)	2 (12.5)	1.00
Thoracic pain	1 (6.7)	5 (31.3)	0.17
Cardiovascular event – no. (%)			
Atrial fibrillation	0	1 (6.3)	1.00
Bradycardia [†]	5 (33.3)	9 (56.3)	0.28
Leg edema	0	4 (25.0)	0.10
PR interval increase ^{††}	1 (6.7)	4 (25.0)	0.33
Syncope	0	1 (6.3)	1.00
Gastrointestinal or hepatic event – no. (%)			
Abnormality of liver function [#]	1 (6.7)	3 (18.8)	0.60
Acute gastroenteritis	2 (13.3)	4 (25.0)	0.65
Constipation	0	2 (12.5)	0.48
Pyrosis	0	1 (6.3)	1.00
Vomiting	0	1 (6.3)	1.00
Neurologic event – no. (%)			
Dizziness	4 (26.7)	1 (6.3)	0.17
Headache	0	4 (25.0)	0.10
Insomnia	0	1 (6.3)	1.00
Dermatologic event – no. (%)			
Erysipelas	1 (6.7)	0	0.48
Pruritus	0	2 (12.5)	0.48
Other event – no. (%)			
Diabetes	1 (6.7)	0	0.48
Otitis	1 (6.7)	0	0.48
Rhinitis	5 (33.3)	8 (50.0)	0.47
Sinusitis	2 (13.3)	4 (25.0)	0.65
Urinary tract infection	0	2 (12.5)	0.48

Adverse events were defined as those occurring between the first administration of a study drug and the last administration plus 2 days (half-life of gallopamil is 4 to 8h). Values are number of subjects presenting at least one adverse event. [†] Bradycardia is a heart rate of less than 60 beats per minute. ^{††}PR interval increase is PR prolongation greater than 200 ms. [#]An abnormality of liver function was defined as a level of alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase of more than 2 times the upper limit of the normal range, an alkaline phosphatase level of more than 1.5 times the upper limit of the normal range or a total bilirubin

level of 2 mg per deciliter (34 μ mol per liter) or more. P values were calculated with the use of Fisher's exact test.

Supplemental Figures

Figure E1

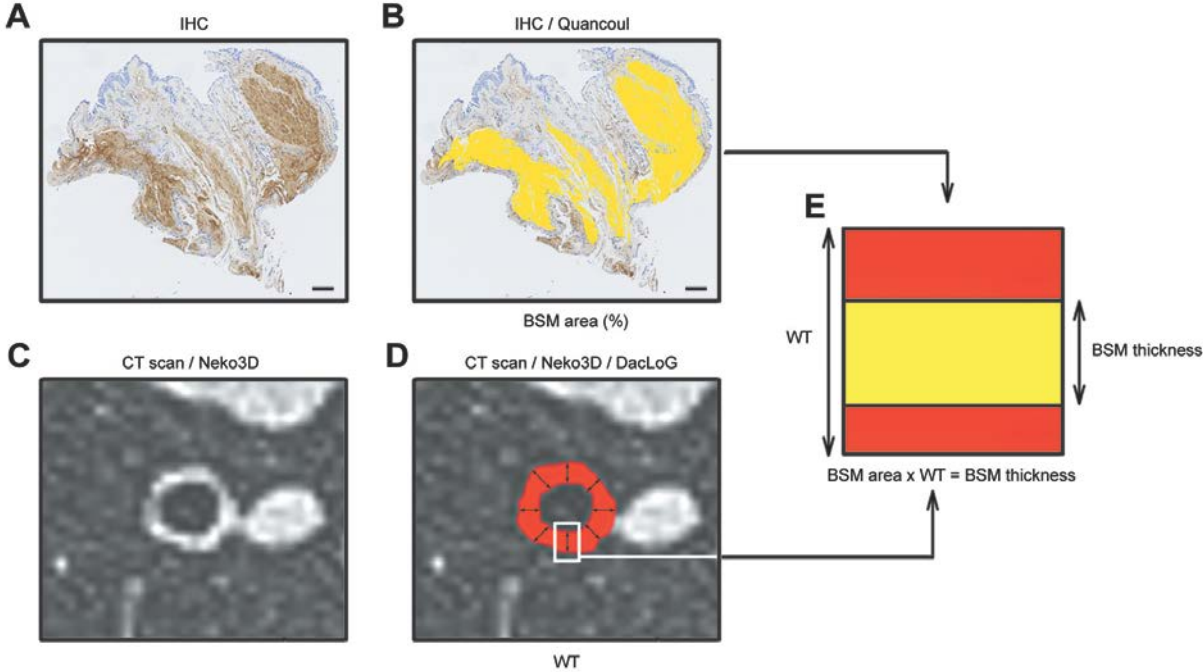


Figure E2

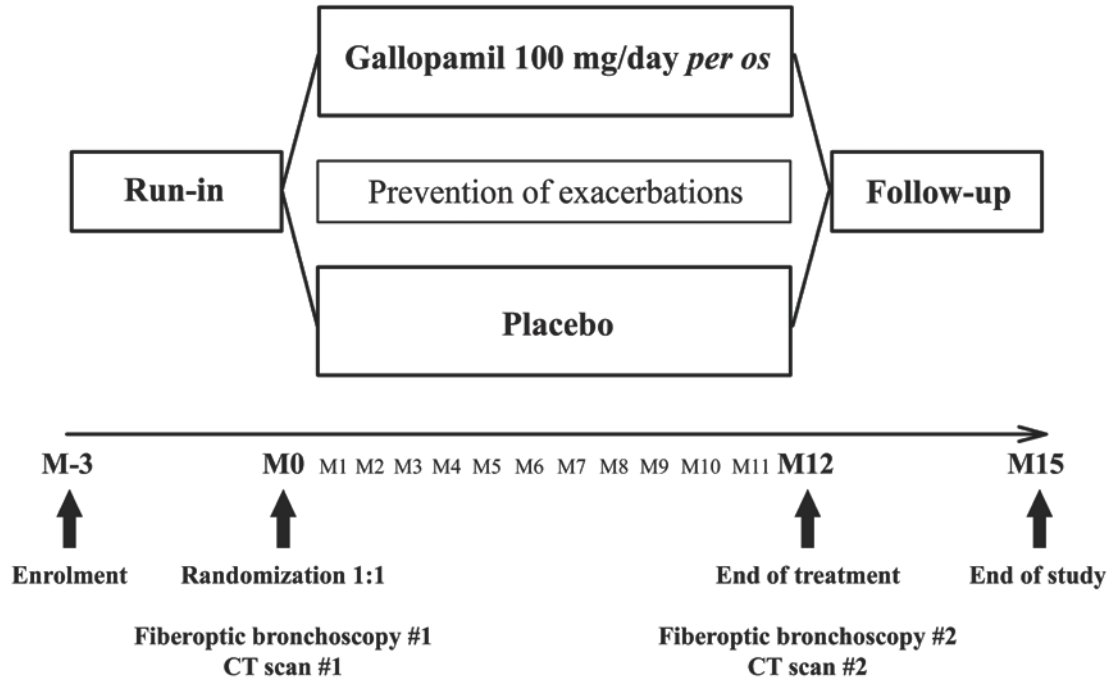
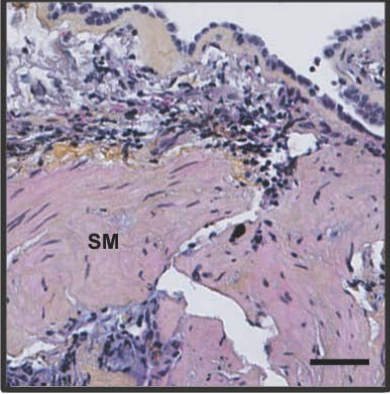
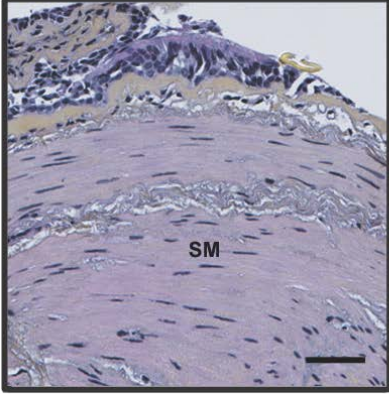


Figure E3

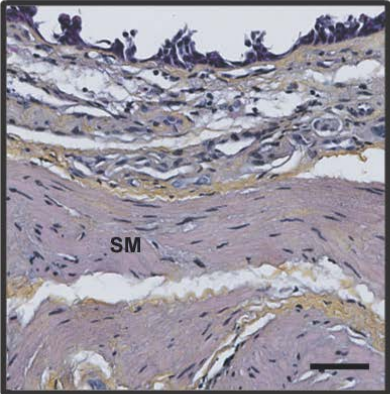
A



B



C



D

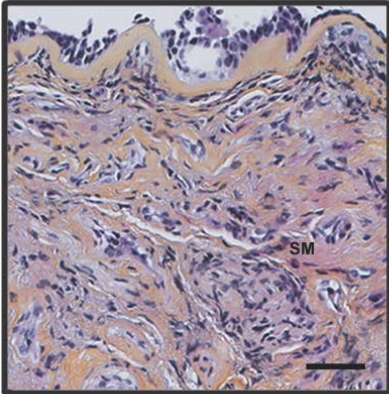


Figure E4

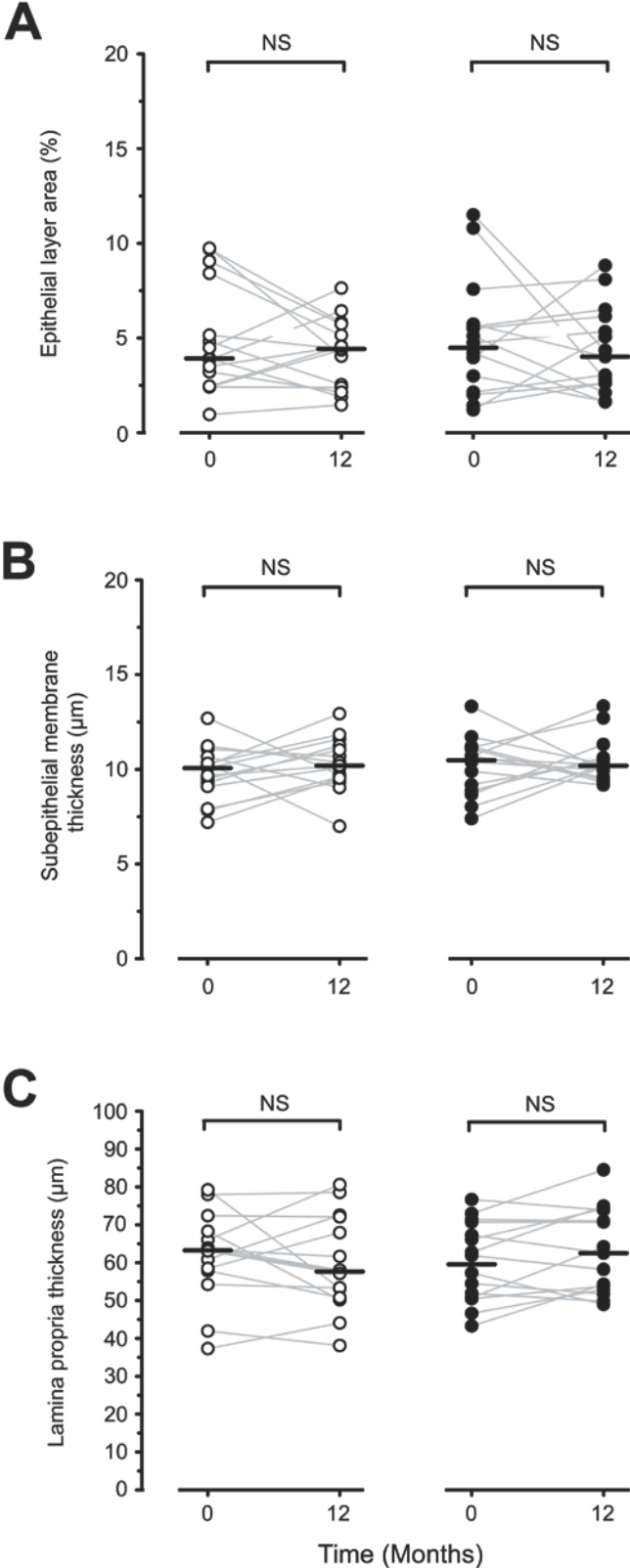


Figure E5

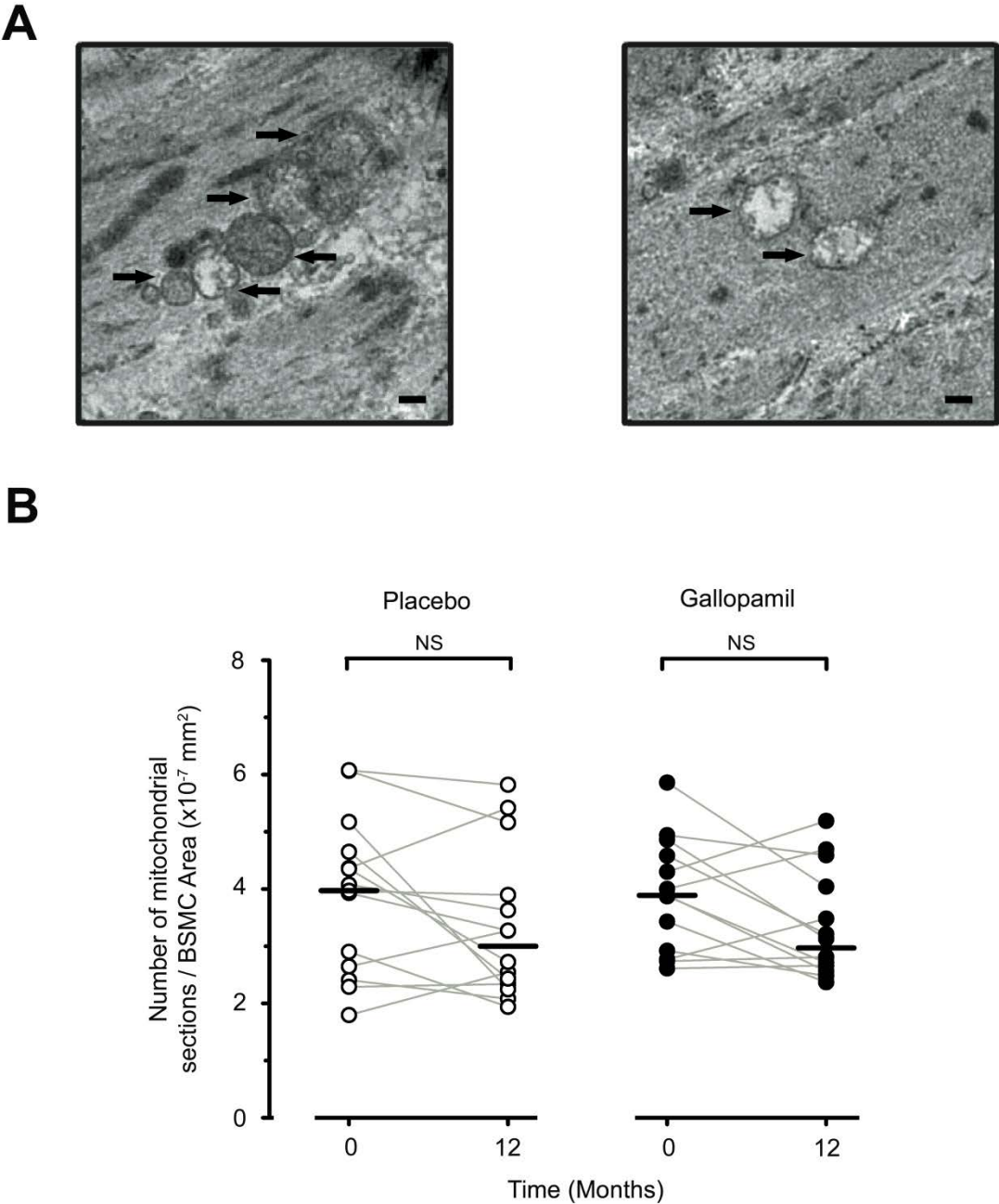
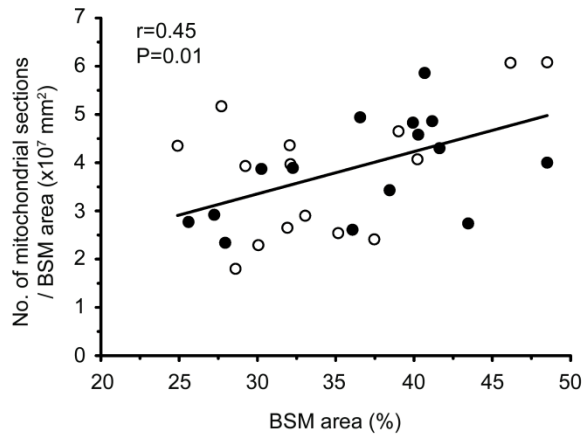
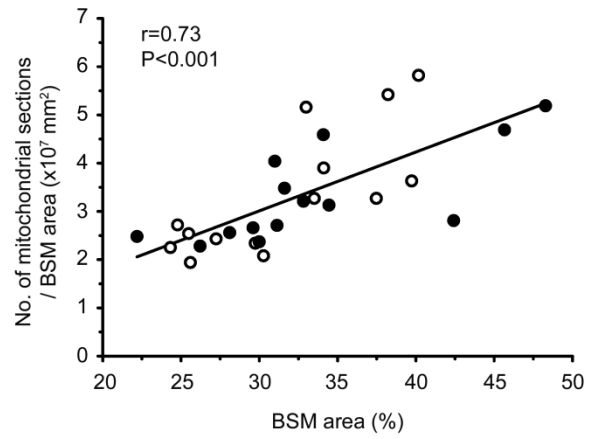


