



HAL
open science

Rôle des cellules Club et de CCSP dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

Lucie Knabe

► **To cite this version:**

Lucie Knabe. Rôle des cellules Club et de CCSP dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). Pneumologie et système respiratoire. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONT3503 . tel-01492961

HAL Id: tel-01492961

<https://theses.hal.science/tel-01492961v1>

Submitted on 20 Mar 2017

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

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques et
Biologiques pour la Santé**

Et de l'unité de recherche UMR CNRS 9214 - INSERM 1046

Spécialité : Biologie-Santé

Présentée par Lucie Knabe

**Rôle des cellules Club et de CCSP dans la
Bronchopneumopathie Chronique
Obstructive (BPCO)**

Soutenue le 19 Juillet 2016 devant le jury composé de

Pr. Pascal CHANEZ, PU-PH, Université d'Aix-Marseille

Pr. Charles PILETTE, PU-PH, Université catholique de Louvain

Dr. Christophe GUIGNABERT, CR1, Inserm UMR S 999

Pr. John DE VOS, PU-PH, IRMB - Inserm U1183

Pr. Arnaud BOURDIN, PU-PH, Université de Montpellier

Dr. Isabelle VACHIER, PHD, SARL MedBioMed

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse

Invitée



MED-BIO-MED

MEDecine - BIOlogie - MEDiterranée



Inserm
U1046

CHU MONTPELLIER
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je suis vraiment honorée d'avoir un jury aussi prestigieux, et je pèse mes mots. Je remercie le Pr Charles Pilette et le Dr Christophe Guignabert d'avoir si gentiment accepté la responsabilité d'être mes rapporteurs de thèse. Je ne pouvais pas rêver mieux. On pourrait croire que j'en fais un peu trop, malheureusement non. Je vous remercie de l'attention que vous porterez à mon travail !

Je remercie également le Pr John De Vos, examinateur de mon travail, aussi présent à tous mes comités de thèse. Vous avez suivi mon évolution et vous avez porté un regard critique sur mon travail, ce qui m'a beaucoup aidé dans l'avancement de ma thèse. Vous m'avez été d'une grande aide. Je retiens également les discussions que nous avons pu avoir pour m'éclairer sur mon avenir, je vous remercie de votre gentillesse. De rien pour les petits gâteaux lors des réunions « brainstorming », je suis persuadée que ça a contribué à la meilleure compréhension et interprétation de mes résultats !

J'adresse mes chaleureux remerciements à mon président de jury de thèse, le Pr Pascal Chanez. Je me souviens exactement de la première réunion Montpellier-Marseille, tant j'ai été impressionnée par votre regard critique, avisé et constructif. Avec plus de légèreté si je peux me permettre, je suis flattée que vous m'ayez laissé vous apprendre le protocole « mixologie niveau 1 : le Mojito ». Merci pour tout, pour vos conseils, je garderai bons souvenirs de nos discussions.

Au Dr Isabelle Vachier...Isa... merci, merci, du fond du cœur... Il était évident que tu fasses partie de ce jury de thèse. Alors « invitée », c'est bien peu. Je t'ai toujours entendu être appelée « maman », cela a pris tout sens pour moi au cours de ces dernières années. Tu n'es pas qu'une simple invitée, tu es la personne qui m'a serrée fort dans ses bras quand il a fallu me donner du courage, et il m'en a fallu ces derniers temps ! Tu es la personne qui m'a accueilli dans ton laboratoire, et je pense aussi dans ton cœur. Il m'est difficile de trouver les mots pour exprimer toute ma gratitude. Je pourrais étendre des lignes et des lignes pour parler de ces midis, de ces réunions, de tous ces instants où l'on a pu exploser de rire, partager, discuter, où tu as pu me conseiller... mais je dois faire « court » (même si c'est mal parti) donc un grand merci encore. Pour ta patience, car je t'en ai donné des tonnes de choses à corriger, et je t'en ai donné des tonnes d'instantanés « d'enfant agitée ».

Tu es ma voleuse de chewing-gum préférée.

Au Pr Arnaud Bourdin, il est tout autant difficile de ne résumer ma reconnaissance que par un simple Merci. Il y a tellement de choses à dire, et à la fois, les mots sont très difficiles à trouver. Vous m'avez tant appris, autant scientifiquement qu'humainement. Vous êtes le genre de personne qui fait réfléchir, et pas uniquement à si l'on doit exposer les cellules 1h ou 24h au tabac. Vous avez toujours répondu présent quand j'avais besoin de vous parler et vous avez toujours fait en sorte de me faire sourire dans les moments difficiles. Quasi-paternel. Ce n'est pas peu dire que ça me déchire le cœur que de quitter cette aventure (et oui, ce théâtralisme que vous détestez tant !). Le duo infernal s'achève, j'en suis triste mais en sors grandie. Je suis rassurée de savoir que nos joutes verbales ne s'arrêteront pas là. Du moins je l'espère.

Mille mercis, pour tout. Je suis vraiment fière d'avoir été votre thésarde.

Au Dr Aurélie Petit. Membre officiel de la bande des choux. Je finis ce doctorat avec une nouvelle amie, nous avons partagé tant de choses en 4 ans. Je te remercie, pour ta présence, pour ton écoute, pour ton soutien. Je pense que nous nous sommes apprivoisées ! Tu arrives à anticiper mes émotions, j'arrive à comprendre les tiennes, même si parfois tu sembles insondable, car mine de rien, tu es d'une grande sensibilité mais ne le fais jamais paraître. Tu ne cries pas à l'aide, mais j'espère avoir perçu les moments où tu avais besoin d'une oreille pour t'écouter, et avec grand cœur tu as toujours su m'épauler. Tu vas me manquer, c'est évident. Mais je sais que nous n'allons pas nous perdre de vue. J'ai encore plein d'expressions à apprendre !

A ma petite protégée. Engi. Tu fais partie de ces gens qu'on ne peut qu'aimer. Je te remercie pour ta générosité, sans limite. On aura fait les 400 coups ensemble ma parole ! Dans ce bureau, sans fenêtre, on a du manquer d'oxygène tellement notre bêtise n'atteignait aucune limite ! A rire tellement fort, à en déloger Isa de son bureau ! Je ne peux plus te jeter de sardines en papier, car tu n'es déjà plus là, mais je suis certaine de te garder près de moi. Je te remercie de m'apporter cette force, chaque fois que tu rentres dans la pièce. C'est l'effet que tu fais aux gens, tu nous rends meilleurs. Je souhaite maintenant pour toi tout le bonheur possible, que tu mérites, amplement. Tu es une très belle personne, sache-le. Tahiti Bob ne t'arrive pas à la cheville, et Amy se retournerait dans sa tombe de jalousie si elle voyait ce que tu nous as montré.

A ma Chouchrischou. Que ça va me manquer de ne plus pouvoir me réfugier dans tes bras. Tu m'as aidé à vivre avec joie et bonheur ces 4 années de thèse. On peut dire qu'on a le droit à une équivalence en psycho avec toutes nos conversations ! Je te remercie d'être mon amie, mais aussi parfois ma maman.

A Rorochou. En fait, merci d'avoir fait ce master...on ne se serait pas connu sinon. Je me suis déjà rongée deux ongles en réfléchissant à comment résumer les choses, comment te remercier, et comment te dire que ton amitié m'est précieuse. J'arrête donc le carnage ici, dit-elle en passant au troisième... Merci pour tous ces excellents moments de partage, toutes ces bêtises, merci d'être le Roro réconfortant, bienveillant et amusant, qu'on aime tant.

A ma Sosoooooooo d'amouuuuur... Toutes ces discussions métaphysiques de l'au-delà ! Tu as été présente à des moments clés de ma vie, et tu m'as aidé à prendre les bonnes décisions... Tu es passionnée et littéralement passionnante... Tu m'as réellement inspirée et grâce à toi j'ai osé sortir du moule dans lequel j'étais cantonnée. La plus belle invention de l'histoire de ma thèse : les apéros labos ! Merci... je crois qu'on a jamais eu autant d'idées pour ma thèse et nos manip que dans ces moments-là, et à la fois dans le rire, la joie ! Ah tes éclats de rire...et Dalida qui parfois faisait son apparition...juste merci pour ces moments exceptionnels ! Tu es une sœur pour moi.

A ma Anne-Soso. Au début, déjà, sans vraiment te connaître, que j'aimais te croiser et échanger quelques mots avec toi. Et puis peu à peu nos conversations se sont allongées, pour rentrer dans le vif de certains sujets où je nous ai trouvé plein de points communs. Tout ceci, de façon assez naturel, pour qu'aujourd'hui je réalise que tu fais pleinement partie intégrante de mes amis proches dont j'ai tant besoin au quotidien. Alors, s'il te plait, reste dans mon quotidien !

A ma Lolo. Merci pour ces échanges. J'ai la chance d'avoir côtoyé la grande personne que tu es, et bien plus encore. Ma marraine de premier congrès. Je n'oublierai jamais nos éclats de rire, entre « Hanz » qui me chevauche dans le sauna et toi morte de rire dans le hammam. Ton regard en salle de pause le midi, la biche qui observe la prairie. Les discussions sérieuses, les discussions délirantes.

Ta démarche féline dans les couloirs va me manquer. Tu vas me manquer.

A ma Cathychou. Un vrai rayon de soleil. Toujours à l'écoute, toujours dans la bonne humeur. Merci d'avoir choisi notre couloir pour tu sais quoi, sans ça, on n'en serait pas là.

A ma Stéphichou, tu es quand même à l'origine de cette histoire de chou ! Merci pour tous ces bons moments passés avec toi ! Et je te remercie, ainsi que Sab et Catherine, pour votre patience à chaque fois que je quémandais une prise de sang...Alex, merci d'avoir fait le cobaye ! Martine, de m'avoir supporté dans le labo. Anne, ça fait peu de temps que je te connais mais tes conseils fashionista me sont bien utiles. Merci tout simplement à tout MedBioMed, en ces murs il s'en est passé des choses ! J'oubliais de remercier Brigitte, sans qui j'aurais terminé ma thèse sur un bureau bien plus bancal que le grand bureau spacieux me permettant d'étaler mon légendaire foutoir.

Merci également à Jean-Philippe Berthet, les biopsies bronchiques c'est cool mais les bouts de bronches c'est sympa aussi.

Chantal, la microscopie électronique est un bien beau monde dans lequel j'ai pris plaisir à rentrer grâce à toi.

Nathou, la plus top des secrétaires. Je te remercie : pour mon appart, pour mon statut CHU, pour pôle emploi... en fait sans tes courriers je suis SDF sans chômage ! Mais je te remercie surtout pour ta gestion des émotions « Lulu » et tous tes précieux conseils. Sans toi le bureau de Nonochou serait comme un aquarium sans poisson.

A Del, merci pour ces échanges autour de la Science et du reste. T'es une chercheuse au top, quel dévouement pour ton travail et quelles convictions ! Tu as le courage de poursuivre ce que je ne me sentais pas capable de faire, j'ai beaucoup d'admiration pour toi.

Les mathématiciens ! Pardon...les statisticiens ! Un grand merci, j'ai beaucoup de respect pour ce que vous faites. Mon co-thésard Greg, sois un bon papa, je n'en doute pas. Yann, t'es au top de ton art mais faut que t'arrêtes les couleurs sur les figures ;) Nico...tu as raison, la thèse, c'est comme un signal sinusoïdal...merci d'avoir été là !

Les genetic girls, merci pour votre accueil ! J'ai adoré passer ces moments chez vous, et vous m'avez beaucoup appris. Merci Mag, Jess, Alex, Karine, Jenni, sans oublier la royale Annette la coquille, la discussion de la pièce bactérienne a marqué un tournant dans ma vie.

Merci à l'unité INSERM U1046 de m'avoir accueilli également. Mes allers-retours bureau-labo m'ont fait perdre quelques kilos. Je ne vous remercierai jamais assez pour ça.

Enfin, j'ai une pensée pour mes amis, Popo et Max, au top de l'énigme. Merci pour ces moments de détente. Caro le Renardeau, tu es une belle découverte, vivement la suite, et Manu, ne change surtout pas. Vous êtes beaux tous les deux.

Fanny, on s'est connu il y a peu mais tu m'as si bien accompagnée pour passer ces étapes... Je t'en remercie ! Merci de ton aide et de ton soutien. Vivement la suite !!

Mirza, sans toi, j'ai pas de robe pour ma thèse ! Manon, les « rah Lu » me manquent, mais je sais qu'ils arrivent bientôt, vivement de t'entendre, et ma Do, merci pour ton doux rire plein de gentillesse. Ces week-ends entre filles post master m'ont aidé à passer les épreuves de la thèse, qui ont bien souvent été le sujet central de mes discussions, je m'en excuse !

A mes meilleures amies...ma bique et ma doudou, merci les filles. On se connaît depuis bien assez longtemps maintenant pour savoir que sans vous ça n'aurait pas eu la même saveur. Pitch, quand Katia sera de sortie tu lui diras qu'elle a un mec en or à proximité.

A ma maman. Toute fragile que tu es tu m'as donné la force d'en arriver là aujourd'hui.
A mon papa. Promis, bientôt j'aurai un travail !
A mes frères.

A mes beaux-parents, vous m'avez offert un cocon inespéré de tendresse et de gentillesse. Vous m'apportez bien plus que ce que vous ne pouvez imaginer, merci d'être là et de prendre soin de moi comme si j'étais votre fille.

Enfin, comment dire « ce qu'il faut » comme il faut !