Figure E6

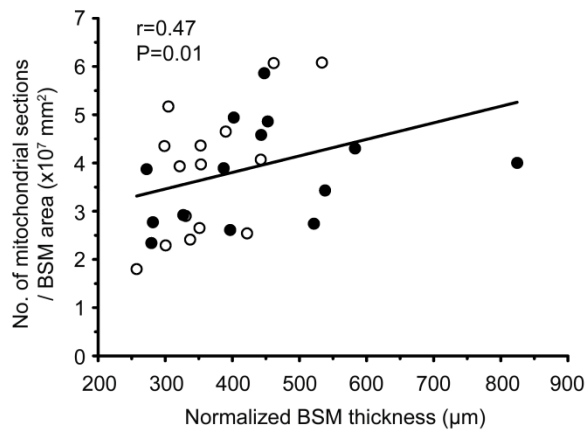
A



B



C



D

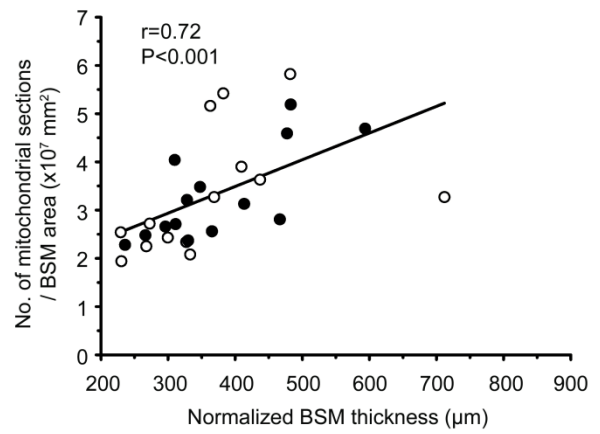


Figure E7

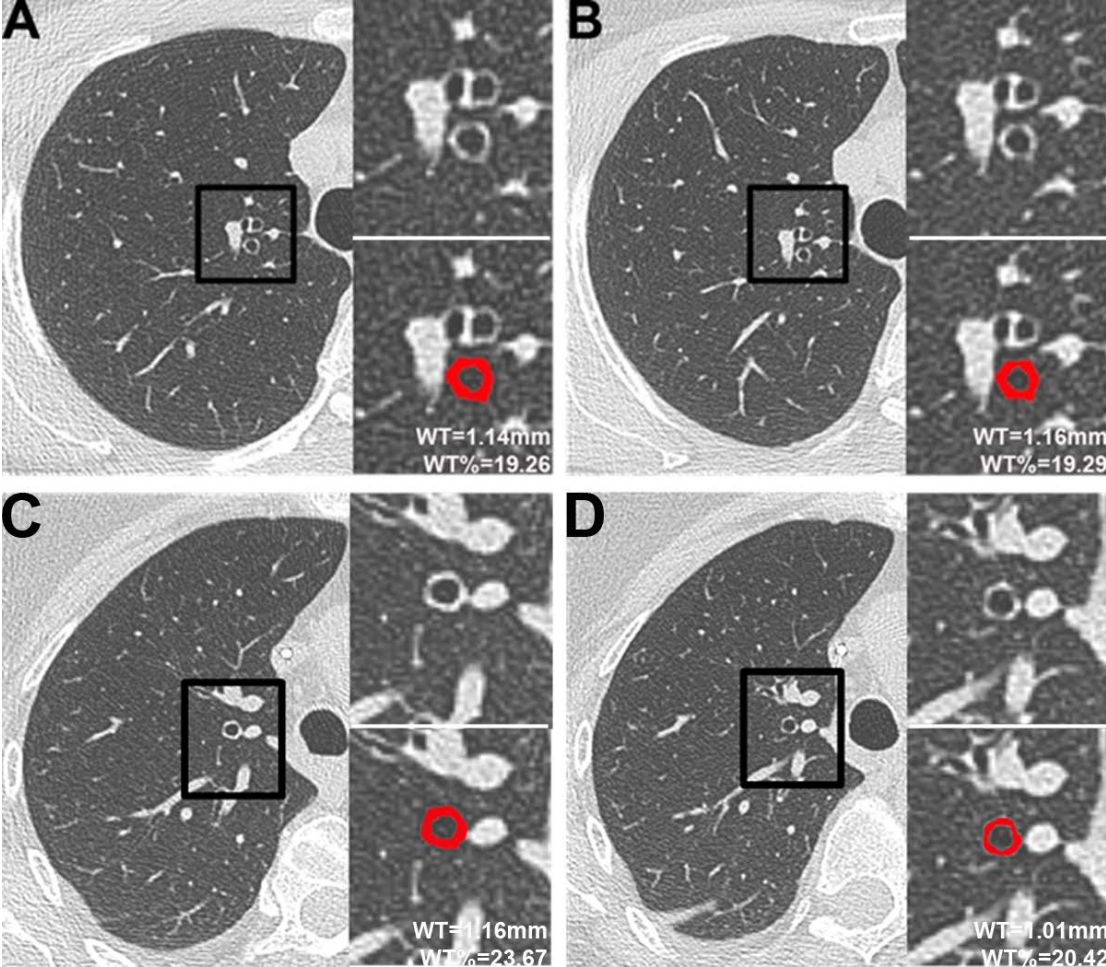
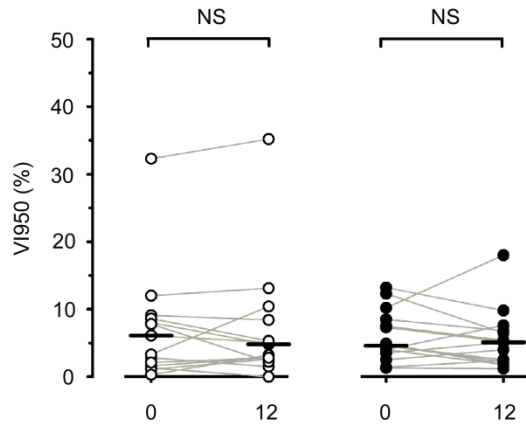
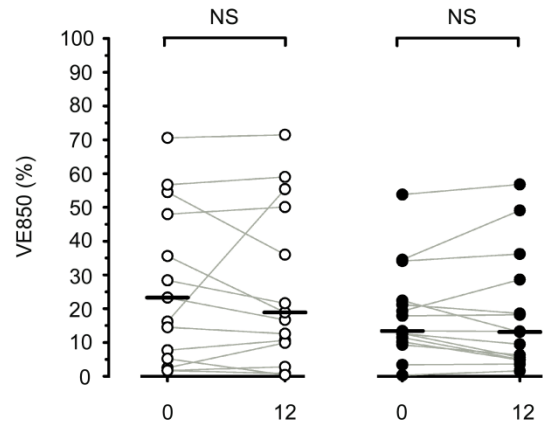


Figure E8

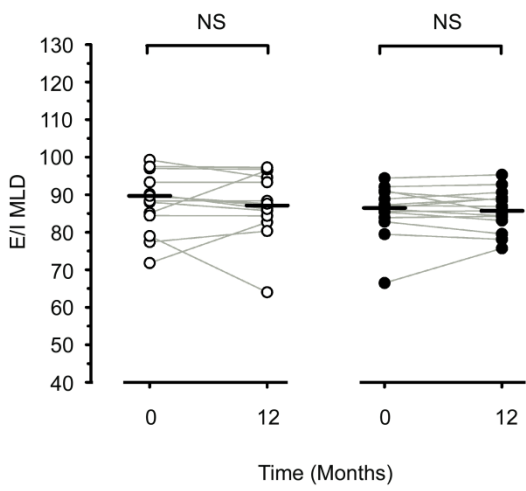
A



B



C



D

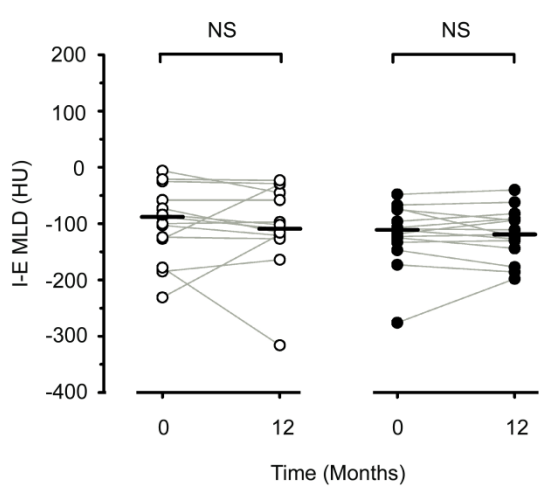
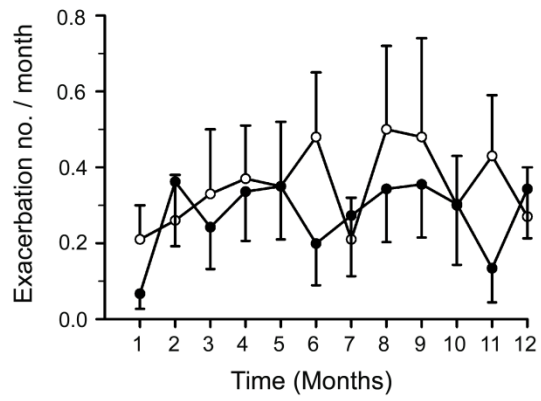
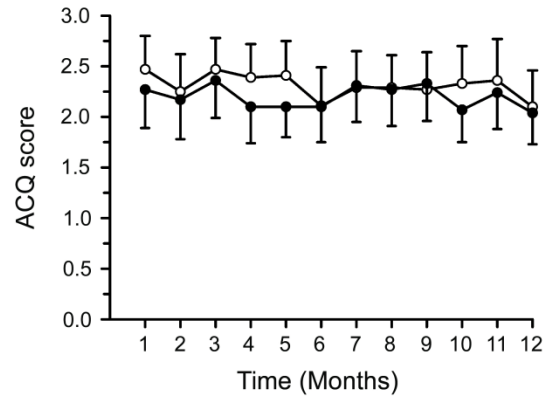


Figure E9

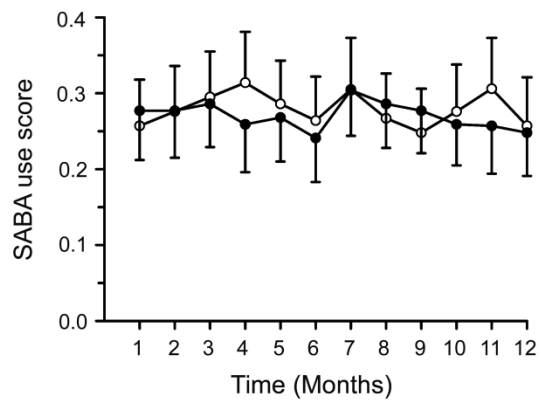
A



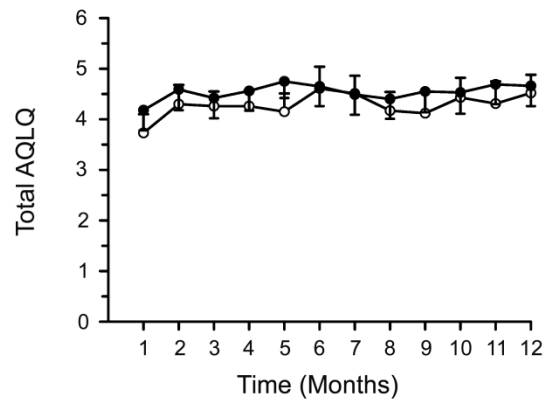
B



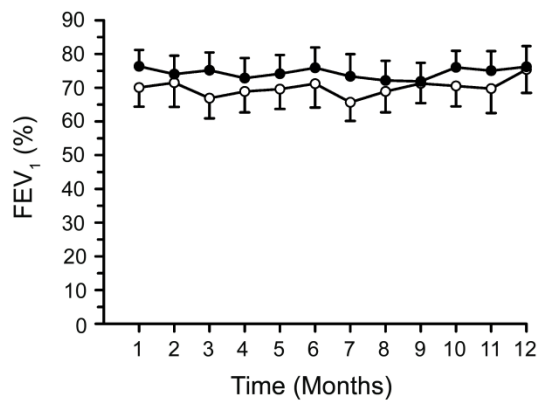
C



D



E



F

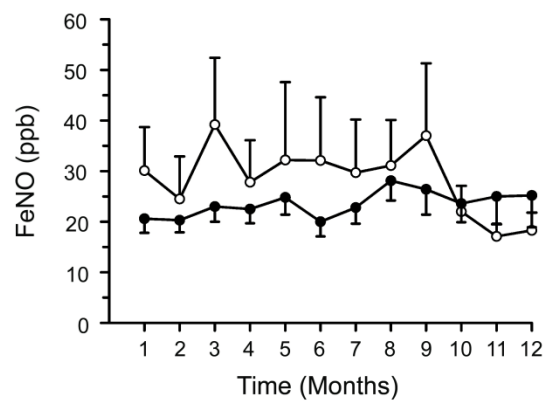
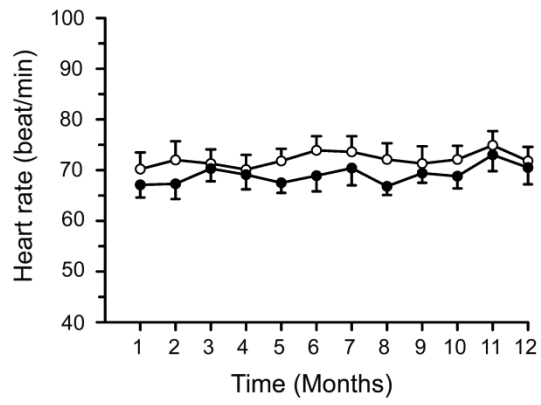
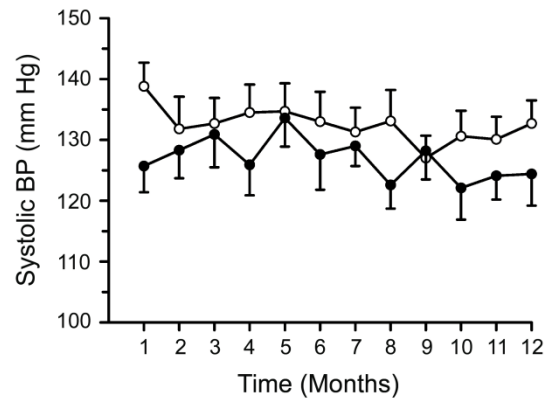


Figure E10

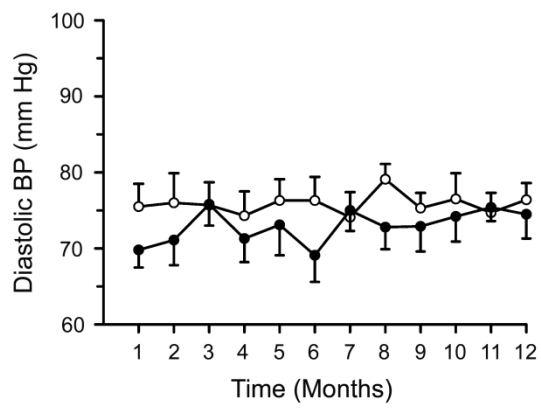
A



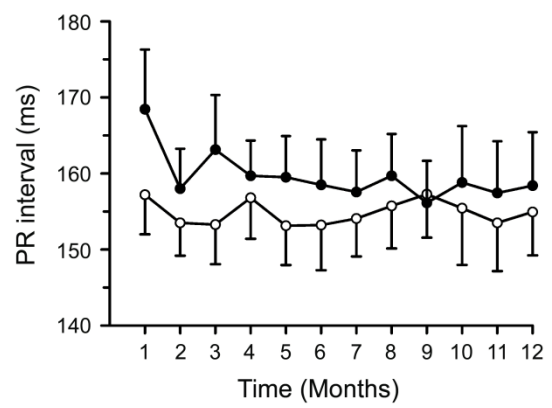
B



C



D



Cette étude montre que le gallopamil, un inhibiteur calcique, peut diminuer la taille du muscle lisse bronchique de patients asthmatiques sévères in vivo. Cette nouvelle arme thérapeutique pharmacologique sur le remodelage bronchique pourrait être une alternative ou un complément à la thermoplastie bronchique plus invasive.

Plusieurs questions restent bien sûr en suspens :

- La dose administrée est elle suffisante ?
- Une durée de traitement plus longue a-t-elle :
 - Un intérêt ?
 - Un effet sur les exacerbations ?
 - Un effet sur les paramètres fonctionnels ?
 - Un effet sur la qualité de vie ?

Par ailleurs ce traitement pourrait être proposé en préventif chez des patients asthmatiques modérés afin d'éviter l'évolution vers un asthme sévère, sous réserve de l'implication des mitochondries dans le remodelage bronchique chez ces patients. C'est pourquoi l'étude Mit'asthme a été élaborée.

III-D Etude du remodelage du muscle lisse bronchique chez le patient asthmatique non-sévère (Mit'asthme).

Dans le travail précédent, il a été démontré in vivo que la taille du muscle lisse bronchique pouvait être diminuée en ciblant la biogenèse mitochondriale dans l'asthme sévère. L'objectif de l'étude « Mit'asthme » a été d'étudier, chez le patient asthmatique non sévère, le remodelage musculaire lisse bronchique et notamment l'implication des mitochondries.

Article 5: Bronchial smooth muscle remodeling in non-severe asthma

Bronchial smooth muscle remodeling in non-severe asthma

Pierre-Olivier Girodet^{1,2,3}, Benoit Allard^{1,2}, Matthieu Thumerel^{1,2,3}, Hugues Begueret³,
Isabelle Dupin^{1,2}, Olga Ousova^{1,2}, Régis Lassalle^{1,2}, Elise Maurat^{1,2}, Annaig Ozier^{1,2,3},
Thomas Trian^{1,2}, Roger Marthan^{1,2,3} and Patrick Berger^{1,2,3}

¹Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, Département de Pharmacologie, CIC 1401, F-33000 Bordeaux, France

²INSERM, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, CIC1401, F-33000 Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, CIC1401, Service d'Anatomopathologie, F-33604 Pessac, France

Correspondence to: Pr. Patrick Berger, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Phone: +33 5 57 57 16 94

Fax: +33 5 57 57 16 95

Email: patrick.berger@u-bordeaux.fr

Author's contributions: Conception and design: P.O.G., T.T., P.B.; Analysis and interpretation: P.O.G., B.A., M.T., H.B., I.D., O.O., R.L., E.M., A.O., T.T., R.M., P.B.; Drafting the manuscript for important intellectual content: P.O.G., R.M., P.B.; Revising the manuscript for important intellectual content: P.O.G., R.M., P.B.; final approval of the manuscript: P.O.G., B.A., M.T., H.B., I.D., O.O., R.L., E.M., A.O., T.T., R.M., P.B.

Source of support: This study was sponsored by Bordeaux University Hospital (*i.e.* "CHU de Bordeaux"). This study was funded by a grant from GlaxoSmithKline.

Running head: Airway remodeling and non-severe asthma.

Descriptor number: 1.04

Word count: 2517

At a glance commentary:**Scientific knowledge on the subject:**

- Bronchial smooth muscle remodeling and mitochondrial biogenesis are implicated in severe asthma pathogenesis.
- However, these processes have not yet been explored in non-severe asthma.

What this study adds to the field:

- Bronchial smooth muscle remodeling and enhanced mitochondrial biogenesis are present in some patients with non-severe asthma.
- Increased bronchial smooth muscle mass in non-severe asthmatics is related to higher rate of exacerbations and worse asthma control.
- Eosinophilia and early onset of non-severe asthma are not associated to increased exacerbations frequency and uncontrolled asthma.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org

Abstract

Rationale: Increased bronchial smooth muscle (BSM) mass is a key feature of airway remodeling that classically distinguishes severe from non-severe asthma. Proliferation of BSM cells involves a specific mitochondria-dependent pathway in severe asthmatic patients. However, BSM remodeling as well as mitochondrial biogenesis have not been examined in non-severe asthma.

Objective: We aimed to assess whether an increase in BSM mass was also implicated in non-severe asthma, and its relationship with mitochondria and clinical outcomes.

Methods: We enrolled 34 never smoker subjects, with non-severe asthma. Additionally, we recruited 56 non-severe and 19 severe asthmatics, as comparative groups (COBRA cohort, Inserm). A phenotypic characterization was performed using questionnaires, atopy and pulmonary function testing, exhaled nitric oxide measurement and blood collection. Bronchial-biopsy specimens were processed for immunohistochemistry and electron microscopy analysis. Following BSM remodeling assessment, participants were monitored over a 12 months period.

Measurements and Main Results: We identified characteristic features of remodeling (BSM area > 26.6%) and increased mitochondrial number within BSM in a sub-group of non-severe asthmatics. The number of BSM mitochondria was positively correlated to BSM area ($r = 0.78$; $P < 0.001$). Follow-up analysis showed that asthmatics with high BSM had worse asthma control and higher rate of exacerbations per year as compared to low BSM patients.

Conclusion: This study reveals that BSM remodeling and mitochondrial biogenesis may play a critical role in natural history of non-severe asthma (“Mitasthme” study; ClinicalTrials.gov number, NCT00808730).

Key words: asthma; exacerbation; mitochondria; remodeling; smooth muscle

Abstract word count: 234

Introduction

Asthma is a heterogeneous inflammatory disease characterized by variable respiratory symptoms associated to the presence of bronchial hyperresponsiveness and bronchial remodeling (1). Bronchial remodeling is a complex process related to various pathological pathways and the onset of which can occur very early in the asthmatic life, concomitantly with the inflammatory process (2). It consists in an abnormal increased thickening of the bronchial wall due to various structural alterations including abnormal epithelium, sub-epithelial membrane thickening, enhanced deposition of extracellular matrix, neoangiogenesis, mucus gland hypertrophy and increased bronchial smooth muscle (BSM) mass (1). Amongst these various alterations, marked increased BSM mass is the key structural change that distinguishes severe from moderate asthma (3). Indeed, the amount of BSM mass is correlated to a decrease in lung function (4). Moreover, in severe asthmatic patients, the increased BSM mass has been associated with chronic airflow obstruction (5). Amongst various potential mechanisms, the increased BSM mass has been associated with an increased proliferation of asthmatic BSM cells both *in vitro* (6-8) and *in vivo* (4). *In vitro*, the increased proliferation of asthmatic BSM cells has been related to an increased mitochondrial biogenesis, in severe asthmatic BSM cells only (8). *In vivo*, the BSM of severe asthmatic patients is also characterized by an increased number of mitochondria per surface area and by an increased density of mitochondria, which reflects mitochondrial activity (8). However, the presence of BSM remodeling in non-severe asthmatics is probably underestimated and the relationships between BSM mass and various clinical, functional and inflammatory outcomes remain largely unknown in this asthmatic population. Along the same line, the number of mitochondria in the BSM of non-severe asthmatics has not been evaluated.

We hypothesized that the natural history of non-severe asthma could be influenced not only by the inflammatory process but also by this key feature of bronchial remodeling *i.e.*, increased BSM mass. To test this hypothesis, we have quantified BSM mass in a population of non-severe asthmatics that is likely to be constituted by patients with variable intensity of bronchial remodeling. The aim of this study was thus to assess the potential role of BSM remodeling in non-severe asthma.

Methods

Patients and samples

A total of 34 patients with non-severe asthma were enrolled in the “Mitasthme” trial from the “Centre Hospitalier Universitaire” of Bordeaux, France (*see* Figure E1). The study received approval from the local ethics committee and has been registered under the N° NCT00808730 at ClinicalTrials.gov. All patients were graded as non-severe asthmatics according to the Global Initiative for Asthma (GINA), *i.e.* GINA steps 1, 2 or 3 (10). Three visits were scheduled (*see* Table E1): Visit 1 (inclusion), Visit 2 (bronchoscopy) and Visit 3 (12 months \pm 7 days after visit 2). Bronchial specimens from 30 subjects were obtained by fiberoptic bronchoscopy, as described previously (8). We collected, for all patients, age at onset of asthma, Juniper asthma control questionnaire (ACQ) score (11), spirometry, fractional exhaled nitric oxide (FeNO), serum total IgE and blood eosinophils assessed within the week before the fiberoptic bronchoscopy.

Additionally, 56 non-severe asthmatics were recruited from the “COBRA” cohort (“Cohorte Obstruction Bronchique et Asthme”; Bronchial Obstruction and Asthma Cohort; sponsored by the French National Institute of Health and Medical Research, INSERM), as a second comparative group, using the same inclusion criteria. Patients from the “Mitasthme” study were also finally compared to a third group of 19 severe asthmatics (12), also recruited from the “COBRA” cohort, who underwent fiberoptic bronchoscopy. Details of inclusion and exclusion criteria are provided in the online data supplement.

Twelve months after the inclusion visit, the number of asthma exacerbations, as-needed bronchodilator use (short acting beta-2 agonist, SABA), ACQ score, respiratory function and airway inflammation were assessed. Asthma exacerbations were defined as events of worsening asthma (10) requiring a short course of oral or parenteral corticosteroids for 5 to

10 days. We documented the occurrence of exacerbation, using medical records. Subject verbal reports were not acceptable.

Optic microscopy and immunohistochemistry

Bronchial specimens were fixed in 10% buffered formalin and processed in standard fashion for paraffin embedding as described previously (8, 13). The total area of BSM layer was assessed, manually in a blinded fashion using Quancoul[®] software at a magnification of x100 as described previously (8, 14-16). This BSM area was normalized to the whole area of the corresponding tissues and presented as percentages of whole area as described previously (17). For each patient, 3 biopsies were collected and the BSM was analyzed in 6 to 8 sections in each biopsy.

Electron microscopy

Specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, postfixated in 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Epon as described previously (18).

Statistical analysis

Comparisons between 2 groups were performed by means of two-sided independent t tests for variables with a parametric distribution, Fisher's exact test for comparison of proportions or Mann-Whitney U test for comparison of nonparametric variables. Exacerbation frequency was calculated and compared between the study groups with the use of a negative binomial model, as previously described (17). Pearson correlation matrix was built. Stepwise multiple linear regressions were performed to determine the parameters that significantly influenced BSM area. Comparisons between data obtained in the "Mitasthme" trial and those from the

“COBRA” cohort are considered as *post hoc* analyses. Values are presented as mean \pm SEM.

Results were considered significant at a *P* value of less than .05.

Results

Detection of BSM remodeling in non-severe asthmatics

Out of the 30 bronchoscopies performed in non-severe asthmatics in the “Mitasthme” study, BSM was assessable from 28 patients. The median BSM normalized area was 26.6%. Patients were thus divided in high BSM (> 26.6%, 14 patients) and low BSM (<26.6%, 14 patients) groups (Figure 1A&B). Between and within-biopsies variabilities in normalized BSM area were similar in high BSM vs. low BSM groups (coefficients of variation were 0.32 vs. 0.34; $P = 0.45$). Patients’ clinical and functional characteristics of these two BSM groups are presented in Table 1. Patients from both low and high BSM groups were similar for all initially tested parameters and, in particular, age at onset of symptoms, asthma duration, eosinophils status, respiratory function and asthma treatment.

Increased mitochondrial number and density in non-severe asthma

The number and the density of BSM mitochondria (Figure 1C and 1D) were increased in the high BSM group as compared to the low BSM group (Figure 2A and 2C). In addition, the number and the density of BSM mitochondria were both significantly and positively correlated to the BSM area within the whole population of non-severe asthmatics (Figure 2B and 2D). This relationship between BSM mass and mitochondria density is in agreement with results obtained in severe asthmatics. Indeed, both BSM area and the number of mitochondria within BSM cells were significantly increased in severe asthma compared to patients from the Mitasthme trial (*see* Table E2).

BSM remodeling and progression of non-severe asthma

We next evaluated whether or not, the presence of high BSM could define specific subsequent clinical outcomes. The number of exacerbations for the 12 following months (Figure 3A and 3B) was increased 12 months after the fiberoptic bronchoscopy in the high BSM group as compared to the low BSM group (relative risk, 5.50; 95% CI, 1.551–19.503; $P = 0.008$, Figure 3B). Interestingly, the BSM area was significantly correlated to the number of exacerbations, which subsequently occurred within the following 12 months after the fiberoptic bronchoscopy (Figure 3C). The ACQ score (Figure 3D) and the mean SABA use per week (Figure 3E) were also increased in the high BSM group but there was no difference in terms of FeNO (Figure 3F) or FEV₁ (data not shown).

The key role of BSM cell mitochondria in non-severe asthma

To further explore the role of BSM mass variability in non-severe asthmatics, several clinical and/or functional parameters were analyzed in a correlation matrix (Table 2). Then, these variables were entered into a stepwise multiple regression analysis to determine both the best model and the strength of each individual parameter to predict BSM area (Table 3). We first removed from the models the independent variables with significant cross-correlations. We found that the best model associated the number of mitochondria and the initial ACQ score, and explained 69% ($R^2 = 0.69$) of the variation in this measurement (Table 3). However, of these variables, the number of mitochondria explained 55% of the variation alone, while the initial ACQ score only explained 14%.

Clinical asthma phenotypes and progression of non-severe asthma

When differentiating non-severe asthma patients from “Mitasthme” trial in terms of early *versus* late onset asthma, no prospective outcome was significantly different at year 1 after the inclusion visit (*see* Figure E2). Moreover, when differentiating asthmatic patients in terms of eosinophilic *versus* non-eosinophilic asthma, only FeNO remained elevated in eosinophilic asthma (*see* Figure E3). Similar results were obtained in a larger sample of non-severe asthmatics (n = 56; *see* Table E3) from the “COBRA” cohort (*see* Figures E2 and E3). Thus, conversely to BSM mass increase, eosinophilia was not associated to higher exacerbations frequency and poorer asthma control in non-severe asthma. Patients from the “Mitasthme” trial with total serum IgE level higher than 214 IU/mL (19) had lower asthma control at year 1 compared to patients with low total IgE level (≤ 214 IU/mL) but this result was not reproduced in the “COBRA” cohort (*see* Figure E4).

Discussion

This study demonstrates, for the first time that a subgroup of non-severe asthmatics with BSM remodeling presents increased exacerbations frequency and worse asthma control compared to patients without BSM remodeling. Both BSM area and number of mitochondria from non-severe asthmatics were lower than those from severe asthmatics. Moreover, both the number of BSM mitochondria and the initial ACQ score can predict the variation of BSM mass.

The issue of the heterogeneous distribution of BSM mass within the bronchial tree must be first addressed. Indeed, Jones *et al.* recently demonstrated that BSM area was different in large, medium or small airways in asthmatic patients and that the coefficient of variation of BSM area between sections reached 9.1% in the large airways of asthmatics (20). In the present study, we paid a special attention to averaging the BSM area from a variety of sections from each biopsy and from a variety of biopsies per patient. These biopsies were obtained by fiberoptic bronchoscopy from the same large airways in each patient. Bronchoscopy performed in asthmatic patients was safe in our experience (8, 13, 15-17, 21). The use of bronchoscopy should thus be limited to expert centers, since measuring BSM area requires large forceps and dedicated pathologists. However, it remains invasive and alternative biomarkers of BSM area are needed. Whereas there is no validated BSM biomarker, the circulating levels of YKL-40 (22) have been correlated to other aspects of bronchial remodeling such as subepithelial membrane thickness. Periostin contributes also to subepithelial thickening in asthmatic airways (23) and its serum levels are related to greater decline in FEV₁ in asthmatic patients on ICS treatment (24).

One of the main interests of this study is to define a new non-severe asthma group based on BSM mass *i.e.*, the key structural change in bronchial remodeling. Pathophysiological processes leading to increased BSM mass are complex and remain not completely

understood (1). The involvement of mitochondria in the increased mass of BSM was first evidenced in our laboratory (8). Here, we show in the high BSM group of non-severe asthmatics that both the number and the density of mitochondria were increased. It should be noted that the number of mitochondria was normalized to the BSM area, and that the density of BSM mitochondria is known to be in relation with mitochondrial activity (8). These results can thus be related to the increased number and density of BSM mitochondria that we previously reported in the BSM of severe asthmatic patients (8). In such patients, the increased mitochondrial biogenesis was a key event leading to the increased BSM cell proliferation and BSM remodeling (8). Likewise, our current results thus suggest that this is also the case in non-severe asthmatics. Indeed, the number of mitochondria was correlated to the BSM area and, using multiple regression analysis, the number of mitochondria alone explained the majority of the variation in BSM area in non-severe asthma. However, further *in vitro* studies are required to confirm that similar pathways are involved in non-severe asthmatic BSM remodeling.

The high BSM group appears to be related to some specific clinical outcomes such as the rate of future exacerbations. We assessed the number of asthma exacerbations/patient/year at two time points, before and one year after the bronchoscopy, similarly. Despite the lack of validated criteria, the definition of asthma exacerbations in our study included a physician-documented deterioration in symptoms, such as shortness of breath, cough, wheezing, or chest tightness (10). This definition also included use of systemic corticosteroids for 5 to 10 days to be consistent with ATS/ERS Task Force recommendations on retrospective assessment of asthma exacerbations (25).

The Th2 high eosinophilic asthma, which is one of the most studied endotype (26), represents half of the asthma population (27). It has been previously shown that, after ICS reduction, sputum eosinophil numbers increase before the onset of exacerbations (28).

Moreover, management strategies based on controlling eosinophilic inflammation are associated with a reduction in the frequency of exacerbations (29, 30). In the current study, the rates of both previous and future exacerbations were similar in eosinophilic compared to non-eosinophilic asthma in the “Mitasthme” trial. This result was confirmed in a second larger group of non-severe asthmatic patients (from the “COBRA” cohort), who was also prospectively followed for one year to confirm this absence of difference. Our focus has been on non-severe asthmatics, both in the “Mitasthme” trial and the “COBRA” cohort, whereas previous studies (29, 30) recruited patients with asthma of variable severity, a high proportion of whom had severe asthma (29). Moreover, the pathophysiology of asthma exacerbations is complex and probably involves multiple pro-inflammatory cells. Further studies are required to dissect the mechanisms that lead to exacerbations in non-severe asthmatics, notably the role of eosinophils and its potential interaction with BSM cells.