A Jérémy, Merci de m'accompagner au quotidien, de me supporter chaque jour, de me soutenir à bout de bras, de toujours me faire sourire et de toujours tout simplement être là. 2 années ça peut paraître peu, mais en année de chien c'est énorme. Tu m'as fait vivre 2 années de chien ! Dans le sens canin du terme. Ce sont mes plus belles années, grâce à toi. Je ne sais comment te dire merci pour tout ça, pour les papillons dans le ventre que j'ai depuis que nous sommes ensemble. En te voyant arriver en master, je ne soupçonnais pas ça. C'était juste « étrange ». Le loup est dans la bergerie disait Stéphanou. Oui, peut-être qu'il se passait quelque chose. Quelle naïveté. Et puis heureusement que tu en avais des gardes, merci l'internat. Merci la thèse. J'ai trouvé ma moitié. Maintenant, si tu me demandais « tu veux une médaille ? » comme tu me l'as si souvent répété à chaque fois que j'étais victorieuse d'avoir accompli une bien piètre chose, je te répondrai que je n'en ai pas besoin.

Tout ce qu'il me faut c'est toi.

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vi
INTRODUCTION	1
I. LA BPCO: UNE MALADIE DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE?	2
1. La BPCO	2
1. 1. Epidémiologie	2
1. 2. Définition	3
1. 3. Histoire naturelle de la maladie et racines pédiatriques	4
1. 4. La classification GOLD et l'indice BODE	5
1. 5. Etiologie et facteurs de risque	6
1. 6. Les thérapeutiques actuelles	6
2. L'épithélium respiratoire sain	8
2. 1. L'arbre aérien inférieur	9
2. 2. Morphologie	10
<i>Les cellules ciliées</i>	11
<i>Les cellules basales</i>	11
<i>Les cellules caliciformes</i>	12
<i>Les cellules neuroendocrines</i>	12
<i>Les cellules Club</i>	13
3. L'épithélium dans la BPCO	13
3. 1. Physiopathologie de la BPCO	13
3. 2. « L'ère » des petites voies aériennes	15
3. 3. L'inflammation neutrophilique	17
3. 4. Le déficit en cellules Club et protéine CCSP	19
II. LES CELLULES CLUB ET CCSP	21
1. Un peu d'histoire...	21
2. Caractéristiques des cellules Club	23
2. 1. Origine des cellules Club	24
2. 2. Fonction de métabolisme des xénobiotiques	26
2. 3. Fonction de prolifération/différenciation	27

<i>Les « Variant Club cells »</i>	29
<i>Les « Bronchoalveolar Stem cells »</i>	30
<i>Les « OCT4-expressing stem cells »</i>	31
<i>Les « CCSP+ bone marrow cells (CCSP+ BMCs) »</i>	31
2. 4. Fonction de sécrétion	32
3. La protéine CCSP	32
3. 1. Distribution dans l'organisme	33
3. 2. Structure	35
3. 3. Le gène et sa régulation	35
3. 4. Le polymorphisme G38A	37
3. 5. Souris knock-out (KO)	38
<i>Les souris souche-129 CCSP^{-/-}</i>	38
<i>Les souris C57BL/6 CCSP^{-/-}</i>	39
3. 6. La fonction anti-inflammatoire	40
<i>Effet sur les cellules épithéliales et effet sur les neutrophiles</i>	40
<i>CCSP et son implication dans les voies de signalisation</i>	41
4. Synthèse des rôles des cellules Club et de la protéine CCSP	42
5. Guerres et opportunités thérapeutiques : Ypérite et cellules Club	45
PRESENTATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE	46
RESULTATS	50
I. REGULATION ENDOGENE DE CCSP	51
1. Résumé	51
2. Article 1 : « CCSP G38A polymorphism-environment interactions regulate CCSP levels differentially in COPD. »	53
3. Discussion	54
4. Conclusion	55
II. CARACTERISATION DES CELLULES CLUB DANS UN MODELE EX VIVO D'EPITHELIUM BRONCHIQUE	56
1. Résumé de l'article 2	56
2. Article 2 : « Characterization of Club Cell Secretory Protein Producing Cells in an ex vivo COPD Culture Model. »	57
3. Discussion de l'article 2	58
4. Conclusion de l'article 2	60
5. Résumé de l'article 3	61

6. Article 3 : « Epithelial ciliated beating cells, a key factors for ex vivo ALI culture success growth. »	62
7. Discussion de l'article 3	63
8. Conclusion de l'article 3	64
III. SUPPLEMENTATION EXOGENE EN CCSP	66
1. Résumé de l'article 4	66
2. Article 4 : « Supplementing Defect in Club Cell Secretory Protein Attenuates Airway Inflammation in COPD. »	67
3. Discussion de l'article 4	68
4. Conclusion de l'article 4	69
5. Résumé de l'article 5	70
6. Article 5 : « How does CCSP counterbalance airway epithelial-driven neutrophilic chemotaxis due to cigarette smoke ? »	71
7. Discussion de l'article 5	72
8. Conclusion de l'article 5	73
9. Résumé de l'article 6	74
10. Article 6 : « Proteomic signature of CCSP treatment in CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells. »	75
11. Discussion de l'article 6	76
12. Conclusion de l'article 6	77
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	78
Editorial : « Club cells and CC16: another “smoking gun”? (With potential bullets against COPD) »	81
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82

ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALI	Air-Liquid Interface
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BADJ	BronchoAlveolar Duct Junction
BASC	BronchoAlveolar Stem Cells
BMCs	Bone Marrow Cells
BMI	Body-Mass Index
BODE	BMI, degré d'Obstruction des voies respiratoires, Dyspnée et capacité d'Exercice
BPCO	BronchoPneumopathie Chronique Obstructive
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CC-	Club Cell-
CCSP	Club Cell Secretory Protein
CCSPrh	CCSP recombinante humaine
CD	Cluster Differentiation
CGRP	Calcitonine Gene-Related Peptide
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CVF	Capacité Vitale Forcée
CYP	Cytochrome P450
ECLIPSE	Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 second
fMLP	N-FormylMethionyl-Leucyl-Phenylalanine
FPR	Formyl Peptide Receptor
FVC	Forced Vital Capacity
GOLD	The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GRO- α	Growth Related Oncogene- α
GRP	Gastrine
GSH	Glutathion
GWAS	Genome-Wide Association Study
HNF-	Hepatocyte Nuclear Factor-
ICGN	International COPD Genomics Network
ICS	Inhaled CorticoSteroids
IL-	InterLeukin-
I κ B- α	Inhibitor of NF- κ B subunit- α
KO	Knock-Out
LABA	Long-Acting β 2-Adrenergic receptor agonists
LAMA	Long-Acting Muscarinic Acetylcholine receptor antagonists
LBA	Liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS	LipoPolySaccharides
LT	LeukoTriene
MCP-	Monocyte Chemotactic Protein-
MIP-	Macrophage Inflammatory Protein-
MMP	Matrix MetalloProteinases
MUC	Mucin

NEB	Corpuscules neuro-épithéliaux
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NICD	Notch IntraCellular Domain
NKX2.1	NK2 homeobox 1
OCS	Oral CorticoSteroids
OCT-4	OCTamer-binding transcription factor-4
PCB	PolyChloroBiphényles
PG-	ProstaGlandine-
PGK	PhosphoGlucoKinase
PI3-K	PhosphatidyInositol 3-Kinase
PLA	PhosphoLipase A
PLA2c	PhosphoLipase A2 cytosolique
PLA2s	PhosphoLipase A2 sécrétoire
PN	Pneumocyte
SABA	Short-Acting β 2-Adrenergic receptor agonists
Sca-1	Stem Cell Antigen-1
SCBG	Secretoglobin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP-	Protéine du Surfactant-
TEER	Résistance électrique transépithéliale
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TTF-1	Thyroid Transcription Factor-1
VEMS	Volume Expiratoire Maximale à la première Seconde

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les causes de mortalité dans le monde en 1990 et en 2010 selon Lozano et al.....	2
Figure 2 : L'évaluation de la BPCO selon plusieurs critères.....	7
Figure 3 : Représentation schématique des épithélia de surface trachéobronchique et glandulaire.....	9
Figure 4 : Composition cellulaire des différentes divisions de l'arbre bronchique (adaptée de Akram et al.).....	10
Figure 5 : Les cellules inflammatoires impliquées dans la BPCO selon le compartiment anatomique selon Pauwels et al.....	14
Figure 6 : Relation entre l'épaisseur de la paroi des petites voies aériennes et le VEMS.....	15
Figure 7 : Métaplasie squameuse dans la BPCO selon Randell et al.....	16
Figure 8 : Modèle hypothétique du rôle du muscle lisse bronchique dans la pathogénèse de la BPCO selon Araya et al.....	16
Figure 9 : Obstruction de la lumière bronchique par du mucus selon Hogg et al.....	17
Figure 10 : Inflammation neutrophilique dans le sputum de patients BPCO selon Stanescu et al.....	18
Figure 11 : Le chimiotactisme neutrophilique en réponse à une agression tabagique (adaptée de Kolaczowska et al.).....	19
Figure 12 : Corrélation entre le rapport CCSP / IL-8 et l'épaisseur de la paroi des voies aériennes selon Bourdin et al.....	20
Figure 13 : Expression de la protéine CCSP au niveau des petites voies aériennes de sujets témoins (E, F) et de patients BPCO (G, H) selon Pilette et al.....	20
Figure 14 : Description originale de Max Clara publiée en 1937 selon Clara et al....	22
Figure 15 : Nombre de fois que le terme « Clara cell » est retrouvé dans la database Medline selon Winkelmann et al.....	22
Figure 16 : Les découvertes relatives aux cellules Club durant le 20 ^{ième} siècle selon Reynolds et al.....	23
Figure 17 : Différence de composition cellulaire entre l'épithélium humain et celui de la souris selon Rackley et al.....	24
Figure 18 : Voie de signalisation Notch selon Takebe et al.....	25

Figure 19 : Métabolisme du naphtalène selon Shultz et al.	26
Figure 20 : Les étapes de différenciation des cellules de l'épithélium respiratoire selon Gras et al.	28
Figure 21 : Les niches de cellules souches au sein des voies aériennes distales selon Randell et al.	29
Figure 22 : Le rôle souche potentiel des cellules des voies aériennes distales selon Randell et al.	29
Figure 23 : Cellules Club (Cl) et corps neuroépithéliaux (N) à la BADJ d'un nouveau-né de souris (11 jours) en microscopie électronique à balayage selon Hung et al. ...	30
Figure 24 : Caractéristiques structurales de la protéine CCSP selon Mukherjee et al.	35
Figure 25 : Le gène <i>CCSP</i> humain (A) et sa région promotrice (B) selon Lauchon-Contreras et al.	36
Figure 26 : Le chromosome 11 portant le gène <i>CCSP</i>	36
Figure 27 : Souris sauvage (à gauche) et souris C57BL/6 <i>CCSP</i> ^{-/-} (à droite) selon Mukherjee et al.	39
Figure 28 : Les différents types de PLA2 et leurs actions selon Cao et al.	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de la sévérité de l'obstruction ventilatoire dans la BPCO. .	5
Tableau 2 : Modèle de traitement non pharmacologique.....	7
Tableau 3 : Modèle de traitement pharmacologique.....	7
Tableau 4 : Les CYP2F selon les espèces selon Buckpitt et al.	27
Tableau 5 : Les différentes appellations de la protéine CCSP selon Klug et al.	33
Tableau 6 : Distribution de CCSP dans différents organes selon Shijubo et al.	34
Tableau 7 : Récapitulatif des rôles évoqués des cellules Club.....	42
Tableau 8 : Récapitulatif des rôles évoqués de la protéine CCSP.	44

INTRODUCTION

I. La BPCO: une maladie de l'épithélium respiratoire?

1. La BPCO

1. 1. Epidémiologie

La BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est un problème majeur de santé publique. Plus de 200 millions de personnes dans le monde sont actuellement touchées par la maladie. Selon une étude publiée en 2012 dans le *Lancet Journal*, elle serait la troisième cause de décès dans le monde (Figure 1) (1).