Focusing on the amount of BSM mass raises the issue of bronchial thermoplasty, which is supposed to target BSM for the treatment of asthma (31). Whereas such a process has been shown to significantly reduce the rate of exacerbations and improve the asthma control (31), the target asthma population remains to be defined. From the current study, we demonstrate that defining a high BSM group of patient has clinical implications, even in non-severe asthma. However, we did not demonstrate a clear causal relationship between BSM mass and the occurrence of future exacerbations. Further clinical trials, at a larger scale should be performed to determine which patients might preferentially benefit from bronchial thermoplasty or other processes able to decrease BSM size (17).

In conclusion, we have related the presence of BSM remodeling in non-severe asthmatics with an increased mitochondrial number. Patients with high BSM mass appear to experience specific important clinical outcome such as increased rate of future exacerbations.

Noninvasive techniques for bronchial remodeling measurement are needed to distinguish low BSM from high BSM patients, especially in non-severe asthma.

Acknowledgments: The authors thank the staff of the pathology department (CHU de Bordeaux) and the Bordeaux Imaging Center (Univ. Bordeaux), Céline Casana, Virginie Niel and Thomas Royo-Lazaro for technical assistance.

Abbreviations: ACQ, asthma control questionnaire; BSM, bronchial smooth muscle; EM, electron microscopy; FeNO: fractional exhaled nitric oxide; FEV₁: forced expiratory volume in 1 second; FVC: forced vital capacity; GINA: Global Initiative for Asthma; ICS: inhaled corticosteroid; PC₂₀: provocative concentration of methacholine causing a 20% fall in FEV₁; SABA: short acting beta-2 agonist

References

1. Girodet PO, Ozier A, Bara I, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther* 2011;130:325-337.
2. Turato G, Barbato A, Baraldo S, Zanin ME, Bazzan E, Lokar-Oliani K, Calabrese F, Panizzolo C, Snijders D, Maestrelli P, Zuin R, Fabbri LM, Saetta M. Nonatopic children with multitrigger wheezing have airway pathology comparable to atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:476-482.
3. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:544-549.
4. Ramos-Barbon D, Fraga-Iriso R, Brienza NS, Montero-Martinez C, Vereza-Hernando H, Olivenstein R, Lemiere C, Ernst P, Hamid QA, Martin JG. T cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:317-324.
5. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Hamid Q, Martin J. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:45-51 e41-44.
6. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burgess JK, Black JL. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:474-477.
7. Roth M, Johnson PR, Borger P, Bihl MP, Rudiger JJ, King GG, Ge Q, Hostettler K, Burgess JK, Black JL, Tamm M. Dysfunctional interaction of c/ebpalpha and the

glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 2004;351:560-574.

8. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;204:3173-3181.

9. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, Cockcroft DW, Fish JE, Sterk PJ. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the american thoracic society was adopted by the ats board of directors, july 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309-329.

10. Global strategy for asthma management and prevention, global initiative for asthma (GINA). 2012; Available from: <http://www.ginasthma.org>.

11. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 1999;14:902-907.

12. Proceedings of the ats workshop on refractory asthma: Current understanding, recommendations, and unanswered questions. American thoracic society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-2351.

13. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, Thumerel M, Ousova O, Kolbeck R, Coyle AJ, Woods J, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:715-722.

14. Berger P, Compton SJ, Molimard M, Walls AF, N'Guyen C, Marthan R, Tunon-De-Lara JM. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 1999;29:804-812.

15. Berger P, Girodet PO, Begueret H, Ousova O, Perng DW, Marthan R, Walls AF, Tunon de Lara JM. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J* 2003;17:2139-2141.
16. El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006;176:1860-1868.
17. Girodet PO, Dournes G, Thumerel M, Begueret H, Dos Santos P, Ozier A, Dupin I, Trian T, Montaudon M, Laurent F, Marthan R, Berger P. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:876-883.
18. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 2007;62:8-15.
19. Martins TB, Bandhauer ME, Bunker AM, Roberts WL, Hill HR. New childhood and adult reference intervals for total ige. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:589-591.
20. Jones RL, Elliot JG, James AL. Estimating airway smooth muscle cell volume and number in airway sections. Sources of variability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:246-252.
21. Girodet PO, Ozier A, Trian T, Begueret H, Ousova O, Vernejoux JM, Chanez P, Marthan R, Berger P, Tunon de Lara JM. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 2010;65:1004-1012.
22. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 2007;357:2016-2027.

23. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, Muller SJ, Fahy JV. Roles of epithelial cell-derived periostin in tgf-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:14170-14175.
24. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:305-312 e303.
25. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, Chanez P, Enright PL, Gibson PG, de Jongste JC, Kerstjens HA, Lazarus SC, Levy ML, O'Byrne PM, Partridge MR, Pavord ID, Sears MR, Sterk PJ, Stoloff SW, Sullivan SD, Szeffler SJ, Thomas MD, Wenzel SE. An official american thoracic society/european respiratory society statement: Asthma control and exacerbations: Standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:59-99.
26. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18:716-725.
27. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, Koth LL, Arron JR, Fahy JV. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:388-395.
28. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.

29. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-1721.
30. Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith CH, Laviolette M, Parameswaran K, Hargreave FE. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: Effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483-494.
31. Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Niven RM, Corris PA, Siersted HC, Olivenstein R, Pavord ID, McCormack D, Chaudhuri R, Miller JD, Laviolette M. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med* 2007;356:1327-1337.

Figure Legends

Figure 1. BSM remodeling and mitochondrial biogenesis in non-severe asthma

Representative optic microscopic images from bronchial sections stained with Ab anti-actin (**A, B**) and representative electronic microscopic images (**C, D**) were obtained from two non-severe asthmatics with low bronchial smooth muscle (BSM) (**A, C**) or high BSM mass (**B, D**). Some smooth muscle mitochondria were visualized (arrows). Bronchial wall from low BSM subject shows a dense inflammatory infiltrate (**A**).

A, B: $\times 100$ magnification; bars, 30 μm . **C, D:** $\times 4200$ magnification; bars, 1 μm .

Figure 2. BSM remodeling is associated to increased mitochondrial number and density in non-severe asthmatics

Bronchial specimens were obtained from non-severe asthmatics with low bronchial smooth muscle (BSM) (BSM area $< 26.6\%$; $n = 14$; white bars) or high BSM mass (BSM area $> 26.6\%$; $n = 14$; black bars). The number (**A**) and the density (**C**) of mitochondria were assessed from electronic microscopic images. Data are the mean \pm the SEM. *, $P < 0.05$ using Student's t tests. Scatter plots (**B, D**) show correlation between normalized BSM area and mitochondrial biogenesis parameters. The normalized area of BSM layer was assessed using Quancoul[®] software on bronchial sections at a magnification of $\times 100$. The BSM area was normalized by the whole area of the corresponding tissues and presented as percentages of whole area. White circles: low BSM group; black circles: high BSM group; $r =$ Pearson correlation coefficient.

Figure 3. Impact of BSM remodeling on exacerbations frequency and control in non-severe asthma

At year 1 after the fiberoptic bronchoscopy, non-severe asthmatics with high bronchial smooth muscle (BSM) mass (n = 12) had higher numbers of exacerbations (**A, B**) compared to patients with low BSM mass (n = 12). Scatter plot (**C**) show correlation between normalized BSM area and number of exacerbations per 12 months. Asthmatics with high BSM had lower asthma control (**D, E**) and similar levels of airway inflammation (**F**) compared to low BSM patients. Low BSM group: BSM area < 26.6% (white bars, dashed line and white circles); High BSM group: BSM area > 26.6% (black bars, solid line and black circles). ACQ: Juniper Asthma Control Questionnaire. Short acting beta-2 agonist (SABA) use is expressed as the number of puffs per week for 12 months. FeNO: Fractional exhaled nitric oxide. The term ppb denotes parts per billion. Data are the mean \pm the SEM. *, $P < 0.05$ using Mann-Whitney test. White circles: low BSM group; black circles: high BSM group; r = Pearson correlation coefficient.

Tables

Table 1. Demographic and baseline characteristics of the patients

	Low BSM group	High BSM group	<i>P</i> values
N	14	14	
Age (yr)	33.8 ± 4.0	33.0 ± 3.4	0.88
Sex (M/F)	6/8	5/9	1.00
Score on Juniper Asthma Control Questionnaire	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.06
Age at onset of symptoms (Early/late) (yr)	9/5 10.2 ± 2.7	9/5 13.1 ± 3.9	1.00 0.87
Asthma duration (yr)	24.3 ± 3.7	20.5 ± 3.1	0.63
Atopic status (Y/N)	10/4	13/1	0.33
Total IgE (U/ml)	499 ± 234	868 ± 592	0.45
High eosinophil status (Y/N)	6/8	8/6	0.71
Blood eosinophil count ($\times 10^9$ /liter)	0.21 ± 0.04	0.29 ± 0.06	0.36
FeNO (ppb)	36.5 ± 10.0	37.0 ± 6.3	0.29
Chronic airflow obstruction (Y/N)	0/14	0/14	1.00
Prebronchodilator FEV ₁ (% of pred. value)	91.9 ± 3.4	94.2 ± 3.7	0.66
FEV ₁ :FVC ratio (%)	75.7 ± 1.6	78.5 ± 2.1	0.29
PC ₂₀ for methacholine (mg)	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.74
Obesity (Y/N)	0/14	2/12	0.48
Body-mass index (kg/m ²)	23.3 ± 0.9	25.4 ± 2.3	0.80
Smoking status			
Current smoker (Y/N)	0/14	0/14	1.00
Ex-smoker (Y/N)	0/14	0/14	1.00
Pack-years (no.)	0	0	
Frequent exacerbations > 2/yr (Y/N)	0/14	0/14	1.00
Severe exacerbations per subject in previous year (no.)	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.29
Treatment			
Dose of ICS - beclomethasone equivalent (μ g/day)	732 ± 182	786 ± 167	0.83
Use of long-acting beta-agonists (Y/N)	8/6	8/6	1.00
Regular use of oral prednisolone (Y/N)	0/14	0/14	1.00
Use of montelukast (Y/N)	3/11	3/11	1.00
Use of omalizumab (Y/N)	0/14	0/14	1.00

Plus-minus values are means \pm SEM. BSM denotes bronchial smooth muscle, FeNO the fraction of nitric oxide in exhaled air, FEV₁ forced expiratory volume in 1 second, FVC forced vital capacity, ICS inhaled corticosteroid and PC₂₀ the provocative concentration of inhaled methacholine required to lower the FEV₁ by 20%. Early onset of asthma: < 12 years; Late onset of asthma: \geq 12 years. High eosinophil status: FeNO > 50 ppb or blood eosinophils > 0.3×10^9 /liter. Chronic airflow obstruction: FEV₁ measures persistently lower than 80% of predicted value. *P* values were calculated with the use of a two-sided independent t-test for variables with a parametric distribution, Fisher's exact test for comparison of proportions and the Mann-Whitney U test for comparison of nonparametric variables.

Table 2. Correlation between BSM area and multiple variables

Parameter	BSM area
Number of mitochondria / BSM area ($\times 10^7 / \text{mm}^2$)	0.72 (.0001)*
Score on Juniper Asthma Control Questionnaire	0.50 (.007)*
Number of exacerbations per 12 months	0.47 (.03)*
SABA use (puffs / week)	0.45 (.04)*

Data are Pearson correlation coefficient between bronchial smooth muscle (BSM) area and clinical variables or mitochondrial biogenesis (n = 28 non-severe asthmatics). SABA: Short acting beta-2 agonist. Numbers in parentheses are *P* values.

* *P* < 0.05

Table 3. Stepwise multiple linear regression analysis of BSM area for asthma control and mitochondrial biogenesis

	BSM area			
	r^2	β	SE	<i>P</i> value
Number of mitochondria / BSM area ($\times 10^7 / \text{mm}^2$)	0.55	7.17	1.15	0.0001
Score on Juniper ACQ at V1	0.14	0.60	0.27	0.04
Full model [†]	0.69	0.0001

Dependent variable is bronchial smooth muscle (BSM) area. Independent variables are the number of mitochondria and the initial Asthma Control Questionnaire (ACQ) score assessed at V1 ($n = 28$ non-severe asthmatics). β is the regression coefficient. SE is the standard error of β .

[†] For the full model, F ratio is 24.0, and the square root of the mean square error is 517.8 for BSM area. This model has been found to be the best in terms of r^2 , square root of the mean square error, and F ratio.

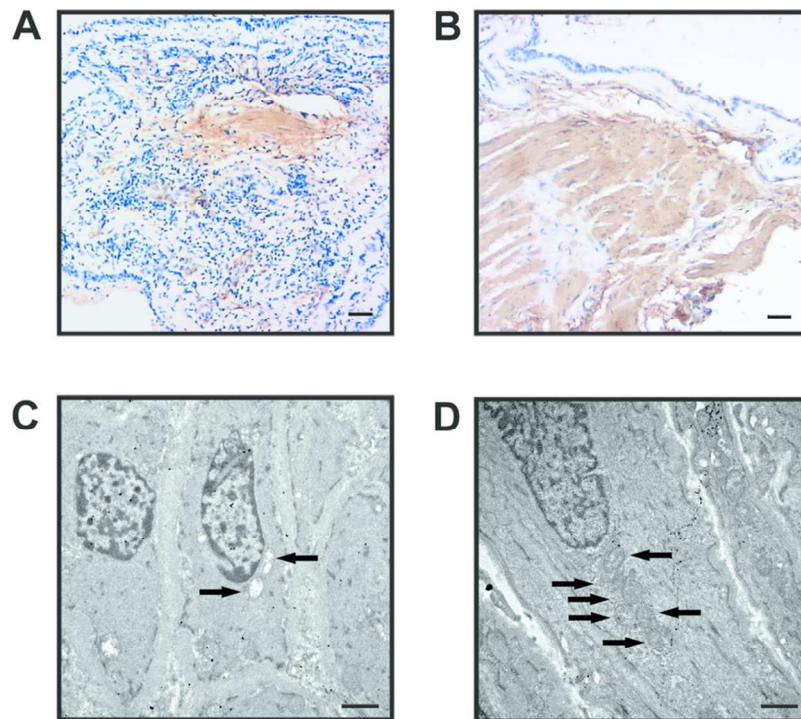


Figure 1
83x112mm (300 x 300 DPI)

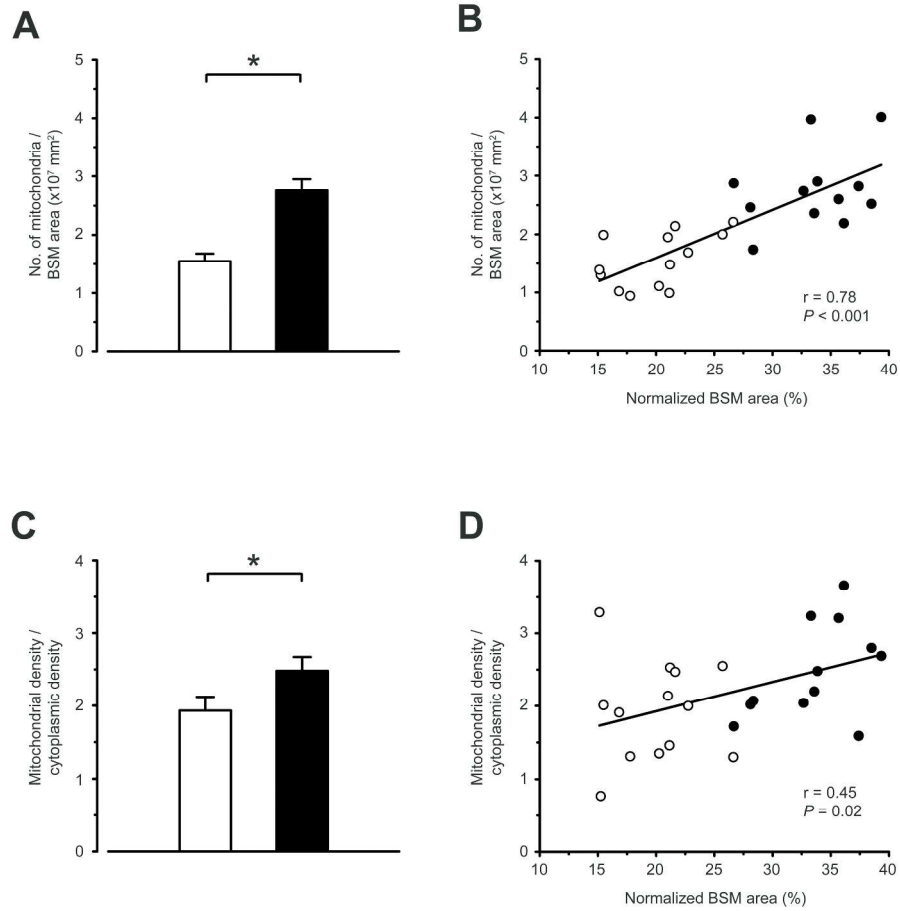


Figure 2
135x180mm (600 x 600 DPI)

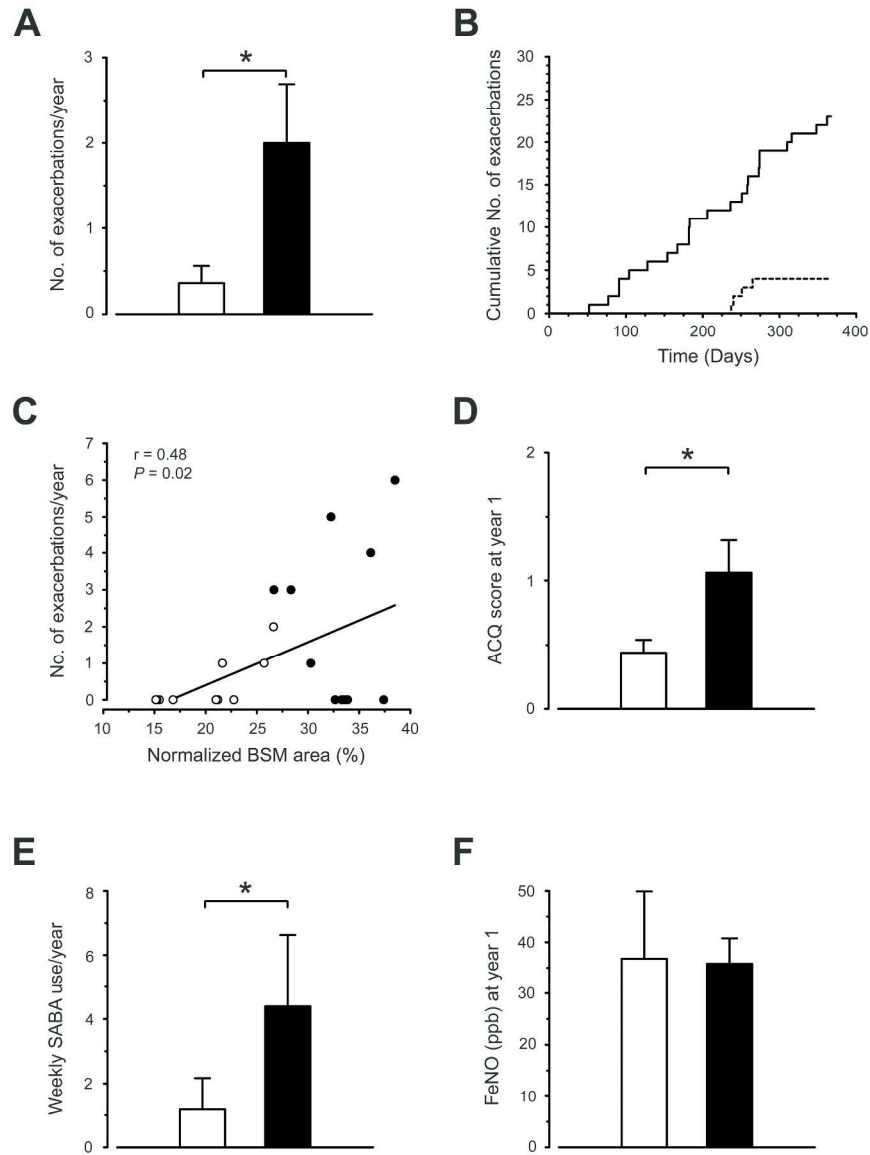


Figure 3
135x180mm (600 x 600 DPI)

Online Data Supplement

Bronchial smooth muscle remodeling in non-severe asthma

Pierre-Olivier Girodet, Benoit Allard, Matthieu Thumerel, Hugues Begueret, Isabelle Dupin, Olga Ousova, Régis Lassalle, Elise Maurat, Annaig Ozier, Thomas Trian, Roger Marthan and Patrick Berger

Corresponding author: Pr. Patrick Berger, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Phone: +33 5 57 57 16 94

Fax: +33 5 57 57 16 95

Email: patrick.berger@u-bordeaux.fr

Methods

“Mitasthme” trial

A total of 34 patients with non-severe asthma were recruited from the “Centre Hospitalier Universitaire” of Bordeaux, France (*see* Figure E1). The study received approval from the local ethics committee and has been registered under the N° NCT00808730 at ClinicalTrials.gov. The “Mitasthme” trial was conducted at the Clinical Investigation Centre of Bordeaux University Hospital. All clinical investigators, (*i.e.*, Pierre-Olivier Girodet, Annaig Ozier and Patrick Berger), are chest physicians. All subjects gave their written informed consent to participate to the study, after the nature of the procedure had been fully explained. Patients were enrolled using the following inclusion criteria. Patients, aged more than 18 years, must exhibit characteristic symptoms (wheezing, breathlessness) as well as bronchial hyperresponsiveness confirmed by either a significant improvement by more than 15 percent in the forced expiratory volume in one second (FEV₁) 10 minutes after the inhalation of 200 µg of salbutamol, or a provocative concentration of methacholine required to lower the FEV₁ by 20 percent (PC₂₀) of less than 4 mg/ml according to the American Thoracic Society criteria (E1). All patients were graded as non-severe asthmatics according to the Global Initiative for Asthma (GINA), *i.e.* GINA steps 1, 2 or 3 (E2). All patients must also be non-smokers or former smokers with less than 10 pack-years. Exclusion criterion was a recent bacterial or viral infection (less than 6 weeks). Three visits were scheduled: Visit 1 (inclusion), Visit 2 (bronchoscopy) and Visit 3 (12 months ± 7 days after visit 2). We collected, for all patients, age at onset of asthma, Juniper asthma control questionnaire (ACQ) score, spirometry, fractional exhaled nitric oxide (FeNO), serum total IgE and blood eosinophils assessed within the week before the fiberoptic bronchoscopy.

Twelve months after the bronchoscopy visit, the number of asthma exacerbations, as-needed bronchodilator use (short acting beta-2 agonist, SABA), ACQ score, respiratory function and airway inflammation were assessed.

Asthma exacerbations were defined as events of worsening asthma (E2) requiring a short course of oral or parenteral corticosteroids for 5 to 10 days. The year before and the year after bronchoscopy, we documented the occurrence of exacerbation similarly, using medical record. Subject verbal reports were not acceptable. Furthermore, at visit 1, patients enrolled in the study, had instructions to contact the investigator if any sign of worsening asthma occurred, *i.e.* progressive increase in shortness of breath, cough, wheezing or chest tightness or some combination of these symptoms. The year after bronchoscopy, 10 patients presented at least one exacerbation and 27 unscheduled visits were performed. The mean use per week of short acting beta-2 agonist (SABA) was assessed at visit 3 by the investigator based on subjects' declaration and data assessed during unscheduled visits.

COBRA cohort

We enrolled patients from a second cohort, in order to confirm the results when comparing eosinophilic vs. non-eosinophilic asthmatics or late vs. early onset asthmatics or high vs. low total IgE level. The French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) is the sponsor of the "COBRA" cohort ("Cohorte Obstruction Bronchique et Asthme"; *i.e.*, Bronchial Obstruction and Asthma Cohort). Patients from the "COBRA" cohort were followed prospectively in the same institution by the same investigators (*i.e.*, Pierre-Olivier Girodet, Annaig Ozier and Patrick Berger) as the "Mitasthme" trial.

Fifty-six non-severe asthmatic patients were recruited from the "COBRA" cohort, using the same inclusion criteria as the "Mitasthme" trial. Non-severe asthma patients from both the "Mitasthme" trial and the "COBRA" cohort were classified according to (i) their age of

asthma onset: Early (< 12 years) vs. late onset (≥ 12 years); (ii) their asthma phenotype: non-eosinophilic ($\text{FeNO} \leq 50$ ppb or blood eosinophils $\leq 0.3 \times 10^9/\text{liter}$) vs. eosinophilic asthma ($\text{FeNO} > 50$ ppb or blood eosinophils $> 0.3 \times 10^9/\text{liter}$); or (iii) their serum total IgE level: low (total IgE ≤ 214 IU/mL) vs. high level (total IgE > 214 IU/mL).

Nineteen severe asthmatics were also recruited from this “COBRA” cohort. Severe asthma was diagnosed using American Thoracic Society criteria (E3). At least one major criterion and at least two minor criteria must be fulfilled.

Major criteria:

1. Treatment with continuous or near continuous ($\geq 50\%$ of year) oral corticosteroids.
2. Requirement for treatment with high-dose inhaled corticosteroids (> 1260 $\mu\text{g}/\text{d}$ beclomethasone dipropionate or equivalent).

Minor criteria:

1. Requirement for daily treatment with a controller medication in addition to inhaled corticosteroids, e.g., long-acting beta2-agonist, theophylline, or leukotriene antagonist.
2. Asthma symptoms requiring short-acting beta2-agonist use on a daily or near daily basis.
3. Persistent airway obstruction ($\text{FEV}_1 < 80\%$ predicted; diurnal PEF variability $> 20\%$).
4. One or more urgent care visits for asthma per year.
5. Three or more oral steroid “bursts” per year.
6. Prompt deterioration with $\leq 25\%$ reduction in oral or inhaled corticosteroid dose.
7. Near fatal asthma event in the past.

Bronchoscopy

Bronchial specimens from asthmatics were obtained by fiberoptic bronchoscopy. Fiberoptic bronchoscopy was performed after anesthesia of the upper airways was achieved with lidocaine 10% spray. The fiberoptic bronchoscope (Pentax BF 15V, Argenteuil, France) was introduced and biopsies were taken from 3 bronchial carinae from the middle lobe. Specimens were immediately transferred to the laboratory in sterile container containing Dulbecco's Modified Eagles Medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). All the biopsies have been performed by the same investigator (*i.e.*, Matthieu Thumerel) in both non-severe asthmatics from the "Mitasthme" trial and severe asthmatics from the "COBRA" cohort. We did not perform bronchoscopy within the non-severe asthmatic patients from the "COBRA" cohort.

Optic microscopy and immunohistochemistry

Bronchial specimens were fixed in 10% buffered formalin and processed in standard fashion for paraffin embedding as described previously (E4, E5). Sections, 3- μ m thick, were cut and stained with hematoxylin-eosin-safran or processed for immunohistochemistry. After deparaffinization and rehydratation through graded alcohols, endogenous peroxidase was inhibited using a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide (both from Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) for 30 min, followed by 2 rinses in phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen). Nonspecific staining was blocked using 10% bovine serum albumin (BSA, Dako, Trappes, France) for 30 min. Sections were incubated for 2h at room temperature with mouse anti-human smooth muscle actin (clone 1A4) or the unrelated mouse antibody (both from Sigma-Aldrich). After rinsing in PBS, biotinylated rabbit anti-mouse F(ab')₂ (Dako) was applied to the sections for 2h, and followed by the

streptavidin-biotin horseradish-peroxidase complex (Dako) for a further 2h period. After rinsing in PBS, 1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako) plus 0.02% hydrogen peroxide for 6 min were used as substrate to develop a peroxide-dependent brown color reaction at room temperature. Finally, the sections were rinsed and counterstained with Mayer's hematoxylin. The total area of BSM layer was assessed, manually in a blinded fashion using Quancoul[®] software at a magnification of x100 as described previously (E4, E6-8). This BSM area was normalized to the whole area of the corresponding tissues and presented as percentages of whole area as described previously (E9). For each patient, 3 biopsies were collected and the BSM was analyzed in 6 to 8 sections in each biopsy.

Electron microscopy

Specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Epon as described previously (E10). For each specimen, semi-thin sections (1 μ m-thick) were cut and stained with alkaline toluidine blue. We selected the first semi-thin section large enough to span from the epithelium to the muscular layer. Five ultrathin serial sections (60 nm-thick) were then cut on diamond knives. Four of these latter sections were subsequently randomly selected and placed on grids. Staining was performed with uracile acetate and lead citrate. Grids were then scanned by transmission electron microscopy (EM, Tecnai 12, Philips) and examined by a pathologist from left to right and from top to bottom to locate every whole nucleated BSM. Each ultrathin section was examined in its entirety. To evaluate the number of mitochondria, computerized photographs and measurements were performed in a blinded fashion by using Scanview software (Soft Imaging System) at a standard magnification of \times 4200. Mitochondrial densities were quantified using ImageJ 1.42q free software.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with NCSS software (NCSS 2001; NCSS Statistical Software, Kaysville, UT). Clinical investigators were blinded to smooth muscle and mitochondria results until the last visit of the last patient. Clinical investigators (*i.e.*, Pierre-Olivier Girodet, Annaig Ozier and Patrick Berger) collected and verified clinical data, whereas a pathologist (*i.e.*, Hugues Begueret) analyzed microscopic data. The Methodology and Data management Centre of the sponsor (CHU de Bordeaux) collected all outcomes data and performed data monitoring. An independent statistician (*i.e.*, Régis Lassalle) performed statistical analysis on anonymized data.

Regarding the data obtained from the “Mitasthme” trial, patients were divided in “low BSM” group and “high BSM” group using the median BSM normalized area of the study population. Comparisons between the 2 groups were performed by means of two-sided independent t tests for variables with a parametric distribution, Fisher’s exact test for comparison of proportions or Mann-Whitney U test for comparison of nonparametric variables. Exacerbation frequency was calculated and compared between the study groups with the use of a negative binomial model, as previously described (E9). Pearson correlation matrix was built. Stepwise multiple linear regressions were performed to determine the parameters that significantly influenced BSM area. As independent variables, we selected the ones that influenced the dependent variable according to the univariate analysis (P values < 0.05). Amongst all clinical, functional and mitochondrial parameters, we chose those assessed at the time of bronchoscopy or before, best correlated to the dependent variable and without cross correlations in order to limit multicollinearity.

Comparisons between data obtained in the “Mitasthme” trial and those from the COBRA cohort are considered as *post hoc* analyses. P values for multiple comparisons were calculated by means of Kruskal-Wallis tests, with the use of multiple-comparisons z-tests. When comparing 2 populations, we performed two-sided independent t-tests for variables with a parametric distribution, Fisher’s exact tests for comparison of proportions and the Mann–Whitney U tests for comparison of nonparametric variables.

Values are presented as mean \pm SEM. Results were considered significant at a *P* value of less than .05.

References for online supplement

- E1. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, Cockcroft DW, Fish JE, Sterk PJ. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS board of directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309-329.
- E2. Global strategy for asthma management and prevention, global initiative for asthma (GINA). 2012; Available from: <http://www.ginasthma.org>.
- E3. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: Current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-2351.
- E4. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;204:3173-3181.
- E5. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, Thumerel M, Ousova O, Kolbeck R, Coyle AJ, Woods J, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Role of γ -H2AX in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:715-722.
- E6. Berger P, Compton SJ, Molimard M, Walls AF, N'Guyen C, Marthan R, Tunon-De-Lara JM. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 1999;29:804-812.

- E7. Berger P, Girodet PO, Begueret H, Ousova O, Perng DW, Marthan R, Walls AF, Tunon de Lara JM. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *FASEB J* 2003;17:2139-2141.
- E8. El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006;176:1860-1868.
- E9. Girodet PO, Dournes G, Thumerel M, Begueret H, Dos Santos P, Ozier A, Dupin I, Trian T, Montaudon M, Laurent F, Marthan R, Berger P. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:876-883.
- E10. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 2007;62:8-15.

Supplemental figures legends

Figure E1. Schematic representation of the study design

ECG: Electrocardiogram; MCT: Methacholine challenge test.

Figure E2. Impact of age of onset disease in non-severe asthma

Non-severe asthma patients from the “Mitasthme” trial (n = 24) and the “COBRA” cohort (n = 56) were classified according to their age of asthma onset: Early (< 12 years; white bars; n = 13 in “Mitasthme” trial; n = 27 in “COBRA” cohort) vs. late (\geq 12 years: grey bars; n = 11 in “Mitasthme” trial; n = 29 in “COBRA” cohort) onset of asthma. At year 1 after asthma phenotype characterization, exacerbations frequency (A), asthma control (B), as-needed bronchodilator use (C) and airway inflammation (D) are determined. Short acting beta-2 agonist (SABA) use is expressed as the mean number of puffs per week for 12 months. ACQ: Juniper Asthma Control Questionnaire. FeNO: Fractional exhaled nitric oxide. The term ppb denotes parts per billion. Data are the mean \pm SEM. No significant results were found using multiple comparisons by means of Kruskal-Wallis tests, with multiple-comparisons z-tests.

Figure E3. Impact of eosinophilic phenotype in non-severe asthma

Non-severe asthma patients from the “Mitasthme” trial (n = 24) and the “COBRA” cohort (n = 56) were classified according to their asthma phenotype: non-eosinophilic (hatched bars; n = 12 in “Mitasthme” trial; n = 22 in “COBRA” cohort) vs. eosinophilic (double-hatched bars; n = 12 in “Mitasthme” trial; n = 34 in “COBRA” cohort) asthma. Eosinophilic asthma is defined as FeNO > 50 ppb or blood eosinophils > 0.3×10^9 /liter. At year 1 after asthma

phenotype characterization, exacerbations frequency (**A**), asthma control (**B**), as-needed bronchodilator use (**C**) and airway inflammation (**D**) are determined. Short acting beta-2 agonist (SABA) use is expressed as the mean number of puffs per week for 12 months. ACQ: Juniper Asthma Control Questionnaire. FeNO: Fractional exhaled nitric oxide. The term ppb denotes parts per billion. Data are the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$ using multiple comparisons by means of Kruskal-Wallis tests, with multiple-comparisons z-tests.