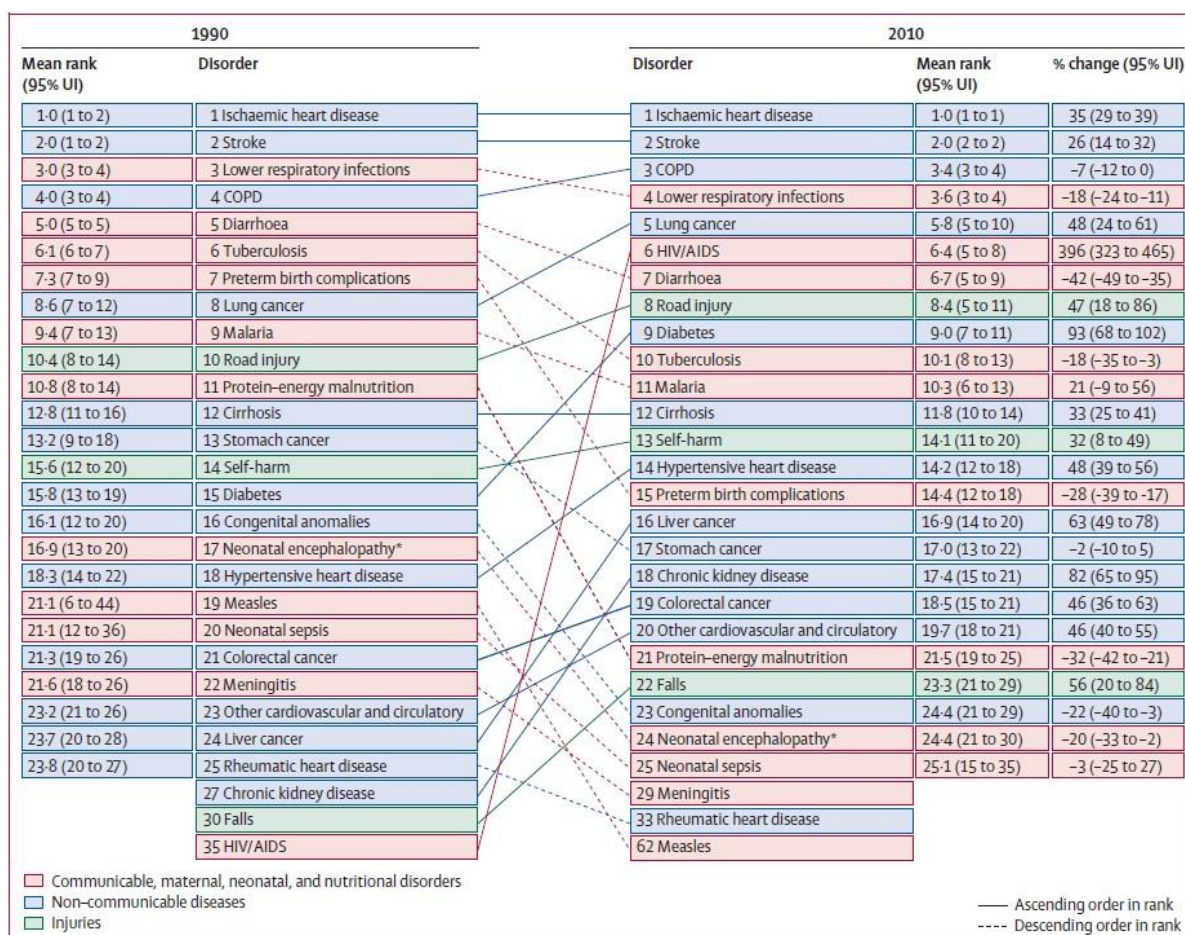


Figure 1 : Les causes de mortalité dans le monde en 1990 et en 2010 selon Lozano et al.

La prévalence de la maladie en France est difficile à déterminer mais s'élève probablement à plus de 3,5 millions de personnes, soit 6 à 8 % de la population adulte qui serait atteinte de BPCO (3 % des décès dans notre pays). Malgré cela, la BPCO reste méconnue. Lors d'une enquête téléphonique en 2004 en France, seulement 8% des personnes interrogées (personnes considérées à risque ou présentant une BPCO) connaissaient la signification du terme BPCO (2).

1. 2. Définition

William Briscoe semble être la première personne à avoir utilisé le terme BPCO lors de la 9^{ème} conférence sur l'emphysème à Aspen en 1965 (3). Cette pathologie était auparavant désignée par les termes "chronic obstructive bronchopulmonary disease", "chronic airflow obstruction", "chronic obstructive lung disease", "non-specific chronic pulmonary disease" ou encore "diffuse obstructive pulmonary syndrome".

La BPCO est définie par un trouble ventilatoire obstructif persistant (Volume Expiratoire Maximale à la première Seconde/Capacité Vitale Forcée - ou VEMS/CVF - mesurés < 0,7) et une réponse inflammatoire chronique accrue des voies aériennes, pouvant conduire à un déclin accéléré de la fonction respiratoire (4). Le contexte et notamment le tabagisme sont des arguments diagnostics majeurs. Son évolution est émaillée d'épisodes d'exacerbations plus ou moins sévères qui peuvent menacer le pronostic vital à court terme.

« Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), a common preventable and treatable disease, is characterized by persistent airflow limitation that is usually progressive and associated with an enhanced chronic inflammatory response in the airways and the lung to noxious particles or gases. Exacerbations and comorbidities contribute to the overall severity in individual patients.»

*Citation tirée de "GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE
UPDATED 2016"*

D'un point de vue clinique, il n'existe pas de symptômes respiratoires spécifiques de la maladie. La bronchite chronique est souvent associée au diagnostic de la BPCO mais ne préjuge pas de sa présence et est à distinguer de cette dernière. La bronchite chronique est une entité clinique caractérisée par une toux et des expectorations pendant au moins 3 mois sur 2 années consécutives. L'emphysème, dont la définition est strictement anatomique, peut coexister avec une BPCO. Elle correspond à une destruction des espaces aériens distaux (c'est à dire situés au-delà des bronchioles terminales) et donc des surfaces d'échange gazeux du poumon.

Il est important de souligner que la BPCO est une pathologie extrêmement complexe et hétérogène. Chacune de ces caractéristiques peut avoir une contribution relative à la maladie qui varie selon les personnes, ce qui explique la variabilité inter-individuelle des phénotypes cliniques.

1. 3. Histoire naturelle de la maladie et racines pédiatriques

Le déterminant majeur de l'acquisition d'une fonction respiratoire maximale à l'âge adulte est conditionné par le développement pulmonaire dans l'enfance. L'étude de Lange et al. constitue un vrai changement de paradigme quant à la physiopathologie de la BPCO et met en exergue les racines pédiatriques de la maladie chez les patients développant une BPCO à l'âge adulte avec une fonction respiratoire altérée initiale mais sans déclin accéléré (5).

Elle remet en question le diagramme de Fletcher de 1977 (4) où le déclin paraissait aussi inéluctable que systématiquement caractéristique de la maladie. Ceci incite par ailleurs à avoir une vigilance très particulière chez les patients ayant une fonction respiratoire basse dans leur jeunesse, et plaide donc pour la dissémination de cet examen.

1. 4. La classification GOLD et l'indice BODE

Selon le dernier rapport de « The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease » (GOLD), la sévérité de la BPCO est déterminée par le degré de limitation du VEMS en spirométrie (Tableau 1) (6).

Table 2.5. Classification of Severity of Airflow Limitation in COPD (Based on Post-Bronchodilator FEV₁)		
In patients with FEV₁/FVC < 0.70:		
GOLD 1:	Mild	FEV ₁ ≥ 80% predicted
GOLD 2:	Moderate	50% ≤ FEV ₁ < 80% predicted
GOLD 3:	Severe	30% ≤ FEV ₁ < 50% predicted
GOLD 4:	Very Severe	FEV ₁ < 30% predicted

Tableau 1 : Classification de la sévérité de l'obstruction ventilatoire dans la BPCO.

Toutefois, certains patients atteints de BPCO peuvent présenter des manifestations systémiques non-directement corrélées à leur trouble ventilatoire obstructif. Une approche globale tenant compte de l'imagerie (7) ainsi que d'autres paramètres tels que l'évaluation de la tolérance à l'exercice et l'indice de masse corporelle est nécessaire.

L'indice BODE regroupe certaines de ces variables : l'indice de masse corporelle (B pour « Body-Mass Index » ou BMI), le degré d'obstruction des voies respiratoires (O), la dyspnée (D) et la capacité d'exercice (E) mesurée par le test de marche de six minutes. Son échelle de notation s'étend de 0 à 10 points et est positivement corrélé à la mortalité à un an. Il semble ainsi constituer un index pronostique fiable des manifestations respiratoires et systémiques des patients atteints de BPCO (8).

1. 5. Etiologie et facteurs de risque

Dans les pays occidentaux, le tabagisme actif et/ou passif est la cause de cette pathologie dans 90% des cas ; tandis que dans les pays à faibles revenus, ce sont les pollutions domestiques et industrielles telles que la combustion du bois dans les foyers (9, 10).

La susceptibilité au développement de la maladie est toutefois hétérogène. En effet, seuls 20 à 25% des fumeurs développent cette pathologie, suggérant la possibilité de prédispositions génétiques et l'intervention de facteurs environnementaux (10-12) . Cela permet également de formuler l'hypothèse de l'existence de mécanismes de protection et/ou réparation efficaces des lésions causées par le tabac au niveau des voies aériennes chez les fumeurs qui ne développent pas la pathologie (13).

Enfin, la persistance de l'inflammation bronchique chez les patients sevrés du tabac ayant développé la maladie suggère une autonomisation de cette dernière (14).

1. 6. Les thérapeutiques actuelles

Il s'agit essentiellement de mesures préventives et symptomatiques visant à diminuer la fréquence des exacerbations, ralentir le déclin de la fonction respiratoire et par conséquent l'évolution vers l'insuffisance respiratoire chronique. Hélas, à ce stade, aucun traitement n'y parvient. Dans les versions précédentes du rapport GOLD, les recommandations thérapeutiques concernant la BPCO étaient uniquement basées sur la spirométrie (15). Cependant, comme expliqué précédemment, la fonction respiratoire seule est un mauvais indicateur de la sévérité de la maladie et de son retentissement. Le nouveau rapport GOLD propose d'évaluer la maladie selon plusieurs critères (Figure 2) : l'impact de la maladie sur l'état de santé du patient, la sévérité de l'obstruction ventilatoire et le risque d'événements futurs (tels que les exacerbations ou encore les admissions à l'hôpital) (16).

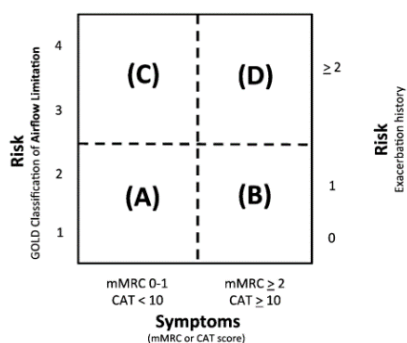


Figure 2 : L'évaluation de la BPCO selon plusieurs critères.

Ainsi, un modèle de traitement non pharmacologique (Tableau 2) et/ou pharmacologique (Tableau 3) est proposé selon l'évaluation de chaque patient.

Patient Group	Essential	Recommended	Depending on Local Guidelines
A	Smoking cessation (can include pharmacologic treatment)	Physical activity	Flu vaccination Pneumococcal vaccination
B–D	Smoking cessation (can include pharmacologic treatment) Pulmonary rehabilitation	Physical activity	Flu vaccination Pneumococcal vaccination

Tableau 2 : Modèle de traitement non pharmacologique.

Patient Group	Recommended First Choice	Alternative Choice	Other Possible Treatments [†]
A	Short-acting anticholinergic prn or Short-acting β_2 -agonist prn	Long-acting anticholinergic or Long-acting β_2 -agonist or Short-acting anticholinergic and short-acting β_2 -agonist	Theophylline
B	Long-acting anticholinergic or Long-acting β_2 -agonist	Long-acting anticholinergic and long-acting β_2 -agonist	Short-acting anticholinergic and/or Short-acting β_2 -agonist and/or Theophylline
C	Inhaled corticosteroid and long-acting β_2 -agonist or Long-acting anticholinergic	Long-acting anticholinergic and long-acting β_2 -agonist	Phosphodiesterase-4 inhibitor and/or Short-acting β_2 -agonist and/or Short-acting anticholinergic and/or Theophylline
D	Inhaled corticosteroid and long-acting β_2 -agonist or Long-acting anticholinergic	Inhaled corticosteroid, long-acting β_2 -agonist, and long-acting anticholinergic or Inhaled corticosteroid, long-acting β_2 -agonist, and phosphodiesterase-4 inhibitor or Long-acting anticholinergic and long-acting β_2 -agonist or Long-acting anticholinergic and phosphodiesterase-4 inhibitor	Carbocysteine and/or Short-acting β_2 -agonist and/or Short-acting anticholinergic and/or Theophylline

Tableau 3 : Modèle de traitement pharmacologique.

Globalement, les recommandations thérapeutiques actuelles reposent sur le sevrage tabagique, les bronchodilatateurs de courte et de longue durée d'action et les corticoïdes inhalés selon le stade de la maladie et le nombre d'exacerbations annuelles. Le suivi et l'adhésion aux traitements sont essentiels et représentent un axe spécifique de la recherche clinique et pharmacologique.

Les objectifs scientifiques de ces dernières années sont de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques via la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie.

2. L'épithélium respiratoire sain

Les voies aériennes supérieures regroupent les cavités nasales, les sinus, le pharynx et le larynx. Elles ont pour fonction de réchauffer et d'humidifier l'air inspiré afin d'éviter le dessèchement des voies aériennes au cours de l'inspiration. Cette partie assure également, par la présence d'une muqueuse, une première filtration de l'air inspiré grâce à la présence de nombreux cils qui filtrent la poussière contenue dans l'air.

Les voies aériennes supérieures et inférieures ont un rôle de conduction, elles permettent le transport de l'air riche en oxygène jusqu'à la partie alvéolaire des poumons lors de l'inspiration et par la suite d'évacuer l'air riche en dioxyde de carbone lors de l'expiration. Les échanges gazeux ont lieu au niveau des sacs alvéolaires.

En contact permanent avec l'air ambiant, la muqueuse respiratoire est exposée à de multiples aéro-contaminants, produits toxiques ou agents pathogènes tels que les bactéries ou les virus. Ces contaminants inhalés devront être éliminés pour assurer la bonne qualité de l'air qui arrive dans les alvéoles. Cette fonction est réalisée par l'épithélium respiratoire ainsi que par le mucus qui le recouvre, en constituant une barrière physique et biochimique de protection grâce aux propriétés mécaniques du mucus et au système de transport mucociliaire, appelé clairance mucociliaire.