Figure E4. Impact of total serum IgE level in non-severe asthma

Non-severe asthma patients from the “Mitasthme” trial ($n = 24$) and the “COBRA” cohort ($n = 56$) were classified according to their serum total IgE level: low level (total IgE ≤ 214 IU/mL; grey hatched bars; $n = 14$ in “Mitasthme” trial; $n = 36$ in “COBRA” cohort) vs. high level (total IgE > 214 IU/mL; grey double-hatched bars; $n = 10$ in “Mitasthme” trial; $n = 20$ in “COBRA” cohort). At year 1 after asthma phenotype characterization, exacerbations frequency (**A**), asthma control (**B**), as-needed bronchodilator use (**C**) and airway inflammation (**D**) are determined. Short acting beta-2 agonist (SABA) use is expressed as the mean number of puffs per week for 12 months. ACQ: Juniper Asthma Control Questionnaire. FeNO: Fractional exhaled nitric oxide. The term ppb denotes parts per billion. Data are the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$ using multiple comparisons by means of Kruskal-Wallis tests, with multiple-comparisons z-tests.

Supplemental tables

Table E1. Time and events table

Visits	1	2	3
Weeks	-1	0	52 ± 1
Written informed consent	Y		
Subject demography	Y		
Medical history	Y		
Asthma and exacerbation history	Y	Y	
Therapy history	Y	Y	
Smoking history	Y		
Inclusion/Exclusion criteria	Y		
Concomitant medication assessment	Y	Y	Y
Physical examination	Y	Y	Y
Vital signs	Y	Y	Y
Body plethysmography	Y		
Methacholine challenge test	Y		
Allergy skin prick tests	Y		
Chest X-ray	Y		
Arterial blood gas	Y		
12 lead ECG	Y		
β-hCG (blood pregnancy test)	Y		
Hepatitis B and C tests	Y		
HIV test	Y		
Exacerbation review	Y	Y	Y
Dispense diary		Y	
Juniper ACQ		Y	Y
Spirometry including FEV ₁ , FEF ₂₅₋₇₅ , FVC		Y	Y
FeNO measurement		Y	Y
Hematology	Y		Y
Serum total IgE	Y		
Bronchoscopy		Y	
Review diary (SABA use)			Y
Adverse events	Y	Y	Y
Serious adverse events	Y	Y	Y

Abbreviations: ACQ: asthma control questionnaire; ECG: electrocardiogram; FEF₂₅₋₇₅: forced expiratory flow at 25 to 75 percent of FVC; FeNO: fractional exhaled nitric oxide; FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; hCG: human chorionic gonadotropin; SABA: short acting beta-2 agonist.

Table E2. Comparison of baseline characteristics and bronchial smooth muscle remodeling outcomes in non-severe and severe asthmatics

	Non-severe asthma Mitasthme	Severe asthma COBRA	P values
N	28	19	
Age (yr)	33.4 ± 2.6	55.4 ± 3.3	0.0001
Sex (M/F)	11/17	2/17	0.05
Score on Juniper Asthma Control Questionnaire	0.6 ± 0.1	2.1 ± 0.3	0.0001
Age at onset of symptoms (Early/late) (yr)	18/10 11.7 ± 2.4	6/13 19.4 ± 3.2	0.04 0.02
Asthma duration (yr)	22.4 ± 2.4	35.9 ± 4.8	0.02
Atopic status (Y/N)	23/5	10/9	0.05
Total IgE (U/ml)	683 ± 314	536 ± 299	0.27
High eosinophil status (Y/N)	14/14	12/7	0.55
Blood eosinophil count (×10 ⁹ /liter)	0.25 ± 0.03	0.27 ± 0.06	0.55
FeNO (ppb)	36.7 ± 5.8	27.8 ± 5.5	0.25
Chronic airflow obstruction (Y/N)	0/28	8/11	0.0002
Prebronchodilator FEV ₁ (% of pred. value)	93.1 ± 2.5	74.2 ± 5.3	0.003
FEV ₁ :FVC ratio (%)	77.1 ± 1.3	65.9 ± 3.0	0.002
Obesity (Y/N)	2/26	5/14	0.10
Body-mass index (kg/m ²)	24.4 ± 1.2	26.9 ± 1.2	0.03
Smoking status			
Current smoker (Y/N)	0/28	0/19	1.00
Ex-smoker (Y/N)	0/28	3/16	0.06
Pack-years (no.)	0	0.8 ± 0.4	0.88
Frequent exacerbations > 2/yr (Y/N)	0/28	7/12	0.0008
Severe exacerbations per subject in previous year (no.)	0.1 ± 0.1	2.7 ± 0.7	0.0001
Treatment			
Dose of ICS - beclomethasone equivalent (µg/day)	759 ± 121	2868 ± 397	0.0001
Use of long-acting beta-agonists (Y/N)	16/12	18/1	0.007
Regular use of oral prednisolone (Y/N)	0/28	7/12	0.0008
Use of montelukast (Y/N)	6/22	7/12	0.32
Use of omalizumab (Y/N)	0/28	6/13	0.003
Bronchial smooth muscle remodeling			
BSM area (%)	26.8 ± 1.4	35.3 ± 2.0	0.005
Number of mitochondria / BSM area (x10 ⁷ / mm ²)	2.1 ± 0.2	3.8 ± 0.3	0.0001

Plus-minus values are means ± SEM. Early onset of asthma: < 12 years; Late onset of asthma: ≥ 12 years. High eosinophil status: FeNO > 50 ppb or blood eosinophils > 0.3 x10⁹/liter. Chronic airflow

obstruction: FEV₁ measures persistently lower than 80% of predicted value. BSM denotes bronchial smooth muscle, FeNO the fraction of nitric oxide in exhaled air, FEV₁ forced expiratory volume in 1 second, FVC forced vital capacity, ICS inhaled corticosteroid and PC₂₀ the provocative concentration of inhaled methacholine required to lower the FEV₁ by 20%. *P* values were calculated with the use of a two-sided independent t-test for variables with a parametric distribution, Fisher's exact test for comparison of proportions and the Mann–Whitney U test for comparison of nonparametric variables.

Table E3. Baseline characteristics of non-severe asthmatics from the COBRA cohort

N	56
Age (yr)	44.1 ± 2.3
Sex (M/F)	15/41
Score on Juniper Asthma Control Questionnaire	0.6 ± 0.1
Age at onset of symptoms (Early/late) (yr)	27/29 20.4 ± 2.7
Asthma duration (yr)	23.6 ± 2.1
Atopic status (Y/N)	45/11
Total IgE (U/ml)	289 ± 66
High eosinophil status (Y/N)	34/22
Blood eosinophil count ($\times 10^9$ /liter)	0.23 ± 0.03
FeNO (ppb)	31.4 ± 3.8
Chronic airflow obstruction (Y/N)	0/56
Prebronchodilator FEV ₁ (% of pred. value)	98.8 ± 1.9
FEV ₁ :FVC ratio (%)	80.0 ± 1.4
PC ₂₀ for methacholine (mg)	1.9 ± 0.7
Obesity (Y/N)	6/50
Body-mass index (kg/m ²)	24.7 ± 0.7
Smoking status	
Current smoker (Y/N)	0/56
Ex-smoker (Y/N)	0/56
Pack-years (no.)	0
Frequent exacerbations > 2/yr (Y/N)	2/54
Severe exacerbations per subject in previous year (no.)	0.4 ± 0.1
Treatment	
Dose of ICS - beclomethasone equivalent (μ g/day)	757 ± 128
Use of long-acting beta-agonists (Y/N)	26/30
Regular use of oral prednisolone (Y/N)	0/56
Use of montelukast (Y/N)	9/47
Use of omalizumab (Y/N)	0/56

Plus-minus values are means ± SEM. Early onset of asthma: < 12 years; Late onset of asthma: ≥ 12 years. High eosinophil status: FeNO > 50 ppb or blood eosinophils > 0.3 $\times 10^9$ /liter. Chronic airflow obstruction: FEV₁ measures persistently lower than 80% of predicted value. FeNO: fraction of nitric oxide in exhaled air; FEV₁: forced expiratory volume in 1 second; FVC: forced vital capacity; ICS: inhaled corticosteroid; PC₂₀: provocative concentration of inhaled methacholine required to lower the FEV₁ by 20%.

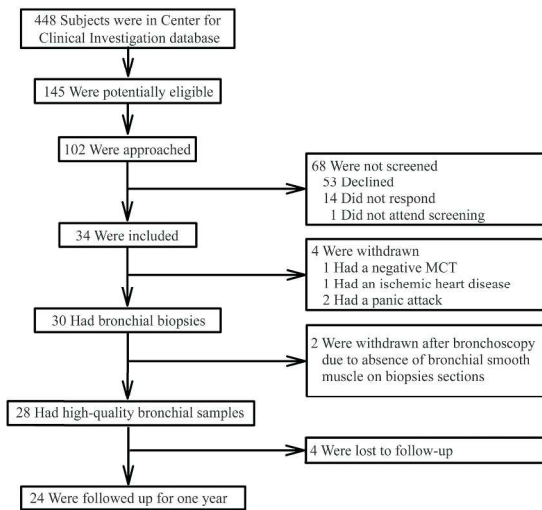


Figure E1
135x180mm (600 x 600 DPI)

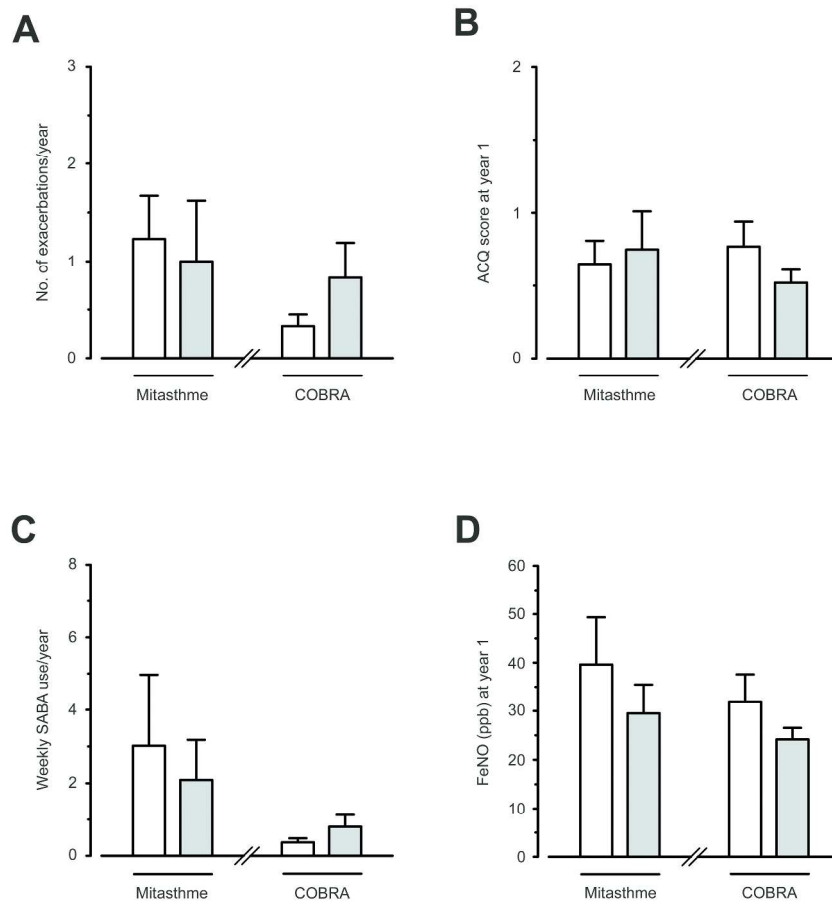


Figure E2
135x180mm (600 x 600 DPI)

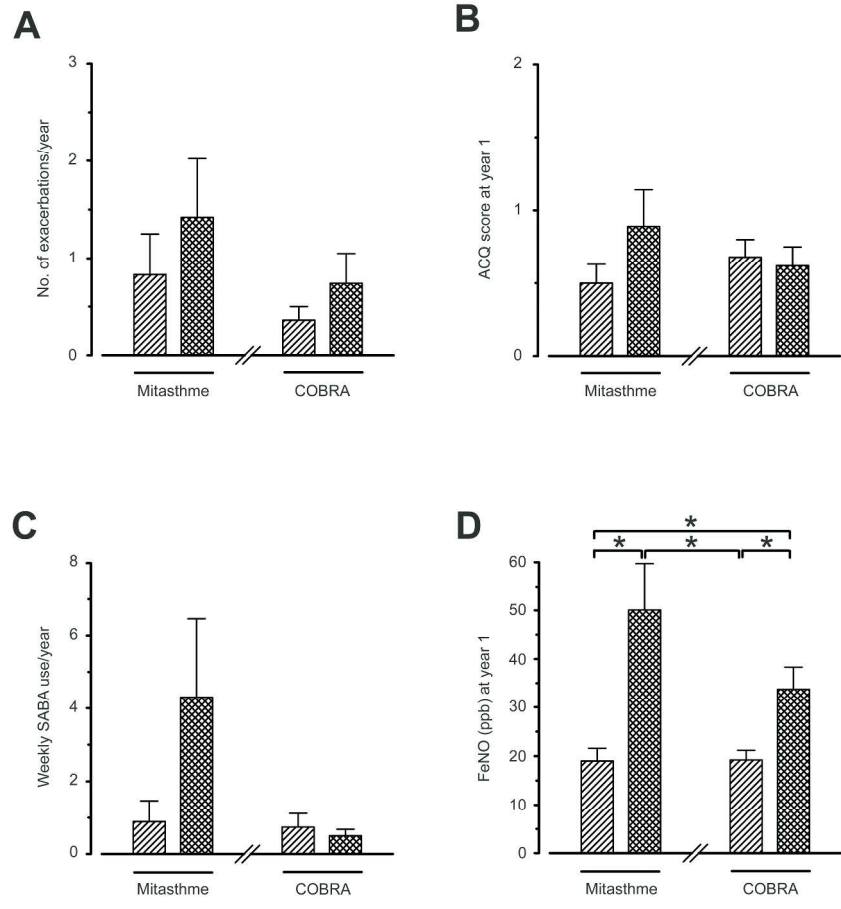


Figure E3
135x180mm (600 x 600 DPI)

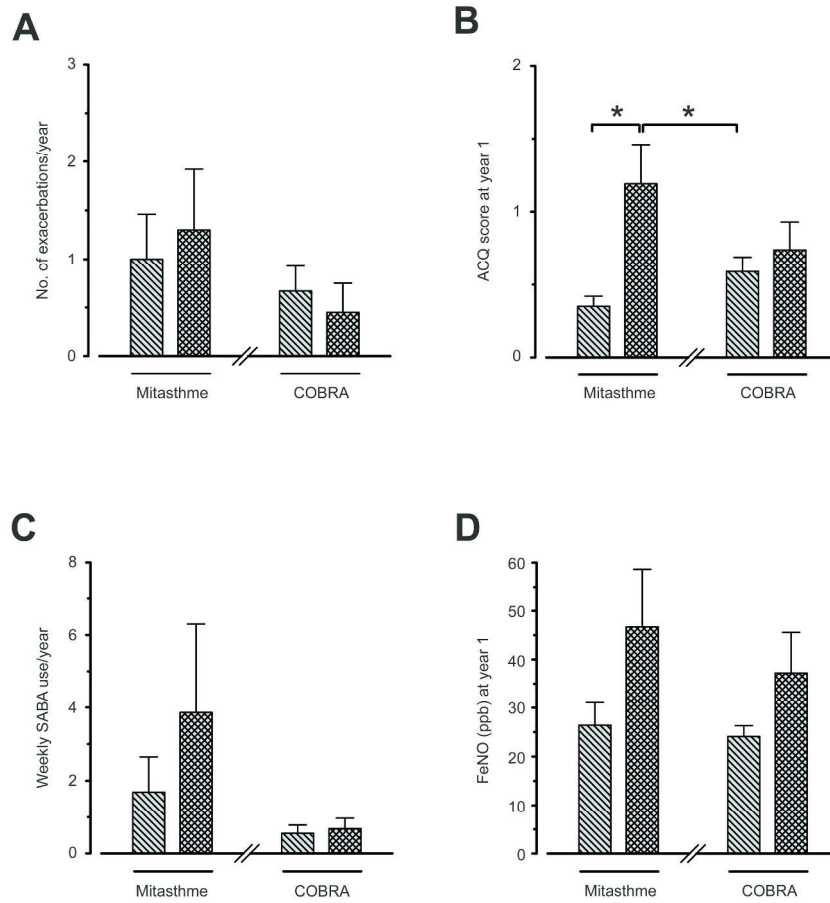


Figure E4
135x180mm (600 x 600 DPI)

L'étude Mit'asthme permet de faire ressortir un phénotype de patients asthmatiques non sévères à « muscle lisse augmenté » qui diffère des autres patients asthmatiques par le risque accru d'exacerbations et le moins bon contrôle de l'asthme. De plus, comme chez l'asthmatique sévère, les mitochondries semblent jouer un rôle clé. Cependant, des études in vitro sont nécessaires pour confirmer le rôle de la signalisation calcique dans l'excès de biogenèse mitochondriale.