2. 1. L'arbre aérien inférieur

La partie aérienne inférieure assure un rôle de conduction, depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. La trachée se divise en bronches souches qui pénètrent dans les poumons. Elles se ramifient en bronches lobaires au niveau de chaque lobe pulmonaire. Ainsi, au fur et à mesure de leur progression intra-pulmonaire, les bronches se ramifient de manière dichotomique en bronches segmentaires, puis en bronches de plus petit calibre, pour enfin aboutir aux bronchioles. Chaque bronchiole se ramifie en 5 à 7 bronchioles terminales. Le passage entre bronchiole terminale et respiratoire constitue une zone de transition entre la partie conductrice et la partie respiratoire de l'arbre bronchique.

Il existe deux types d'épithélia : d'une part, un épithélium de revêtement localisé à la surface des voies respiratoires, en contact direct avec l'air inspiré et, d'autre part, un épithélium glandulaire situé dans la muqueuse.

L'épithélium des voies aériennes inférieures, de type cilié et d'épaisseur variable, tapisse de façon continue les voies respiratoires. Il repose sur une membrane basale et une sous muqueuse, le chorion, dans lequel on retrouve le muscle lisse, les glandes et le cartilage (Figure 3) (17).

Les voies aériennes distales incluent les voies aériennes de conduction à partir de la 8ème division bronchique jusqu'aux sacs alvéolaires.

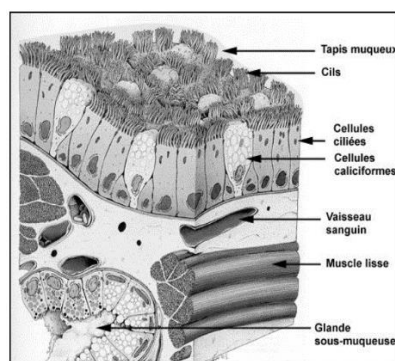


Figure 3 : Représentation schématique des épithélia de surface trachéobronchique et glandulaire.

2. 2. Morphologie

Au fur et à mesure de la progression dans les divisions bronchiques, l'épaisseur de l'épithélium respiratoire diminue. Depuis la trachée jusqu'aux bronchioles, il est pseudostratifié : toutes les cellules le composant sont ancrées sur la membrane basale, mais toutes n'ont pas leur pôle apical en contact avec la lumière bronchique.

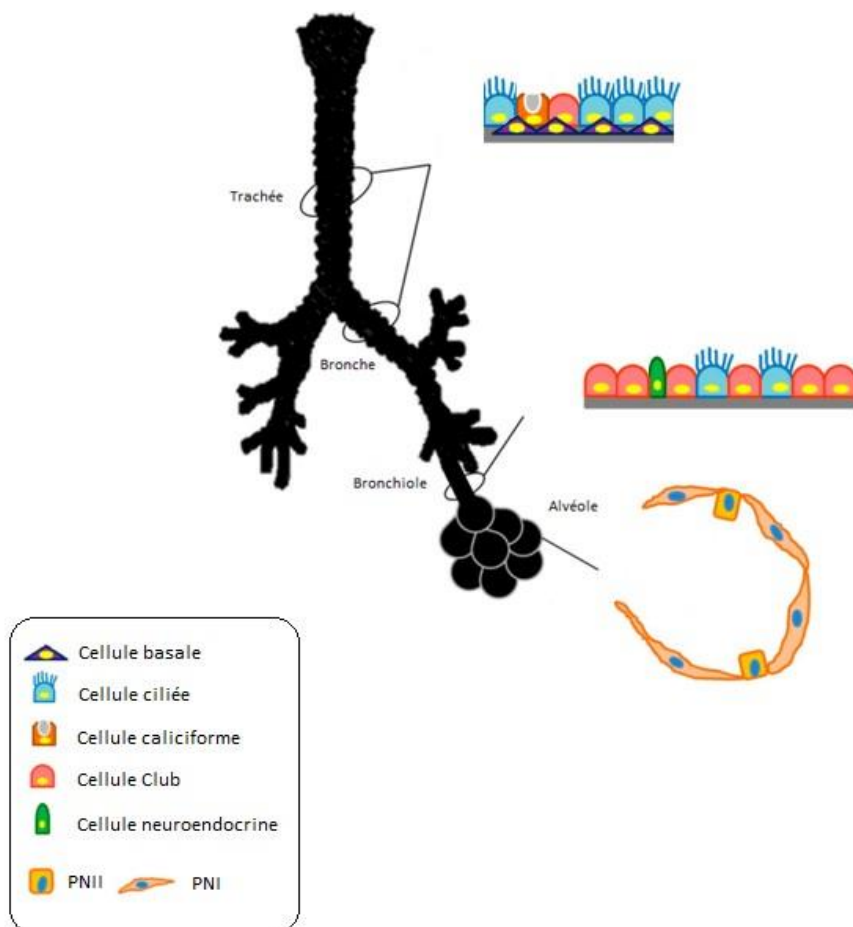


Figure 4 : Composition cellulaire des différentes divisions de l'arbre bronchique (adaptée de Akram et al.).

Les principaux types cellulaires retrouvés sont les cellules basales, les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules neuroendocrines ainsi que les cellules Club (Figure 4). Ces dernières se retrouvent rarement au niveau bronchique mais plus spécifiquement au niveau bronchiolaire. L'épithélium bronchiolaire d'abord cylindrique

pseudostratifié va évoluer en un épithélium cuboïde monocouche constitué théoriquement uniquement de cellules ciliées et de cellules Club au niveau des bronchioles terminales. Enfin, au niveau des alvéoles, l'épithélium est de type pavimenteux simple et est constitué de pneumocytes de type I (PNI) ainsi que de pneumocytes de type II (PNII).

Les cellules ciliées

Les cellules ciliées sont les cellules épithéliales les plus représentées à l'état physiologique. Il y a 5 cellules ciliées pour 1 cellule caliciforme (18). Elles ont une forme prismatique et leur pôle apical est recouvert de cils (200 à 300 par cellules, de 6 à 7 μm) (19). Ceux-ci sont caractérisés par un mouvement rotatoire synchrone permettant l'élimination du mucus et des aéro-contaminants inhalés, définissant ainsi la clairance mucociliaire. Les cellules ciliées sont généralement considérées comme des cellules différenciées ne se divisant plus (20). Selon certaines études elles auraient pour origine les cellules basales (21, 22), mais il est aussi avancé que les cellules Club pourraient être précurseurs des cellules ciliées (23). Enfin, Tata et al. suggèrent que les cellules ciliées pourraient avoir un rôle progéniteur (24).

Les cellules basales

Les cellules basales sont ovoïdes et reposent sur la membrane basale. Elles ne sont pas en contact avec la lumière bronchique. Elles assurent la cohésion de l'épithélium respiratoire en se liant aux cellules voisines via des desmosomes et permettent son ancrage à la membrane basale grâce aux hémidesmosomes (25). Leur nombre est corrélé à la hauteur de l'épithélium (20). Elles sont considérées comme des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire capables de proliférer et de se différencier pour reconstituer un épithélium différencié (26-28).

Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes (encore appelées cellules à mucus ou cellules en gobelet (20)) sont de forme prismatique. Ce sont des cellules sécrétrices, responsables de la production de glycoprotéines de haut poids moléculaire appelées mucines. Ces glycoprotéines sont les principaux composants du mucus et sont contenues dans des granules de sécrétion prédominant au pôle apical de la cellule. Elles sont réparties en 3 groupes : Les mucines ancrées à la membrane (telles que Mucin(MUC)1, MUC4), celles intervenant dans la constitution du mucus dont les plus importantes sont MUC5AC et MUC5B ; et d'autres qui n'interviennent pas dans la constitution du mucus (MUC7, MUC19). La production de mucus est accrue et accélérée en cas d'agression et les cellules prolifèrent si l'agression se chronicise (29). Ce mucus a un rôle dans la clairance d'agents exogènes inhalés mais également dans l'immunité innée vis-à-vis des virus et les bactéries et représente une barrière physico-chimique essentielle.

Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines sont de forme pyramidale. Elles sont soit isolées, soit regroupées sous forme d'îlots innervés, nommés corpuscules neuro-épithéliaux (NEB) (30). Elles sont rares (1 pour 2500 cellules épithéliales (31)) mais prédominent au niveau de l'épithélium bronchiolaire (32), notamment dans les zones de bifurcation des voies aériennes. Leurs produits de sécrétion sont dirigés vers les cellules adjacentes ou des structures sous-jacentes à la membrane basale et correspondent à des amines bioactives et des peptides, dont la sérotonine, la calcitonine, le peptide libérant la gastrine (GRP) ou encore la calcitonine gene-related peptide (CGRP). La régénération de l'épithélium bronchiolaire chroniquement lésé est associée à une augmentation du nombre de cellules neuroendocrines par NEB et du nombre de NEB le long de l'épithélium (33).

Les cellules Club

Les cellules Club sont des cellules cuboïdales, présentant un dôme apical qui fait saillie dans la lumière bronchiolaire. Elles sont sécrétantes comme en témoignent leurs nombreux granules cytoplasmiques (34, 35). Ce sont des cellules épithéliales non ciliées, non muqueuses et non séreuses. Elles sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion de CCSP (pour Club Cell Secretory Protein), encore appelée Club Cell (CC)-10, ou Secretoglobin (SCGB)1A1, mais aussi d'autres protéines telles les protéines du surfactant (SP)-A, SP-B et SP-D (36, 37), SGB3A2 ou encore CC-27. Elles participent à la protection des voies respiratoires via le mécanisme de clairance mucociliaire et par leur capacité de détoxification des substances xénobiotiques et des gaz irritants inhalés (38). Enfin, les cellules Club agissent en qualité de cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire et participent ainsi à son renouvellement. Un chapitre sera consacré à la cellule Club ainsi qu'à la protéine CCSP.

3. L'épithélium dans la BPCO

3. 1. Physiopathologie de la BPCO

Suite à une agression chronique par des agents irritants tels que la fumée de cigarette, la réponse inflammatoire des voies aériennes semble se modifier et devenir exagérée, amplifiée, chez le patient atteint de BPCO. Ces mécanismes physiopathologiques complexes, encore très mal compris, conduisent à des modifications pathologiques impliquant les voies aériennes, le parenchyme pulmonaire ainsi que la vascularisation pulmonaire (Figure 5) (9, 39).

Figure 4-1. Pathological Changes in COPD
<p>Proximal airways (trachea, bronchi > 2 mm internal diameter) <i>Inflammatory cells:</i> ↑ Macrophages, ↑ CD8⁺ (cytotoxic) T lymphocytes, few neutrophils or eosinophils <i>Structural changes:</i> ↑ Goblet cells, enlarged submucosal glands (both leading to mucus hypersecretion), squamous metaplasia of epithelium³</p>
<p>Peripheral airways (bronchioles < 2mm i.d.) <i>Inflammatory cells:</i> ↑ Macrophages, ↑ T lymphocytes (CD8⁺ > CD4⁺), ↑ B lymphocytes, lymphoid follicles, ↑ fibroblasts, few neutrophils or eosinophils <i>Structural changes:</i> Airway wall thickening, peribronchial fibrosis, luminal inflammatory exudate, airway narrowing (obstructive bronchiolitis) Increased inflammatory response and exudate correlated with disease severity⁴</p>
<p>Lung parenchyma (respiratory bronchioles and alveoli) <i>Inflammatory cells:</i> ↑ Macrophages, ↑ CD8⁺ T lymphocytes <i>Structural changes:</i> Alveolar wall destruction, apoptosis of epithelial and endothelial cells⁵</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centriobular emphysema: dilatation and destruction of respiratory bronchioles; most commonly seen in smokers • Panacinar emphysema: destruction of alveolar sacs as well as respiratory bronchioles; most commonly seen in alpha-1 antitrypsin deficiency
<p>Pulmonary vasculature <i>Inflammatory cells:</i> ↑ Macrophages, ↑ T lymphocytes <i>Structural changes:</i> Thickening of intima, endothelial cell dysfunction, ↑ smooth muscle → pulmonary hypertension⁶.</p>

Figure 5 : Les cellules inflammatoires impliquées dans la BPCO selon le compartiment anatomique selon Pauwels et al.

Cela se traduit par un remodelage des voies aériennes en un épithélium métaplasique squameux (40) avec une hyperplasie des cellules caliciformes, une fibrose péribronchiolaire majorant l'obstruction des voies aériennes, une destruction des parois alvéolaires et une inflammation essentiellement de type neutrophilique (41). Il a été démontré que le processus inflammatoire pouvait persister même après sevrage du tabac au niveau des voies aériennes des patients atteints de BPCO (42), par le biais de mécanismes encore inconnus. Cependant, les pistes de la sénescence, de l'auto-immunité ou encore d'infections persistantes pourraient éventuellement expliquer ce phénomène.

3. 2. « L'ère » des petites voies aériennes

L'hypothèse d'une origine bronchiolaire de la BPCO est actuellement favorisée par l'ensemble des spécialistes, les arguments étant les plus convaincants en ce sens. Les voies aériennes distales sont difficiles à explorer car elles se situent dans la zone profonde du poumon. Ce sont les prélèvements anatomiques chirurgicaux qui ont constitué historiquement la source majeure d'étude de ce compartiment anatomique dans la BPCO.

En effet, c'est en 1968 que l'étude menée par Hogg et al. inaugure « l'ère » des petites voies aériennes (39, 43), apportant une vision histologique et précisant ainsi les concepts historiques de la « Dutch hypothesis » (prédispositions génétiques, facteurs endogènes et environnementaux (44)) et de la « British hypothesis » (infections bronchiques et pollution de l'air (45)). Cette vision amènera l'idée que l'obstruction des voies aériennes distales précède très probablement la destruction parenchymateuse.

Initialement, les cellules épithéliales sont agressées, et donc stimulées, par la fumée de cigarette, ce qui va induire un changement dans l'expression de leurs gènes (46). Elles semblent jouer un rôle au niveau de plusieurs aspects de la physiopathologie de la BPCO. Tout d'abord, il a été mis en évidence que l'épaississement de l'épithélium, contribuant donc à la diminution du diamètre de la lumière des voies aériennes, était en relation avec le déclin de la fonction respiratoire au cours du temps (Figure 6) (43, 47-51) .

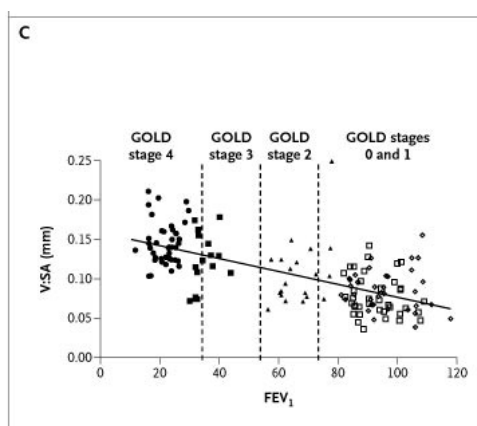


Figure 6 : Relation entre l'épaisseur de la paroi des petites voies aériennes et le VEMS.

Ensuite, il a été suggéré qu'un épithélium métaplasique squameux (Figure 7) promouvait la fibrose péribronchiolaire via la sécrétion d'interleukine-1 β (IL-1 β) (52). L'IL-1 β activerait l'intégrine α v- β 8 présente sur les fibroblastes sous-jacents, ceci induisant la sécrétion de Transforming Growth Factor (TGF) β et donc la fibrose (Figure 8).

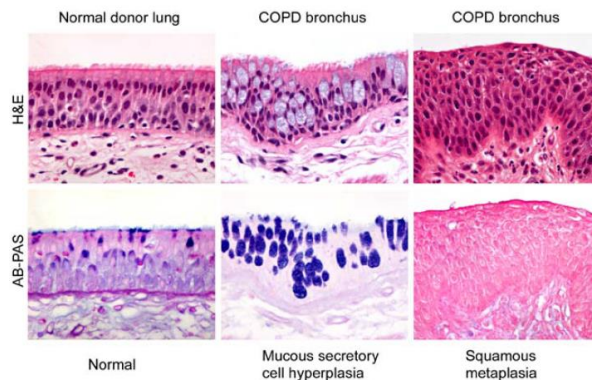


Figure 7 : Métaplasie squameuse dans la BPCO selon Randell et al.

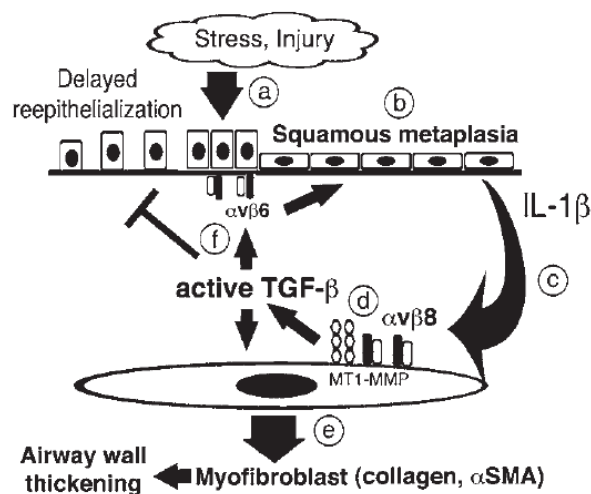


Figure 8 : Modèle hypothétique du rôle du muscle lisse bronchique dans la pathogénèse de la BPCO selon Araya et al.

Aussi, les cellules caliciformes hyperplasiques sécrétant des mucines telles que MUC5AC et MUC5B (53) contribuent très probablement à l'obstruction de la lumière par des exsudats muco-inflammatoires (Figure 9).

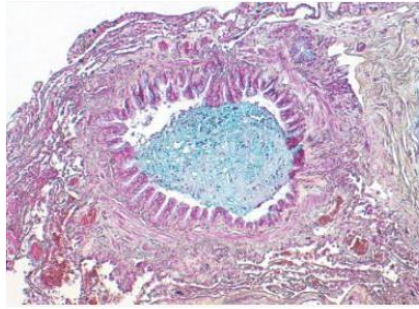


Figure 9 : Obstruction de la lumière bronchique par du mucus selon Hogg et al.

Enfin, les cellules épithéliales des petites voies aériennes favorisent le recrutement de cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T (principalement la sous population lymphocytaire Cluster Differentiation (CD)8+ (54, 55)) via la sécrétion d'agents chimioattractants, aboutissant ainsi à la formation d'un exsudat inflammatoire qui participe lui aussi à l'obstruction des voies aériennes distales (56-59).

3. 3. L'inflammation neutrophilique

L'étude de l'inflammation des voies aériennes distales est difficile mais est permise principalement grâce à l'étude du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). L'inflammation bronchique est une étape précoce et prolongée du développement de la BPCO (60). Elle est caractérisée par l'afflux massif principalement de polynucléaires neutrophiles (Figure 10 et 11) (41, 61), retrouvées en fortes quantités dans la lumière des voies aériennes (62, 63).

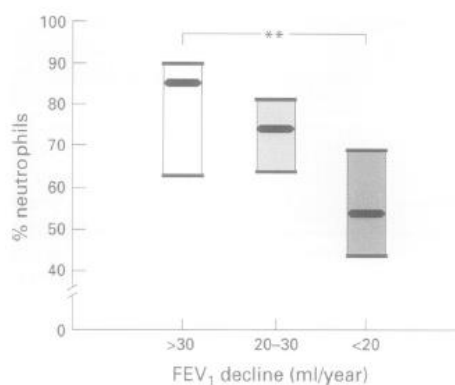


Figure 10 : Inflammation neutrophilique dans le sputum de patients BPCO selon Stanescu et al.

Les polynucléaires neutrophiles semblent d'ailleurs directement liés au tabagisme car on retrouve une neutrophilie, dans le LBA, supérieure chez des sujets fumeurs sans obstruction bronchique par rapport à des sujets non-fumeurs sains (63). Les cellules épithéliales, spontanément ou après stimulation, synthétisent et libèrent une grande variété de médiateurs pro-inflammatoires, incluant des facteurs chimioattractants tels que des médiateurs lipidiques (Leukotriene (LT)B₄ (64, 65) ou des chimiokines (l' IL-8 ou le Growth related oncogene-(GRO)- α (66-68)) ou des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 ou le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . En effet, plusieurs agents chimioattractants, y compris l'IL-8, les LTB₄ et le GRO- α , se retrouvent augmentés dans la BPCO (69, 70).

Les neutrophiles sont donc attirés jusqu'au site « inflammatoire » essentiellement par l'IL-8 (71, 72) et le LTB₄ (73). Il a d'ailleurs été démontré une action synergique de ces deux agents chimioattractants sur le recrutement des neutrophiles (74, 75).

Les neutrophiles ont un effet délétère et contribuent aux lésions des voies aériennes. Ils sont capables de produire de nombreuses protéases dégradant la matrice extracellulaire, particulièrement la metalloprotéinase matricielle (MMP) 9, le TGF- β , l'élastase, des espèces oxygénés réactives, des cytokines et des chimiokines comme l'IL-6 et l'IL-8 (76).

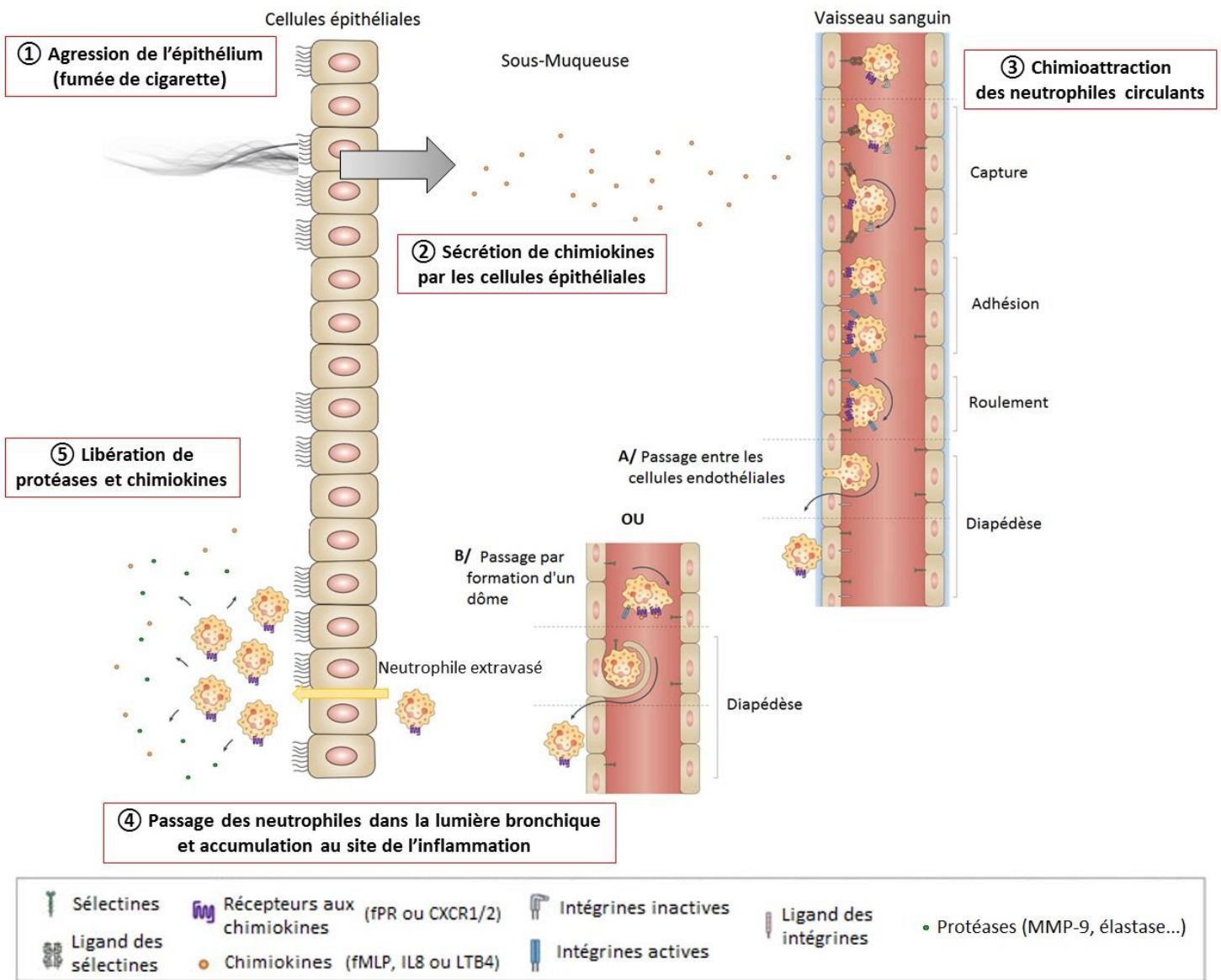


Figure 11 : Le chimiotactisme neutrophilique en réponse à une agression tabagique (adaptée de Kolaczkowska et al.).

3. 4. Le déficit en cellules Club et protéine CCSP

Le déficit en cellules Club et en protéine CCSP semble associé à la BPCO. En effet, le nombre de cellules Club présentes au niveau bronchiolaire est inversement corrélé à la fibrose péribronchiolaire (Figure 12) (77).

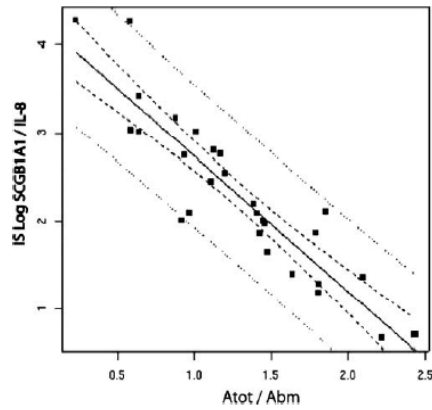


Figure 12 : Corrélation entre le rapport CCSP / IL-8 et l'épaisseur de la paroi des voies aériennes selon Bourdin et al.

Aussi, l'expression de la protéine CCSP est diminuée au niveau des petites voies aériennes chez les BPCO et les fumeurs, en comparaison aux témoins (Figure 13) (78).

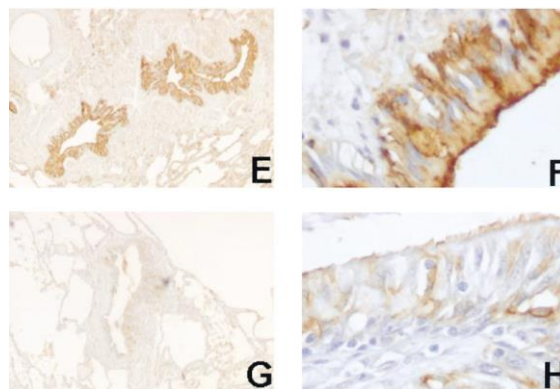


Figure 13 : Expression de la protéine CCSP au niveau des petites voies aériennes de sujets témoins (E, F) et de patients BPCO (G, H) selon Pilette et al.

Un déficit en CCSP dans le sang et dans le LBA de fumeurs en comparaison à des non-fumeurs a aussi été rapporté (79). Ce déficit est aussi mis en évidence dans l'expectoration induite de fumeurs ayant une BPCO en comparaison à ceux sans trouble ventilatoire obstructif (80).