Ce phénotype à « muscle lisse augmenté » mériterait donc d'être dépisté pour engager une réponse thérapeutique adaptée (thermoplastie bronchique? inhibiteur calcique ?). Il apparaît donc important de poursuivre sur cette voie d'étude du muscle lisse bronchique aussi bien au niveau fondamental qu'aux niveaux diagnostique (endoscopie, autre) et thérapeutique (thermoplastie, inhibiteur calcique...).

IV Perspectives

IV-A BPCO et Fibrocyte

Le premier objectif est la finalisation de l'étude Fibrochir sous au moins deux axes:

- l'étude des fibrocytes péribronchiques pour répondre à l'objectif primaire et parfaire l'étude fondamentale entre les fibrocytes sanguins et pulmonaires chez le patient BPCO à l'état stable. Une analyse immunohistochimique avec un double marquage CD34 et CD45 est en élaboration. L'identification de cellules doublement positives permettrait un compte des fibrocytes (CD34+ propre aux fibrocytes, CD45+ sur les fibrocytes et macrophages). Cependant, il s'agit d'un double marquage membranaire qui, là aussi, pourrait poser un problème de lisibilité (rouge sur marron). Comme l'indique l'article de Lei et coll(132) qui a étudié le double marquage CD45/ α SMA, il semble que la technique en immunofluorescence soit la plus efficace pour le dépistage des fibrocytes sur des coupes de cœur en paraffine atteint de cardiopathie ischémique. Les coupes en immunohistochimie ou la co-localisation immunohistochimie et immunofluorescence semblent produire un grand nombre de faux positifs. De plus, l'infiltration pulmonaire des fibrocytes dans la BPCO à l'état stable ou en exacerbation est complètement non-explorée. Les prélèvements pulmonaires réalisés dans Fibrochir devraient permettre cette exploration à la fois en distalité sur le parenchyme pulmonaire mais aussi autour de bronches segmentaires, sur des conditionnements en paraffine et congelé.

- l'étude de la prédiction du VEMS postopératoire de patients opérés de résection pulmonaire néoplasique (la majorité dans l'étude Fibrochir) en fonction du scanner préopératoire. Certaines études(134)(135) ont recherché la technique la plus précise de prédiction du VEMS post-opératoire en comparant la valeur de VEMS mesurée en postopératoire à une valeur prédite par des paramètres divers : nombre de lobe(s) réséqué(s), de segment(s) réséqué(s), densité pulmonaire, emphysème (LAA%)... Les paramètres parenchymateux tomodensitométriques semblent utiles et meilleurs que les techniques classiques(136)(137) pour la prédiction du VEMS postopératoire de patient à la limite de la contre-indication fonctionnelle respiratoire. Les logiciels de mesures de paroi bronchique et de vascularisation pulmonaire utilisés dans Fibrochir vont permettre d'étudier la prédiction du VEMS postopératoire avec de nouveaux paramètres jamais explorés. Par ailleurs, l'étude de l'évolution du VEMS et de questionnaires respiratoires à un an en comparant trois groupes opérés sous thoracoscopie pour les résections néoplasiques est aussi novatrice.

D'autres études fondamentales sur le recrutement des fibrocytes et leur régulation notamment en période d'exacerbation seront nécessaires. On pourrait s'aider de prélèvements réalisés sous fibroscopie (souvent réalisée pour prélèvement bactériologique) pour dosage de fibrocytes, de cytokine (CXCL12 et autres) dans le LBA et la réalisation de biopsie bronchique (sous réserve d'une analyse en IHC ou immunofluorescence correcte).

IV-B Asthme et remodelage bronchique

Deux axes sont privilégiés :

- l'étude des effets du Gallopamil sur les exacerbations de patient asthmatique sévère sur une grande cohorte et une durée de 18 mois.

- Endoscopiquement, le développement de techniques diagnostiques d'évaluation bronchique de patient asthmatique ou autre (OCT, broncho-aspiration) et/ou le développement de techniques thérapeutiques (thermoplastie bronchique) et leur évaluation fondamentale sont à mettre en oeuvre. Développée depuis 2004(138), la thermoplastie bronchique ne s'est que récemment déployée en France(139). Les essais cliniques internationaux « AIR 1(115) » et « RISA(140) » ont montré, après thermoplastie bronchique, une absence d'effets indésirables majeurs, une amélioration des questionnaires de control (ACQ) et de qualité de vie de l'asthme (AQLQ) et une réduction des exacerbations. L'essai « AIR 2(141) », en double aveugle, a montré dans le groupe thermoplastie une réduction de 32% des exacerbations, de 84% des entrées aux urgences, de 66% de l'absentéisme au travail/scolaire. Le suivi à 5 ans montre une continuité des bénéfices observés à long terme(142). La thermoplastie est donc indiquée en cas de patient asthmatique sélectionné présentant un asthme non contrôlé sous traitement optimal (grade B)(143). Pour autant, l'évaluation fondamentale des mécanismes qui sous-tendent l'amélioration observée après thermoplastie reste à explorer : réduction de taille du muscle lisse variable, autres modifications biologiques, cellulaires ou architecturales. L'exploration de nouveaux marqueurs sanguins, bronchiques, d'expectoration ou d'imagerie (TDM, IRM, OCT) pour l'évaluation de la réponse thérapeutique est utile. Il reste à définir le patient à priori répondeur à la thermoplastie.

Bibliographie

1. Drazen JM, Postma DS, Rabe KF. The Asthma–COPD Overlap Syndrome. *N Engl J Med*. 2015 Sep 24;373(13):1241–9.
2. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):350–62.
3. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Lond Engl*. 2004 Aug 21;364(9435):709–21.
4. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gaudie J, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Apr 1;179(7):588–94.
5. Andersson-Sjöland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramírez R, Pardo A, et al. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2129–40.
6. Saunders R, Siddiqui S, Kaur D, Doe C, Sutcliffe A, Hollins F, et al. Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Feb;123(2):376–84.
7. Yeager ME, Nguyen CM, Belchenko DD, Colvin KL, Takatsuki S, Ivy DD, et al. Circulating fibrocytes are increased in children and young adults with pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2012 Jan;39(1):104–11.
8. LaPar DJ, Burdick MD, Emamina A, Harris DA, Strieter BA, Liu L, et al. Circulating fibrocytes correlate with bronchiolitis obliterans syndrome development after lung transplantation: a novel clinical biomarker. *Ann Thorac Surg*. 2011 Aug;92(2):470–7; discussion 477.
9. Andersson-Sjöland A, Erjefält JS, Bjermer L, Eriksson L, Westergren-Thorsson G. Fibrocytes are associated with vascular and parenchymal remodelling in patients with obliterative bronchiolitis. *Respir Res*. 2009;10:103.
10. www.ginasthma.org/local/uploads/files/ACOS_2015.pdf.
11. Divo M, Cote C, de Torres JP, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, et al. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jul 15;186(2):155–61.
12. Lange P, Marott JL, Vestbo J, Olsen KR, Ingebrigtsen TS, Dahl M, et al. Prediction of the clinical course of chronic obstructive pulmonary disease, using the new GOLD classification: a study of the general population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 15;186(10):975–81.
13. Société de Pneumologie de langue Française. BPCO Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive. Guide à l’usage des patient.
14. Actualisation des recommandations de la SPLF pour la prise en charge de la BPCO. Points essentiels. *Rev Mal Respir* 2010;
15. Davey C, Zoumot Z, Jordan S, McNulty WH, Carr DH, Hind MD, et al. Bronchoscopic lung volume reduction with endobronchial valves for patients with heterogeneous emphysema and intact interlobar fissures (the BeLieVeR-HiFi study): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2015 Sep 12;386(9998):1066–73.
16. Patients at High Risk of Death after Lung-Volume–Reduction Surgery. *N Engl J Med*. 2001 Oct 11;345(15):1075–83.
17. Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jun;11(6):427–35.
18. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med Camb Mass*. 1994 Nov;1(1):71–81.
19. Cowper SE, Su LD, Bhawan J, Robin HS, LeBoit PE. Nephrogenic fibrosing dermatopathy. *Am J Dermatopathol*. 2001 Oct;23(5):383–93.

20. Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6307–12.
21. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Jan 1;160(1):419–25.
22. Quan TE, Cowper S, Wu S-P, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):598–606.
23. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 5;324(1):276–80.
24. Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Brigham KL, Moss M. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Oct 1;172(7):854–60.
25. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Jun 15;166(12):7556–62.
26. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Jul 1;171(1):380–9.
27. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr;157(4 Pt 1):1301–15.
28. Lama VN, Phan SH. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jun;3(4):373–6.
29. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(2):213–7.
30. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Aug;43(2):161–72.
31. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):438–46.
32. Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):521–6.
33. Katzenstein A-LA, Mukhopadhyay S, Zanardi C, Dexter E. Clinically occult interstitial fibrosis in smokers: classification and significance of a surprisingly common finding in lobectomy specimens. *Hum Pathol*. 2010 Mar;41(3):316–25.
34. Wang C-H, Huang C-D, Lin H-C, Huang T-T, Lee K-Y, Lo Y-L, et al. Increased activation of fibrocytes in patients with chronic obstructive asthma through an epidermal growth factor receptor-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1367–76.
35. Freeman CM, Martinez CH, Todt JC, Martinez FJ, Han MK, Thompson DL, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are associated with decreased CD4+ & CD8+ T cells and increased growth & differentiation factor-15 (GDF-15) in peripheral blood. *Respir Res [Internet]*. 2015 Dec [cited 2015 Nov 1];16(1). Available from: <http://respiratory-research.com/content/16/1/94>
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*. 2004 Jun 24;350(26):2645–53.
37. Linder R, Rönmark E, Pourazar J, Behndig A, Blomberg A, Lindberg A. Serum

- metalloproteinase-9 is related to COPD severity and symptoms - cross-sectional data from a population based cohort-study. *Respir Res.* 2015;16(1):28.
38. Herzog EL, Bucala R. Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol.* 2010 Jul;38(7):548–56.
 39. Trimble A, Gochuico BR, Markello TC, Fischer R, Gahl WA, Lee JK, et al. Circulating fibrocytes as biomarker of prognosis in Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Dec 15;190(12):1395–401.
 40. Borie R, Quesnel C, Phin S, Debray M-P, Marchal-Somme J, Tiev K, et al. Detection of alveolar fibrocytes in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *PLoS One.* 2013;8(1):e53736.
 41. Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Feb 2;353(1):104–8.
 42. Moore BB, Murray L, Das A, Wilke CA, Herrygers AB, Toews GB. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Aug;35(2):175–81.
 43. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, et al. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 α . *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):22473–81.
 44. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med.* 2003 Nov 3;198(9):1391–402.
 45. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature.* 2003 Sep 18;425(6955):307–11.
 46. Mehrad B, Burdick MD, Strieter RM. Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Sep;41(8-9):1708–18.
 47. Strieter RM, Keeley EC, Hughes MA, Burdick MD, Mehrad B. The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1111–8.
 48. Wang C-H, Punde TH, Huang C-D, Chou P-C, Huang T-T, Wu W-H, et al. Fibrocyte trafficking in patients with chronic obstructive asthma and during an acute asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1154–62.e1–5.
 49. Nihlberg K, Larsen K, Hultgårdh-Nilsson A, Malmström A, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res.* 2006;7:50.
 50. Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):549–56.
 51. Wang C-H, Huang C-D, Lin H-C, Lee K-Y, Lin S-M, Liu C-Y, et al. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Sep 15;178(6):583–91.
 52. Lo C-Y, Michaeloudes C, Bhavsar PK, Huang C-D, Wang C-H, Kuo H-P, et al. Increased phenotypic differentiation and reduced corticosteroid sensitivity of fibrocytes in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1186–95.e1–6.
 53. Weng C-M, Chen B-C, Wang C-H, Feng P-H, Lee M-J, Huang C-D, et al. The endothelin A receptor mediates fibrocyte differentiation in chronic obstructive asthma. The involvement of connective tissue growth factor. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Aug 1;188(3):298–308.
 54. Barnes PJ. Emerging pharmacotherapies for COPD. *Chest.* 2008

Dec;134(6):1278–86.

55. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469–78.
56. Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. *Eur Respir J*. 2002 Jan;19(1):61–7.
57. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):309–29.
58. Popa V. ATS guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan;163(1):292–3.
59. GINA, Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. 1995.
60. Humbert M, Tonnel AB. [Anti IgE antibodies for the treatment of difficult asthma]. *Rev Mal Respir*. 2005 Dec;22(6 Pt 1):983–90.
61. Wechsler ME, Laviolette M, Rubin AS, Fiterman J, Lapa e Silva JR, Shah PL, et al. Bronchial thermoplasty: Long-term safety and effectiveness in patients with severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Dec;132(6):1295–302.
62. Chanez P, Boulet L-P, Brillet P-Y, Joos G, Laviolette M, Louis R, et al. [Bronchial thermoplasty in the treatment of severe adult asthma]. *Rev Mal Respir*. 2015 Feb;32(2):97–109.
63. Peters SP, Jones CA, Haselkorn T, Mink DR, Valacer DJ, Weiss ST. Real-world Evaluation of Asthma Control and Treatment (REACT): findings from a national Web-based survey. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jun;119(6):1454–61.
64. Roth M, Johnson PRA, Borger P, Bihl MP, Rüdiger JJ, King GG, et al. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med*. 2004 Aug 5;351(6):560–74.
65. Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 May 1;6(3):301–5.
66. Payne DNR, Rogers AV, Adelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 1;167(1):78–82.
67. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Nov 1;174(9):975–81.
68. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):45–51.e1–4.
69. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):544–9.
70. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1745–53.
71. Chanez P. Severe asthma is an epithelial disease. *Eur Respir J*. 2005 Jun;25(6):945–6.
72. Benayoun L, Druilhe A, Dombret M-C, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 May 15;167(10):1360–8.
73. Vermeer PD, Harson R, Einwalter LA, Moninger T, Zabner J. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Mar;28(3):286–95.

74. Bruno A, Pace E, Chanez P, Gras D, Vachier I, Chiappara G, et al. Leptin and leptin receptor expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Aug;124(2):230–7, 237.e1–4.
75. Vachier I, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godard P, Bousquet J, et al. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):55–60.
76. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SFP, Sin DD. The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Thorax*. 2011 Aug;5(4):255–73.
77. Tang H, Sun Y, Shi Z, Huang H, Fang Z, Chen J, et al. YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF- κ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Jan 1;190(1):438–46.
78. Bara I, Ozier A, Girodet P-O, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, et al. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Apr 1;185(7):715–22.
79. Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):725–9.
80. Laitinen A, Altraja A, Kämpe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):951–8.
81. Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol*. 2005 Jun;5(3):257–63.
82. Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1345–52.
83. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Jun;4(3):241–50.
84. 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*. 2001 Feb;163(2):517–23.
85. Evans CM, Koo JS. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol Ther*. 2009 Mar;121(3):332–48.
86. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 May 15;162(10):6233–7.
87. Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC, et al. Interleukin-9 upregulates mucin expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Jun;22(6):649–56.
88. Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Lin BP, Schofield B, Sealfon SC, et al. Chronic exposure to TNF- α increases airway mucus gene expression in vivo. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Dec;116(6):1256–63.
89. Chen Y, Thai P, Zhao Y-H, Ho Y-S, DeSouza MM, Wu R. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):17036–43.
90. Vrugt B, Wilson S, Bron A, Holgate ST, Djukanovic R, Aalbers R. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J*. 2000 Jun;15(6):1014–21.
91. Hashimoto M, Tanaka H, Abe S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD.

Chest. 2005 Mar;127(3):965–72.

92. Detoraki A, Granata F, Staibano S, Rossi FW, Marone G, Genovese A. Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma. *Allergy*. 2010 Aug;65(8):946–58.
93. Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jun;107(6):1034–8.
94. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Feb;107(2):295–301.
95. Lee YC, Kwak Y-G, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Apr 1;168(7):3595–600.
96. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med*. 2004 Oct;10(10):1095–103.
97. Gregory LG, Jones CP, Walker SA, Sawant D, Gowers KHC, Campbell GA, et al. IL-25 drives remodelling in allergic airways disease induced by house dust mite. *Thorax*. 2013 Jan;68(1):82–90.
98. Byrne AJ, Jones CP, Gowers K, Rankin SM, Lloyd CM. Lung macrophages contribute to house dust mite driven airway remodeling via HIF-1 α . *PLoS One*. 2013;8(7):e69246.
99. Ramos-Barbón D, Fraga-Iriso R, Brienza NS, Montero-Martínez C, Vereas-Hernando H, Olivenstein R, et al. T Cells localize with proliferating smooth muscle α -actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Aug 1;182(3):317–24.
100. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 1;164(3):474–7.
101. Ozier A, Allard B, Bara I, Girodet P-O, Trian T, Marthan R, et al. The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology. *J Allergy*. 2011;2011:742710.
102. Watson N, Magnussen H, Rabe KF. Pharmacological characterization of the muscarinic receptor subtype mediating contraction of human peripheral airways. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Sep;274(3):1293–7.
103. Berger P, Girodet P-O, Begueret H, Ousova O, Perng D-W, Marthan R, et al. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Nov;17(14):2139–41.
104. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet P-O, Ghosh D, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3173–81.
105. Mahn K, Hirst SJ, Ying S, Holt MR, Lavender P, Ojo OO, et al. Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodeling in bronchial asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 30;106(26):10775–80.
106. Yarova PL, Stewart AL, Sathish V, Britt RD, Thompson MA, P Lowe AP, et al. Calcium-sensing receptor antagonists abrogate airway hyperresponsiveness and inflammation in allergic asthma. *Sci Transl Med*. 2015 Apr 22;7(284):284ra60.
107. Wechsler ME, Fulkerson PC, Bochner BS, Gauvreau GM, Gleich GJ, Henkel T, et al. Novel targeted therapies for eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol*.