En effet, les taux de CCSP sériques sont significativement diminués chez les fumeurs (actifs ou sevrés) qu'ils aient ou non développé une BPCO (81). Dans l'étude ECLISPE (« Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints ») comprenant 2108 patients, seule la protéine CCSP est corrélée au déclin accéléré de la fonction respiratoire, ce qui en fait un biomarqueur potentiel de la progression de la maladie (82). Aussi, elle semble être un élément prédictif de la fonction pulmonaire et du développement de la BPCO au cours de la vie (83). Au vu de l'histoire naturelle de la maladie décrite sous un nouveau jour (5), il pourrait s'agir d'un biomarqueur intéressant pour identifier des populations à risque de BPCO dès le plus jeune âge et pourrait d'autre part discriminer chez des patients fumeurs sains lesquels seraient susceptibles de développer un trouble ventilatoire dans les décades futures.

Enfin, il a été mis en évidence une corrélation positive entre ce déficit en CCSP dans l'expectoration induite et le déficit du nombre de cellules Club au niveau de l'épithélium bronchiolaire de patients fumeurs souffrant ou non de BPCO devant bénéficier d'une résection pulmonaire pour nodule périphérique (77).

II. Les cellules Club et CCSP

1. Un peu d'histoire...

Les cellules Club ont d'abord été identifiées en 1881 par Kölliker comme étant un type cellulaire distinct, d'un point de vue morphologique et histochimique. Puis, l'anatomiste Max Clara décrit pour la première fois en 1937 ce qui semble être le même type cellulaire (Figure 14), et lui donne ainsi son nom (84).

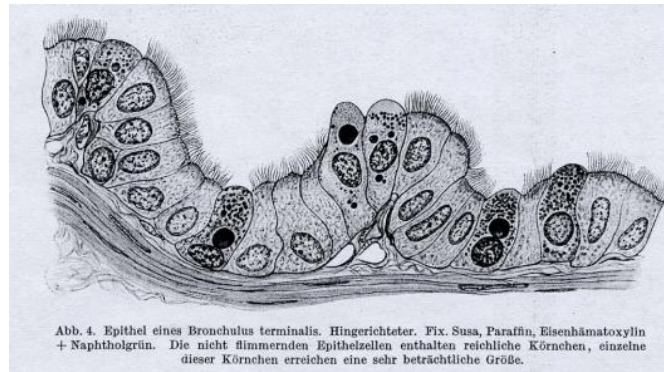


Figure 14 : Description originale de Max Clara publiée en 1937 selon Clara et al.

Sa description originale a été établie à partir de tissus de prisonniers exécutés. A l'époque, cette démarche n'était pas illégale (tant que la famille ne réclamait pas le corps) car le régime nazi avait passé des décrets afin de régler la distribution des corps des sites d'exécution jusqu'aux départements d'anatomie du pays. Cependant, Max Clara fut l'un des seuls anatomistes à utiliser les exécutions planifiées pour des expériences impliquant une intrusion dans la vie du prisonnier (85).

En ce qui concerne l'établissement du terme « Clara cell » comme terminologie médicale officielle post-guerre, il semblerait que les premiers auteurs citant la description originale de Max Clara soient Andrew et Burns en 1947 (86). Les auteurs britanniques évoquent des cellules décrites par Max Clara. Cependant, l'éponyme n'est pas utilisé pour identifier ces cellules. La première utilisation du nom éponyme fut en 1955, lorsque Policard et al. décrivent l'ultrastructure des bronchioles de rat (87). Puis, il s'est retrouvé repris maintes et maintes fois dans la littérature (Figure 15) (88).

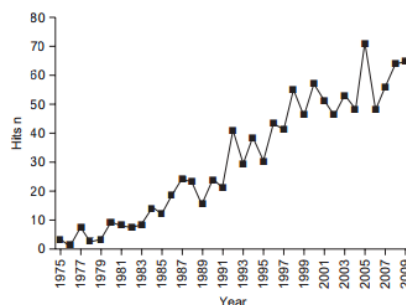


Figure 15 : Nombre de fois que le terme « Clara cell » est retrouvé dans la database Medline selon Winkelmann et al.

Du fait de ce sombre contexte historique, il est préférable d'adopter une autre terminologie. La terminologie anatomique officielle est " cellule exocrine bronchique " (89) mais la distinction avec les cellules caliciformes est confuse. Le terme descriptif «Club cell» ou cellule Club, en rapport avec leur morphologie en dôme, déjà utilisé dans des publications allemandes et anglaises des années 50 et 60 semblent être approprié (90, 91).

2. Caractéristiques des cellules Club

Cela fait plus de 80 ans que les cellules Club sont étudiées afin de mettre à jour leurs multiples fonctions (Figure 16).

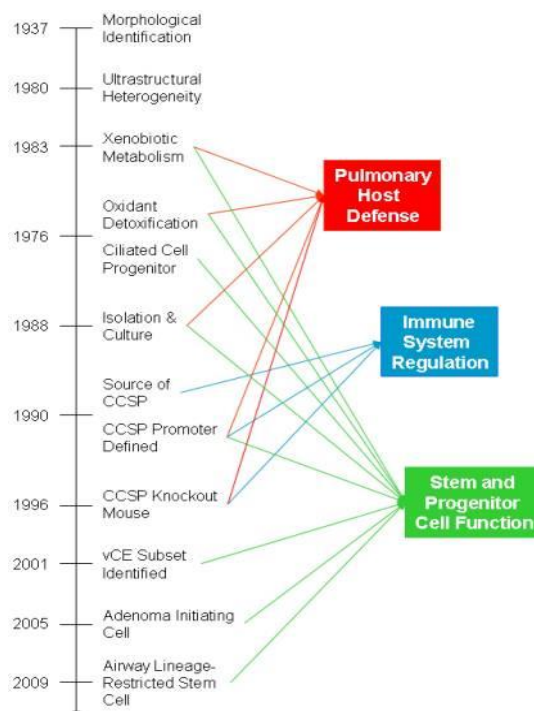


Figure 16 : Les découvertes relatives aux cellules Club durant le 20^{ième} siècle selon Reynolds et al.

Elles représentent de 11% à 22% des cellules au niveau des bronchioles et des bronchioles terminales (34). La plupart des études de caractérisation des cellules Club ont été effectuées chez la souris, leur épithélium respiratoire étant majoritairement composé de ce type cellulaire (Figure 17) (92).

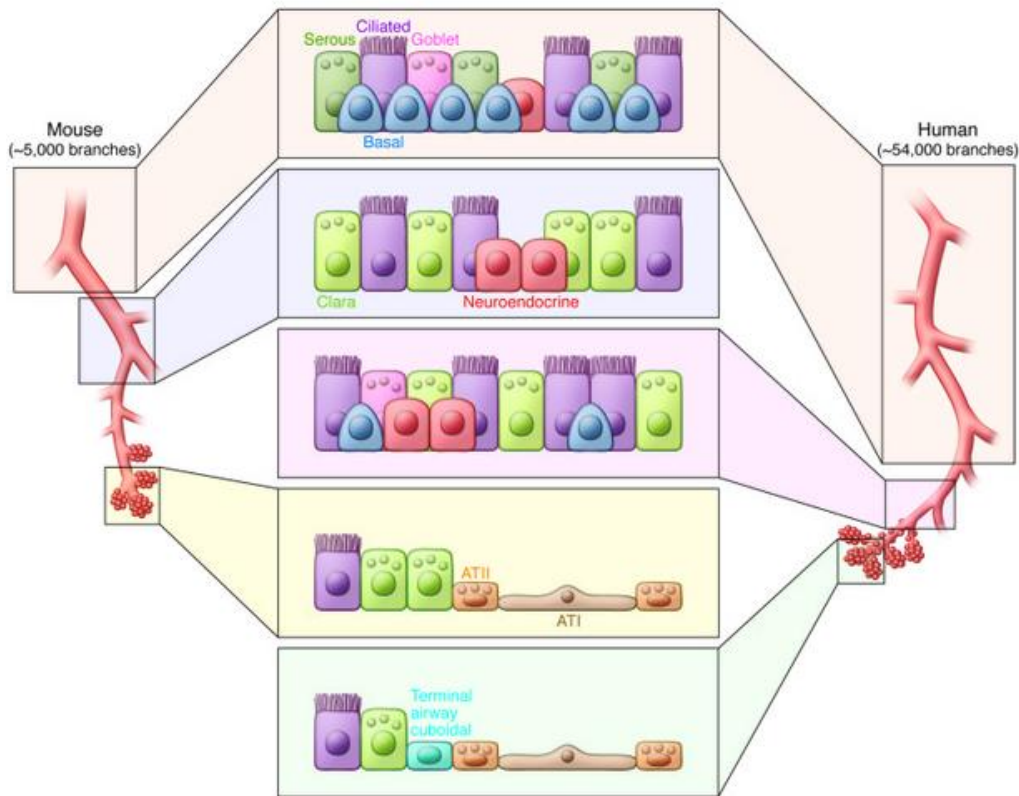


Figure 17 : Différence de composition cellulaire entre l'épithélium humain et celui de la souris selon Rackley et al.

2. 1. Origine des cellules Club

Les études embryologiques ont établi que les cellules des voies aériennes, à l'exception peut-être des cellules neuroendocrines, dérivent séquentiellement de l'endoderme de l'intestin antérieur (93). Une forme stabilisée de β -caténine exprimée spécifiquement dans les cellules CCSP+ chez la souris indique que la maturation fonctionnelle des cellules Club est modulée par la voie de signalisation Wnt durant le développement pulmonaire prénatal (94).

Des études génétiques chez la souris ont démontré un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans la spécification des cellules Club pendant le développement pulmonaire (95). La voie de signalisation Notch est un système juxtacrine, elle est activée par la liaison des récepteurs transmembranaires Notch (Notch 1-4) et des ligands transmembranaires Delta (DLL1, DLL3 ou DLL4) ou Jagged (Jag 1, Jag 2). Après l'absorption et la protéolyse du récepteur hétérodimérique Notch, un fragment soluble (Notch intracellular domain, NICD) est relargué dans le cytoplasme. Après translocation dans le noyau, il se fixe à l'ADN pour servir d'activateur transcriptionnel des gènes cibles associés à Notch (Figure 18).

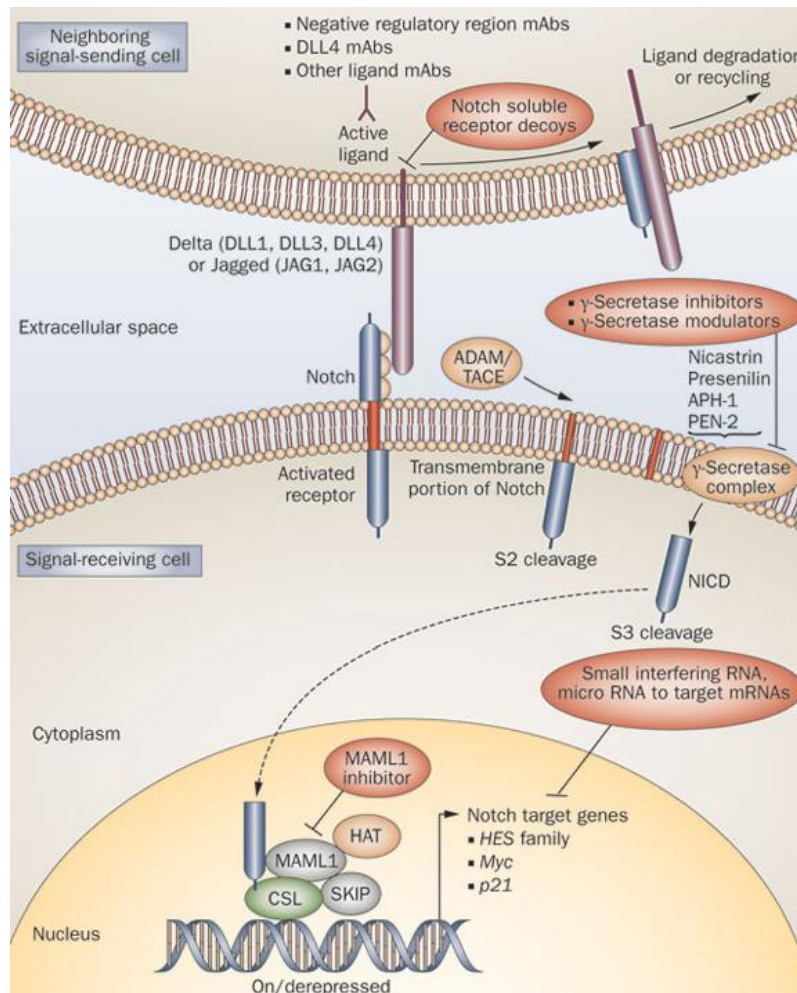


Figure 18 : Voie de signalisation Notch selon Takebe et al.

Une étude récente a également montré que l'inhibition du récepteur Jagged par des ligands de Jag 1 et Jag 2 induisait une perte rapide et presque complète des cellules

Club, à la faveur des cellules ciliées. Les cellules Club subsistantes se trouvaient soit proche de cellules neuroendocrines, soit au niveau de la jonction bronchoalvéolaire (BADJ) (96).

2. 2. Fonction de métabolisme des xénobiotiques

Les cellules Club jouent un rôle dans la protection pulmonaire. En effet, elles contiennent des taux de glutathion (GSH) extrêmement élevés (97) et possèdent aussi la plus forte concentration de cytochrome P450 (CYP) au niveau bronchique (98, 99). Selon de nombreuses études réalisées dans le modèle souris, les cellules Club sont spécialisées dans le métabolisme des toxiques (100, 101) via l'action du Cyp2f2. Cependant, l'accumulation des métabolites toxiques dans la cellule la rend spécifiquement susceptible à ce type d'agression (Figure 19). C'est pourquoi le naphthalène - un toxique environnemental trouvé dans la fumée de cigarette et dans les boules de naphthaline (insecticide anti-mites) - est un système expérimental commun pour étudier l'agression des cellules Club chez la souris.

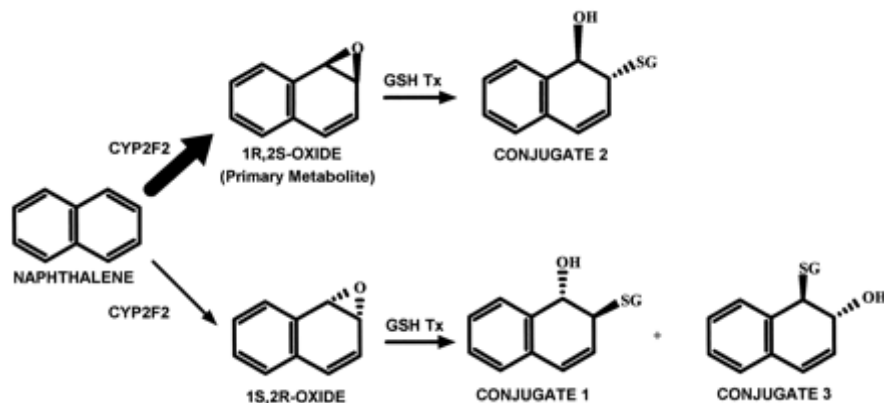


Figure 19 : Métabolisme du naphthalène selon Shultz et al.

Bien que largement admis dans la littérature dans le modèle murin, les effets du naphthalène sur les cellules Club humaines sont moins évidents. En effet, le pendant

de Cyp2f2 de la souris est CYP2F1 chez l'homme (Tableau 4). CYP2F1 a une activité métabolique envers le naphthalène beaucoup moins forte (102). Ceci rend donc ce modèle expérimental de déplétion cellulaire beaucoup moins pertinent chez l'homme.

Table 3. Species Comparisons in the Rates of Conversion of Naphthalene to Naphthalene Oxides: Recombinant Proteins

Recombinant Enzymes	Species	% Sequence Homology (with Human)	Rate of Metabolism (nmol/min/nmol P450 at concentration)	Stereoselectivity (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>):(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	V_{max} (nmol/min/mol P450)	K_m (μM)
CYP2F1	Human	100	0.045 at 0.5 mM naphthalene	0.13:1	ND	ND
CYP2F2	Mouse	82	107 at 0.5 mM	66	107	3
CYP2F3	Goat	84	Active but rate not specified	High	ND	ND
CYP2F4	Rat	83	← Data not available →			

ND—not determined.

Tableau 4 : Les CYP2F selon les espèces selon Buckpitt et al.

Une étude récente a tout de même pu démontrer que CYP2F1 avait un rôle important dans la toxicité induite par le naphthalène dans le poumon de souris humanisées (103).

2. 3. Fonction de prolifération/différenciation

La contribution des cellules Club dans la prolifération épithéliale est estimée entre 15% et 44% au niveau distal durant le renouvellement normal des voies aériennes (34). Les quelques cellules Club présentes au niveau proximal ne semblent pas avoir un rôle prolifératif selon certaines études (104) mais selon d'autres elles contribueraient à la réparation de l'épithélium trachéal (105, 106).

Il est suggéré que les cellules Club au niveau distal soient des cellules progénitrices dites « facultatives », c'est-à-dire qu'elles aient la propriété fonctionnelle d'être à l'état de base un type cellulaire différencié, mais qu'elles puissent switcher vers un état prolifératif actif avec des propriétés similaires à une « transient-amplifying cell » (ces dernières restant relativement indifférenciées et ayant une capacité limitée de prolifération) (107, 108).

La prolifération des cellules Club permettrait de maintenir le pool de cellules progénitrices facultatives, autrement dit de s'auto-renouveler, et de restaurer les cellules différenciées des voies respiratoires, notamment les cellules ciliées et les cellules à mucus (Figure 20) (109).

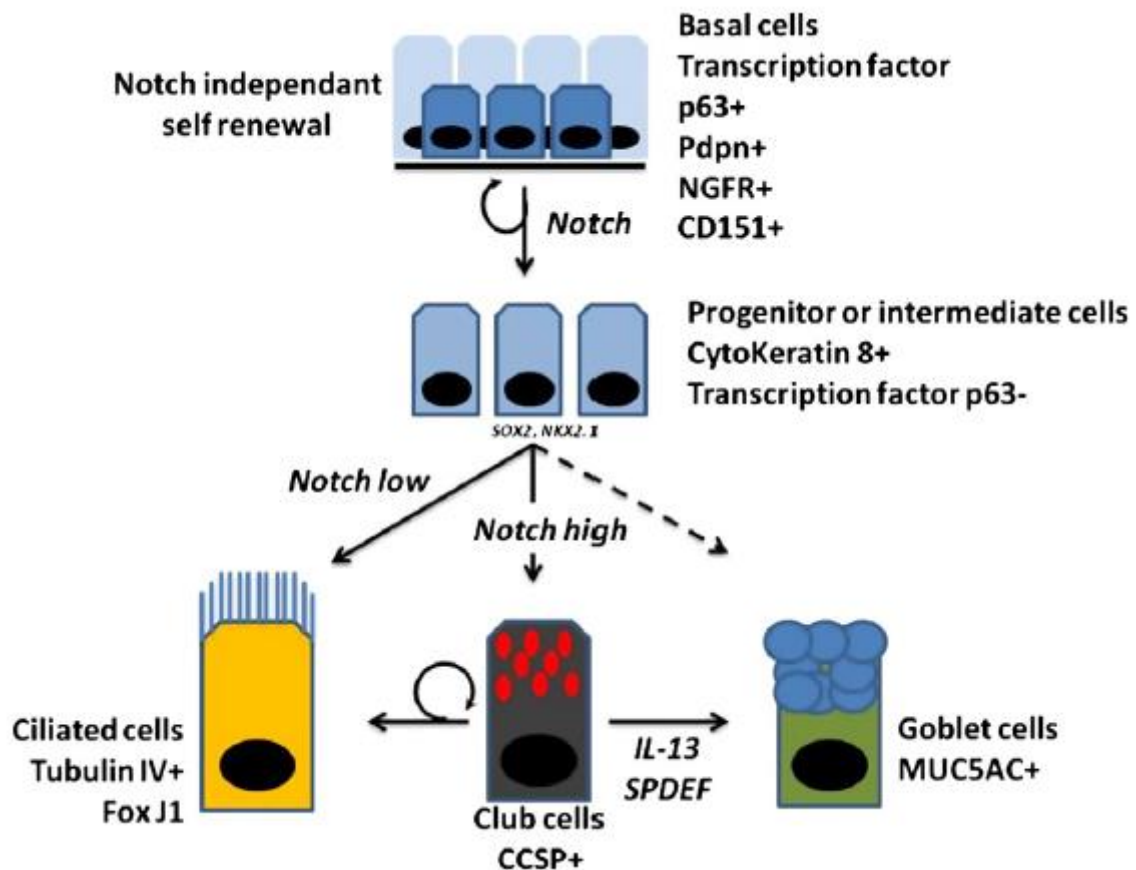


Figure 20 : Les étapes de différenciation des cellules de l'épithélium respiratoire selon Gras et al.

Les cellules Club chez la souris sont communément définies en terme moléculaire par la présence de la protéine CCSP. Ainsi, des sous-populations de cellules Club CCSP+ avec une morphologie distincte et une susceptibilité différente aux expositions environnementales semblent exister (Figure 21 et 22) (27) :

les cellules Club à proprement parler, les « Variant Club cells » (110), les « Bronchoalveolar Stem cells » ou BASC (111), les « OCT4-expressing stem cells » (112) ou encore les « CCSP+ Bone Marrow cells (BMCs) » (113, 114).

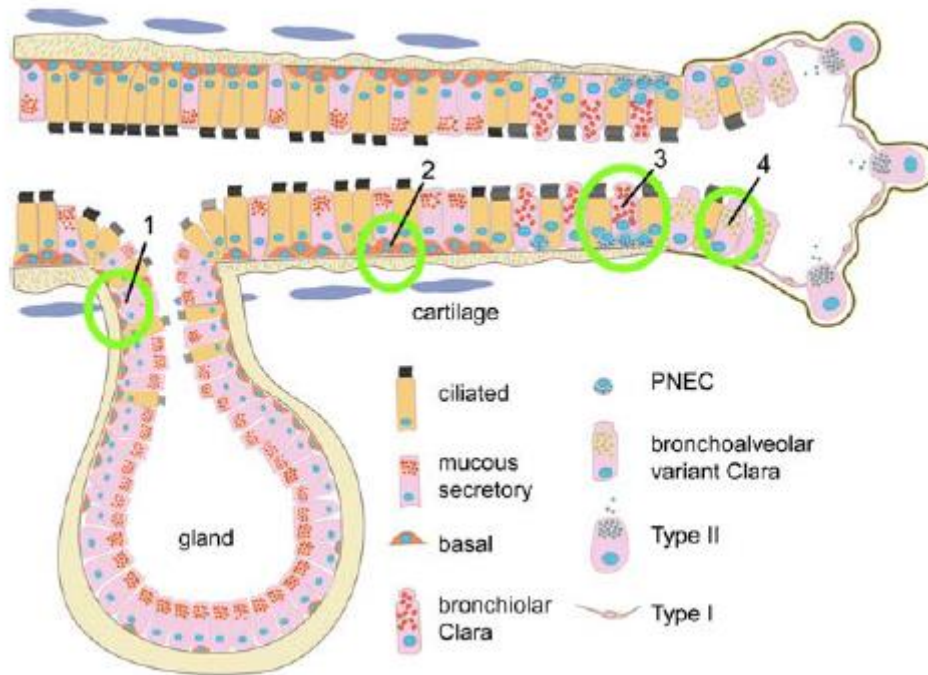


Figure 21 : Les niches de cellules souches au sein des voies aériennes distales selon Randell et al.

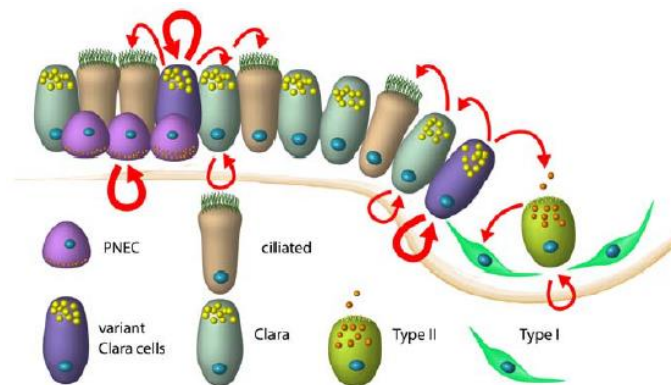


Figure 22 : Le rôle souche potentiel des cellules des voies aériennes distales selon Randell et al.

Les « Variant Club cells »

Les « Variant Club cells » sont des cellules Club proches de cellules neuroendocrines au niveau de la zone de bifurcation des bronchioles. Les deux types cellulaires forment

ce que l'on appelle des NEB (Figure 23). Elles ne possèdent pas l'enzyme Cyp2f2 (115), ainsi, après administration de naphthalène dans un modèle murin, il ne reste plus que ce type de cellules CCSP+ au niveau bronchiolaire (110, 116). Ces NEB permettraient de repeupler l'épithélium en cellules Club et en cellules ciliées. Il a donc été suggéré que ce soit une niche de cellules souches adultes multipotentes ou progénitrices (110, 117, 118).

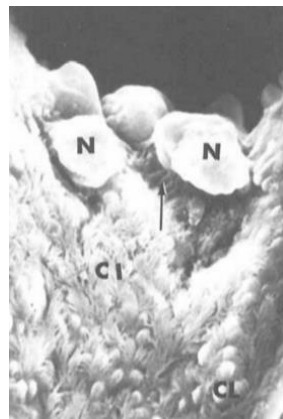


Figure 23 : Cellules Club (Cl) et corps neuroépithéliaux (N) à la BADJ d'un nouveau-né de souris (11 jours) en microscopie électronique à balayage selon Hung et al.

Les « Bronchoalveolar Stem cells »

Les BASC ont été identifiés au niveau de la BADJ chez la souris (106, 111, 119). Cela constituerait une deuxième niche de cellules souches. Ces cellules sont assez rares (1 à 2 par jonction (120)), sont cuboïdales et co-expriment CCSP et SP-C. Ces cellules peuvent être isolées par l'expression en surface de la glycoprotéine CD34 et de l'antigène de cellules souches (Sca)-1. Après induction d'une agression bronchiolaire par le naphthalène et d'une agression alvéolaire par la bléomycine, les BASC prolifèrent pour donner naissance à des cellules filles capables de régénérer l'épithélium bronchiolaire et alvéolaire (111). Ces cellules ont démontré une capacité de croissance et de différenciation élevée pour former de nouvelles cellules Club ainsi que de l'épithélium pulmonaire distal composé de cellules exprimant des marqueurs de PNI ou de PNII (111). La prolifération de ces cellules a été associée au développement

d'adénocarcinomes chez la souris, celles-ci sur-exprimant l'oncogène K-ras, possiblement par la voie phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (K) (121). Une autre équipe identifie une population similaire, exprimant la protéine CCSP et se trouvant à la BADJ avec des caractéristiques de cellules souches (119). Cependant la relation de ces cellules avec celles décrites précédemment n'est pas encore claire. De façon intéressante, Rawlins et al. n'ont pas trouvé de contribution des cellules CCSP + à l'épithélium alvéolaire dans la croissance post natale, l'homéostasie adulte ou la réparation bronchique (23). D'autres équipes ont aussi discuté l'existence des BASC (122, 123). Ces divergences entre ces études montrent la sensibilité de l'identification et de la détermination de la contribution de ces populations rares de cellules souches dans les modèles animaux d'agression.