2012 Sep;130(3):563–71.

108. Corren J. Role of interleukin-13 in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013 Oct;13(5):415–20.
109. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med.* 2013 Jun 27;368(26):2455–66.
110. Girodet P-O, Ozier A, Bara I, Tunon de Lara J-M, Marthan R, Berger P. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther.* 2011 Jun;130(3):325–37.
111. Bezerra HG, Costa MA, Guagliumi G, Rollins AM, Simon DI. Intracoronary optical coherence tomography: a comprehensive review clinical and research applications. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009 Nov;2(11):1035–46.
112. Chen Y, Ding M, Guan W, Wang W, Luo W, Zhong C, et al. Validation of human small airway measurements using endobronchial optical coherence tomography. *Respir Med [Internet].* 2015 Sep [cited 2015 Nov 1]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611115300548>
113. Hartley R, Baldi S, Brightling C, Gupta S. Novel imaging approaches in adult asthma and their clinical potential. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015 Oct;11(10):1147–62.
114. Leaker B, Nicholson G, Ali F, Daudi N, O'Connor B, Barnes P. Bronchoabsorption; a novel bronchoscopic technique to improve biomarker sampling of the airway. *Respir Res [Internet].* 2015 Dec [cited 2015 Nov 1];16(1). Available from: <http://respiratory-research.com/content/16/1/102>
115. Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Niven RM, Corris PA, Siersted HC, et al. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med.* 2007 Mar 29;356(13):1327–37.
116. Matsuoka S, Yamashiro T, Washko GR, Kurihara Y, Nakajima Y, Hatabu H. Quantitative CT assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* 2010 Jan;30(1):55–66.
117. Busacker A, Newell JD, Keefe T, Hoffman EA, Granroth JC, Castro M, et al. A multivariate analysis of risk factors for the air-trapping asthmatic phenotype as measured by quantitative CT analysis. *Chest.* 2009 Jan;135(1):48–56.
118. 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.* 2014;14:29.
119. Berger P, Perot V, Desbarats P, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Laurent F. Airway wall thickness in cigarette smokers: quantitative thin-section CT assessment. *Radiology.* 2005 Jun;235(3):1055–64.
120. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Román Sánchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2005 Nov;60(11):925–31.
121. Piquet J, Chavaillon J-M, David P, Martin F, Blanchon F, Roche N, et al. High-risk patients following hospitalisation for an acute exacerbation of COPD. *Eur Respir J.* 2013 Oct;42(4):946–55.
122. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2010 Sep 16;363(12):1128–38.
123. Wedzicha JA, Brill SE, Allinson JP, Donaldson GC. Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med.* 2013;11:181.
124. Keeley EC, Mehrad B, Janardhanan R, Salerno M, Hunter JR, Burdick MM, et al. Elevated circulating fibrocyte levels in patients with hypertensive heart disease. *J Hypertens.* 2012 Sep;30(9):1856–61.

125. Nikam VS, Wecker G, Schermuly R, Rapp U, Szelepusa K, Seeger W, et al. Treprostinil inhibits the adhesion and differentiation of fibrocytes via the cyclic adenosine monophosphate-dependent and Ras-proximate protein-dependent inactivation of extracellular regulated kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Oct;45(4):692–703.
126. Galligan CL, Fish EN. Circulating fibrocytes contribute to the pathogenesis of collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Nov;64(11):3583–93.
127. Ding J, Hori K, Zhang R, Marcoux Y, Honardoust D, Shankowsky HA, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 in the formation of postburn hypertrophic scar (HTS). *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2011 Oct;19(5):568–78.
128. Chu P-Y, Mariani J, Finch S, McMullen JR, Sadoshima J, Marshall T, et al. Bone marrow-derived cells contribute to fibrosis in the chronically failing heart. *Am J Pathol*. 2010 Apr;176(4):1735–42.
129. Cancer bronchique non à petites cellules, référentiel national de RCP, INCa, mars 2015.
130. Madani A, Keyzer C, Gevenois PA. Quantitative computed tomography assessment of lung structure and function in pulmonary emphysema. *Eur Respir J*. 2001 Oct;18(4):720–30.
131. Nakano Y, Van Tho N, Yamada H, Osawa M, Nagao T. Radiological approach to asthma and COPD--the role of computed tomography. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol*. 2009 Sep;58(3):323–31.
132. Lei P-P, Shuai Q, Wang S-W, Tao S-M, Qu Y-Q, Wang D-H. The comparison of methods to identify the presence of fibrocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded archival cardiac tissue with coronary heart disease. *Pathol Res Pract*. 2014 Dec;210(12):929–33.
133. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara J-M, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J*. 2010 Nov;36(5):1174–84.
134. Ueda K, Tanaka T, Li T-S, Tanaka N, Hamano K. Quantitative computed tomography for the prediction of pulmonary function after lung cancer surgery: a simple method using simulation software. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2009 Mar;35(3):414–8.
135. Carretta A, Ciriaco P, Melloni G, Ballarin A, Bandiera A, Sestini S, et al. Correlation of computed tomography densitometry and pathological grading of emphysema with the variation of respiratory function after lobectomy for lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010 Jun;10(6):914–7; discussion 917–8.
136. Ohno Y, Koyama H, Nogami M, Takenaka D, Onishi Y, Matsumoto K, et al. State-of-the-art radiological techniques improve the assessment of postoperative lung function in patients with non-small cell lung cancer. *Eur J Radiol*. 2011 Jan;77(1):97–104.
137. Yoshimoto K, Nomori H, Mori T, Kobayashi H, Ohba Y, Shibata H, et al. Prediction of pulmonary function after lung lobectomy by subsegments counting, computed tomography, single photon emission computed tomography and computed tomography: a comparative study. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2009 Mar;35(3):408–13.
138. Cox PG, Miller J, Mitzner W, Leff AR. Radiofrequency ablation of airway smooth muscle for sustained treatment of asthma: preliminary investigations. *Eur Respir J*. 2004 Oct;24(4):659–63.
139. Aubier M, Pretolani M, Chanez P, Thabut G, Debray M-P, Taille C, et al. Reply: reduction of airway smooth muscle mass by bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 May 15;191(10):1208–9.
140. Pavord ID, Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Corris PA, Niven RM, et al. Safety

and efficacy of bronchial thermoplasty in symptomatic, severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Dec 15;176(12):1185–91.

141. Castro M, Rubin AS, Laviolette M, Fiterman J, De Andrade Lima M, Shah PL, et al. Effectiveness and safety of bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Jan 15;181(2):116–24.

142. Wechsler ME, Laviolette M, Rubin AS, Fiterman J, Lapa e Silva JR, Shah PL, et al. Bronchial thermoplasty: Long-term safety and effectiveness in patients with severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Dec;132(6):1295–302.

143. Global Initiative for Asthma (GINA) [homepage on the Internet]. Global.

Annexe des publications et communications de M Thumerel

1: Trian T, Allard B, Dupin I, Carvalho G, Ousova O, Maurat E, Bataille J, Thumerel M, Begueret H, Girodet PO, Marthan R, Berger P. House dust mites induce proliferation of severe asthmatic smooth muscle cells via an epithelium-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Mar 1;191(5):538-46.

2: Chevalier B, D'Journo X-B, Jougon J, Velly J-F, Roze H, Thumerel M. Complications respiratoires après œsophagectomie pour cancer par voie transthoracique – Analyse descriptive et facteurs de risque. *Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire* 2015 ; 19(2) : 110-117

3: Rozé H, Thumerel M, Ouattara A, Jougon J. Feasibility of bedside open lung biopsy in patients treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Intensive Care Med*. 2014 Nov;40(11):1789-90.

4: Jougon J, Thumerel M, Rodriguez A, Delcambre F, Velly J-F. Voies d'abord chirurgicales antérieures du thorax et cervicothoraciques. *Encyclopédie médico-chirurgicale, Thorax*. 2014.

5: Orsini B, Sage E, Olland A, Cochet E, Tabutin M, Thumerel M, Charot F, Chapelier A, Massard G, Brichon PY, Tronc F, Jougon J, Dahan M, D'Journo XB, Reynaud-Gaubert M, Trousse D, Doddoli C, Thomas PA. High-emergency waiting list for lung transplantation: early results of a nation-based study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014 Sep;46(3):e41-7; discussion e47.

6: Delom F, Danner-Boucher I, Dromer C, Thumerel M, Marthan R, Nourry-Lecaplain L, Magnan A, Jougon J, Fessart D. Impact of donor-to-recipient weight ratio on survival after bilateral lung transplantation. *Transplant Proc*. 2014 Jun;46(5):1517-22.

7: Allard B, Bara I, Gilbert G, Carvalho G, Trian T, Ozier A, Gillibert-Duplantier J, Ousova O, Maurat E, Thumerel M, Quignard JF, Girodet PO, Marthan R, Berger P. Protease activated receptor-2 expression and function in asthmatic bronchial smooth muscle. *PLoS One*. 2014 Feb 13;9(2):e86945.

8: Rodriguez A, Roubertie F, Thumerel M, Jougon J. Pulmonary metastatic chondrosarcoma with massive extension into left atrium and left ventricle: outcome of surgical management in emergency. Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Nov;44(5):e341-2.

9: Rodriguez A, Thumerel M, Delcambre F, Velly J-F, Jougon J. Proposition de recommandations concernant la prise en charge thérapeutique des lésions œsophagiennes et gastriques après ingestion de caustique chez l'adulte Expérience bordelaise au cours des 6 dernières années chez 59 patients. Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire 2013 ; 17(3) : 139-150

10: Rozé H, Thumerel M, Barandon L, Dromer C, Perrier V, Jougon J, Velly JF, Ouattara A. Cardiopulmonary bypass during a second-lung implantation improves postoperative oxygenation after sequential double-lung transplantation. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2013 Jun;27(3):467-73.

11: Thumerel M, Rozé H, Rodriguez A, Perrier V, Dromer C, Labrousse L, Barandon L, Baste J-M, Ouattara A, Velly J-F, Jougon J. Une circulation extracorporelle avant l'exérèse du second poumon natif lors d'une transplantation séquentielle bipulmonaire est-elle bénéfique sur les suites postopératoires et le suivi à un an ? Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire 2012 ; 16(3) : 136-141

12: Alloubi I, Thumerel M, Bégueret H, Baste JM, Velly JF, Jougon J. Outcomes after bronchoscopic procedures for primary tracheobronchial amyloidosis: retrospective study of 6 cases. Pulm Med. 2012;2012:352719.

13: Jougon J, Thumerel M, Rodriguez A, Delcambre F. Video-axillaroscopy: a new mini-invasive technique for surgical exploration of the axillary region. Eur J Cardiothorac Surg. 2012 Jul;42(1):180-1.

14: Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, Begueret H, Thumerel M, Ousova O, Kolbeck R, Coyle AJ, Woods J, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Apr 1;185(7):715-22.

15: Fessart D, Dromer C, Thumerel M, Jougon J, Delom F. Influence of gender donor-recipient combinations on survival after human lung transplantation. *Transplant Proc.* 2011 Dec;43(10):3899-902.

16: Thumerel M, Rodriguez A, Lebreton G, Jougon J. Is there a place for video-associated thoracoscopy for dissecting intramural haematoma of the oesophagus? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2011 Sep;13(3):356-7.

17: Schwartz A, Thumerel M, Delcambre F, Jougon J. Transaortic migration of a Steinman wire from the shoulder. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011 Aug;40(2):517-9.

18: Jougon J, Thumerel M, Rodriguez A, Velly JF. Multi-segmental reverse loops for long-segment, supercharged pedicled ileum graft for total oesophageal reconstruction: an alternative for anisoperistaltic ileum graft. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Aug;38(2):228-30.

19: Lebreton G, Baste JM, Thumerel M, Delcambre F, Velly JF, Jougon J. The hemiclamshell approach in thoracic surgery: indications and associated morbidity in 50 patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009 Dec;9(6):965-9.

20: Laffon E, de Clermont H, Begueret H, Vernejoux JM, Thumerel M, Marthan R, Ducassou D. Assessment of dual-time-point 18F-FDG-PET imaging for pulmonary lesions. *Nucl Med Commun.* 2009 Jun;30(6):455-61.

21: Aoun F, Bérard X, Midy D, Thumerel M, Baste JC. [Gangrene of the ligamentum teres hepatis]. *J Chir (Paris).* 2006 Nov-Dec;143(6):406-7. French.

Publications en révision

1: Trian T, Allard B, Ozier A, Dupin I, Carvalho G, Ousova O, Maurat E, Thumerel M, Begueret H, Girodet P-O, Marthan R, Berger P. p53 dysfunction increased bronchial smooth muscle cell proliferation in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2015.

Communications orales :

1: 18th World Congress of Bronchology and Interventional Pulmonology, Kyoto, Japan, April 2014, Evolution of patient treated by Dumon Y Stent for cancer invading the tracheo-bronchial tree.

2: 68^{ème} Congrès de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire, Marseille, France, 2015. Morbidité et rendement diagnostique des biopsies chirurgicales pulmonaires chez des patients sous ECMO pour hypoxémie réfractaire.

3: 64^{ème} Congrès de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire, Lyon, France, 2011. Une circulation extracorporelle avant l'exérèse du second poumon natif lors d'une transplantation séquentielle bipulmonaire est-elle bénéfique sur les suites postopératoires et le suivi à un an ?

Approche translationnelle du remodelage bronchique dans l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive

Résumé : Le remodelage bronchique regroupe des entités physiopathologiques comme l'hypertrophie musculaire lisse dans l'asthme ou l'augmentation d'épaisseur bronchique sur l'infiltration de cellules inflammatoires et l'accumulation de fibrose dans la BPCO. Ces remodelages sont corrélés à l'obstruction fonctionnelle et donc à la sévérité de ces maladies. L'analyse de biopsies bronchique ou pulmonaire permet d'étudier ce phénomène qui, après une meilleure compréhension, est une cible thérapeutique intéressante. Le premier article est une revue d'indications de bronchoscopie chez les patients de réanimation. La deuxième étude a montré une augmentation des fibrocytes sanguins au cours d'exacerbation sévère de patient BPCO et une corrélation entre leur taux et le risque de décès du patient. La voie de signalisation du CXCR4 semble impliquée dans ce recrutement. La troisième étude cherche à explorer la localisation et les caractéristiques intra-pulmonaires des fibrocytes chez le patient BPCO à l'état stable. La quatrième étude a montré, *in vivo*, que le gallopamil, un inhibiteur calcique, pouvait diminuer la taille de muscle lisse bronchique de patient asthmatique sévère en ciblant la biogenèse mitochondriale. Ceci pourrait en faire une arme thérapeutique intéressante et totalement novatrice. La dernière étude a permis d'isoler un phénotype de patient asthmatique non sévère à « muscle lisse bronchique augmenté » qui présente un risque accru d'exacerbation et de contrôle non optimal de leur asthme. Les mitochondries semblent jouer un rôle clé comme dans l'asthme sévère.

Mots clés : Asthme, Broncho-pneumopathie chronique obstructive, Remodelage bronchique, Fibrocyte

Translational approach of airway remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease

Abstract : Airway remodeling groups pathophysiological entities such as smooth muscle hypertrophy in asthma or increase bronchial thickness due to infiltration of inflammatory cells and fibrosis in COPD. These remodeling is correlated with the functional obstruction and therefore with the severity of these diseases. The bronchial or lung biopsies analysis allows to study this phenomenon which, after understanding, is an interesting therapeutic target. The first article is a review of indications of bronchoscopy in critically ill patients. The second study showed an increase in blood fibrocytes during severe exacerbation of COPD patient and a correlation between their rate and the risk of patient death. CXCR4 signaling pathway seems to be involved in the fibrocyte recruitment. The third study seeks to explore the location and characteristics of intra-pulmonary fibrocytes in stable COPD patients. The fourth study has shown, *in vivo*, that gallopamil, a calcium channel blocker, could reduce airway smooth muscle size in severe asthmatic patient by targeting mitochondrial biogenesis. This could make it an interesting therapeutic weapon and totally innovative. The last study has isolated a non-severe asthma phenotype with "increased bronchial smooth muscle," which presents an increased risk of exacerbation and a suboptimal control of their asthma. The mitochondria appear to play a key role as in severe asthma.

Keywords : Asthma, Chronic obstructive pulmonary disease, Airway remodeling, Fibrocyte

Unité de recherche

INSERM U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Pr Marthan.

Equipe Remodelage Bronchique, Pr Berger.