Les « OCT4-expressing stem cells »

Une population rare de cellules souches co-exprimant le marqueur de cellules pluripotentes OCT (octamer-binding transcription factor)-4 et CCSP ont aussi été décrites dans le poumon murin (112). Ces cellules semblent pouvoir se différencier en PNI et en PNII, et résident au niveau de la BADJ dans le poumon néonatal.

Les « CCSP+ bone marrow cells (CCSP+ BMCs) »

Chez l'humain et la souris, des cellules de la moelle osseuse CCSP+ ont été identifiées. Ces cellules souches expriment aussi CD45 et des marqueurs mésenchymateux tels que CD73, CD90 ou CD105 (113, 114). Elles sont impliquées dans l'alvéologénèse et dans le renouvellement de l'épithélium respiratoire. Une étude récente a permis d'évaluer les effets de la déplétion de ce type cellulaire dans un modèle murin (124). Dans un premier temps, les souris sont transplantées avec des cellules de moelle épinière provenant de souris transgénique, ces dernières ayant sous le contrôle de leur promoteur CCSP un gène suicide thymidine kinase. Ainsi, après traitement au ganciclovir, toutes les cellules CCSP+ BMCs exprimant aussi la thymidine kinase seront déplétées. Puis ces souris sont exposées au naphthalène. Il

est constaté que par rapport à la population souris qui n'a pas reçu de traitement au ganciclovir, les souris déplétées en CCSP+ BMCs ont plus de cellules inflammatoires, moins d'oxygène dans le sang, une réduction de l'expression des gènes de l'épithélium respiratoire et moins de cellules Club. Ensuite, de façon intéressante, l'administration de CCSP recombinant murin réduit les effets induits par le naphthalène.

2. 4. Fonction de sécrétion

Les cellules Club sécrètent les protéines du surfactant de la couche hypophase du LBA, dont les propriétés anti-inflammatoires, d'immunité innée, et tensio-actives sont bien décrites. Elles sécrètent également des protéines, contenues dans les granules denses, qui œuvrent à la protection de l'intégrité pulmonaire (37), notamment des médiateurs endogènes anti-inflammatoires, dont la protéine CCSP, spécifique de ces cellules (35). Elles semblent également impliquées dans la sécrétion de mucines (35).

3. La protéine CCSP

Cette protéine est retrouvée dans la littérature sous de multiples appellations (Tableau 5) (125), en fonction du compartiment où elle a été découverte (blastokinine (126), utéroglobine (127)) ou encore en fonction de son poids moléculaire (CC10 dans un premier temps (128) puis CC16 (129, 130)). Dans les années 2000, une conférence internationale sur le thème de la protéine CCSP a permis de statuer sur une nomenclature officielle : SCGB1A1. Pour plus de simplicité, nous avons décidé de garder l'appellation CCSP.

Species	Trivial Names	Abbreviation/ Symbol
Rabbit	Blastokinin Uteroglobin Uteroglobin-like Antigen Uteroglobin-like Protein Clara Cell Secretory Protein	UG, UGL, UGB ^b CCSP
Hamster, Hare, Horse, Macaque, Pica, Pig	Uteroglobin/Clara Cell 10-kDa Protein	UG, UGL, UGB ^b CC10
Mouse, Rat	Clara Cell (Secretory) Protein C Polychlorinated Biphenyl Binding Protein Clara Cell 10 kDa Protein Clara Cell-Specific 10 kD Protein Clara Cell Secretory Protein Clara Cell 17 kDa Protein Uteroglobin	PCB-Binding Protein CC10 CC10 CCSP CC17 UG, UGL, UGB ^b
Human	Clara Cell-Specific 10 kD Protein Clara Cell 10 kDa Protein Polychlorinated Biphenyl Binding Protein Protein 1/Urinary Protein 1 Uteroglobin Clara Cell Phospholipid-Binding Protein Clara Cell Protein (CC16) Uteroglobin-like Antigen	CC10 PCB-Binding Protein UP-1 UG, UGL, UGB ^b HCCPBP CC16 UGL, ULA

Tableau 5 : Les différentes appellations de la protéine CCSP selon Klug et al.

3. 1. Distribution dans l'organisme

Chez l'homme, la sécrétion de CCSP est assurée en majorité par le poumon (Tableau 6), via les cellules Club comme expliqué précédemment. Il s'avère qu'elle est également produite au niveau de l'endomètre, probablement stimulée par la progestérone (131, 132), ainsi qu'au niveau de la prostate (133). Dans l'ensemble, CCSP est produite dans plusieurs tissus, en quantité bien moindre par rapport au compartiment pulmonaire (134).

Tissue	Area of cc10kD band*	Area of GAPDH band	Ratio of cc10kD to GAPDH
Lung	2.31	0.93	2.48
Trachea	1.98	1.14	1.74
Prostate	2.51	1.19	2.11
Thyroid	1.68	1.09	1.54
Mammary gland	2.07	1.18	1.75
Pituitary	1.79	0.90	1.99
Stomach	1.20	1.12	1.07
Ovary	1.07	1.23	0.87
Testis	1.05	1.15	0.91
Spleen	1.16	0.92	1.26
Adrenal gland	1.06	1.05	1.01
Aorta	1.22	0.96	1.27
Pancreas	0.87	0.25	3.48
Liver	0.51	1.12	0.45
Thymus	0.40	1.21	0.33
Small intestine	0.06	1.13	0.05
Placenta	0.06	0.88	0.07
Uterus	0.13	1.05	0.12
Brain	n.d.	1.05	—
Endothelium	n.d.	1.03	—
Heart	n.d.	1.08	—
Kidney	n.d.	1.01	—
Leukocytes	n.d.	1.10	—

Tableau 6 : Distribution de CCSP dans différents organes selon Shijubo et al.

C'est la protéine la plus importante du LBA avec des concentrations chez les volontaires sains de 4 mg/ml par rapport à 15 à 40 µg/ml dans le sang (135). La variation inter-individuelle du taux de CCSP dans le sérum de sujets témoins est de l'ordre de 10 voire plus (136). La protéine CCSP semble diffuser des poumons au sérum, du fait d'un important gradient de concentration entre la surface des voies respiratoires, où elle est sécrétée en grande quantité, et la circulation sanguine (79, 137).

Elle est éliminée au niveau des reins, probablement en passant au niveau de cellules épithéliales par deux récepteurs : la cubiline et la mégaline (138). Ainsi, des patients déficients en cubiline ou des modèles murins sans mégaline se retrouvent avec une augmentation de CCSP dans les urines.

Le taux de CCSP ne semble pas fluctuer selon le sexe, l'indice de masse corporelle ni la quantité de lipides (136). Par contre, il semblerait être influencé par le rythme nyctéméral (139) et être nettement influencé par le statut tabagique (79, 81).

3. 2. Structure

CCSP est un homodimère constitué de sous-unités de 70 acides aminés, jointes de façon antiparallèle par deux ponts disulfures (Figure 24). Les ponts disulfures facilitent la stabilisation du dimère et permettent la formation d'une cavité centrale, hydrophobe (140-144). De petites molécules telles que la progestérone (145, 146), les polychlorobiphényles (PCB) (147, 148) ou encore le rétinol (149) peuvent s'y trouver piégées.

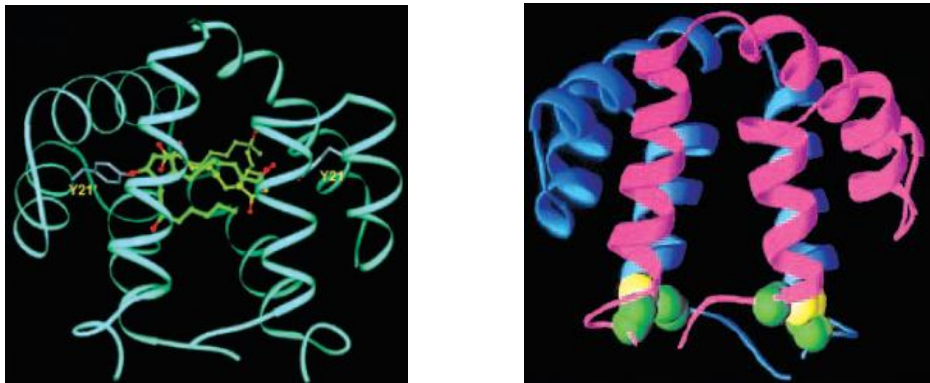


Figure 24 : Caractéristiques structurales de la protéine CCSP selon Mukherjee et al.

Chaque monomère forme également des petites cavités hydrophobes. Bien que leur rôle exact ne soit pas défini, des études ont suggéré que des ligands hydrophobes tels que la prostaglandine (PG) D₂ (150) et la PG F_{2α} (151) pourraient également s'y trouver séquestrés.

Il est donc possible qu'en piégeant certaines de ces substances, CCSP réduise leur toxicité dans la cellule ou dans la lumière bronchique et facilite leur élimination.

3. 3. Le gène et sa régulation

Le clonage et la caractérisation de *CCSP* ont été établis en premier lieu chez le lapin entre 1977 et 1981 (152-154). Le clonage chez l'humain n'a été fait que dans les années 1990 (155-157). Le gène *CCSP* humain contient 18 108 paires de base

réparties sur 3 exons courts et 2 introns (Figure 25) (158). Il se situe sur le chromosome 11, au niveau du locus 11q12.3-q13.1 (Figure 26) (157).

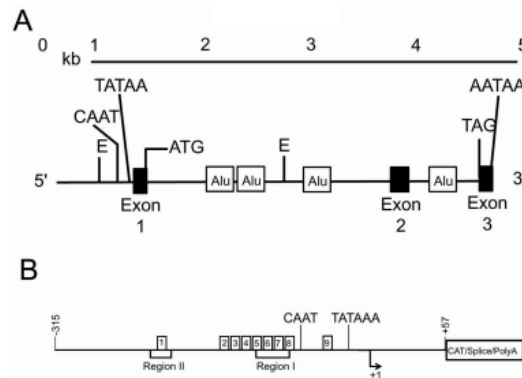


Figure 25 : Le gène *CCSP* humain (A) et sa région promotrice (B) selon Lauchon-Contreras et al.

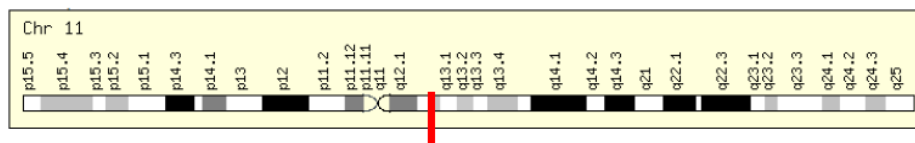


Figure 26 : Le chromosome 11 portant le gène *CCSP*.

Dans cette région se situent d'autres gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation. Ceci pourrait suggérer que *CCSP* ait un rôle dans la modulation des processus inflammatoires.

Des études chez le rat et la souris ont permis de constater que le gène était finement régulé par des facteurs de transcription comme NK2 homeobox 1 (*Nkx2.1*) (ou encore nommé Thyroid Transcription Factor (*TTF*)-1), Hepatocyte Nuclear Factor (*HNF*)-3 et CCAAT/Enhancer Binding Protein (*C/EBP*) α (159-161). De plus, chez le lapin, un élément de réponse aux glucocorticoïdes a été mis en évidence dans le promoteur du gène (162, 163). Les mécanismes de régulation du gène sont encore mal connus chez l'homme. Toutefois, *HNF-3* α et *HNF-3* β semblent se lier au promoteur, ainsi que *Nkx2.1* (164, 165).

L'expression de *CCSP* semble aussi être régulée de façon épigénétique. Buro-Auriemma et al. ont mis en évidence que la fumée de cigarette altérait les motifs de méthylation de l'ADN des petites voies aériennes (166). En l'occurrence, le gène *CCSP* semble être hyper-méthylé chez les fumeurs. Ceci pourrait contribuer au faible taux de *CCSP* dans le plasma et dans le LBA rapporté chez les sujets fumeurs et les patients atteints de BPCO.

3. 4. Le polymorphisme G38A

Un polymorphisme a été identifié, correspondant à la substitution d'un nucléotide, une Guanine par une Adénosine en position 38 dans la région promotrice du gène. Cette mutation G38A correspond dans la nomenclature officielle à c.-26G>A (GeneBank NM_003357.4) et son numéro de référence Single Nucleotide Polymorphism (SNP) est rs3741240.

Plusieurs études rapportent une association entre ce polymorphisme particulier et des maladies inflammatoires (167-171). Une étude d'association pangénomique (GWAS) de la cohorte de l'étude ECLIPSE relie de façon significative la présence de ce polymorphisme particulier au taux de *CCSP* des patients BPCO (172). De plus, on trouve aussi une corrélation inverse entre la présence de l'allèle A et le taux de transcrit *CCSP* présent dans l'expectoration induite. Cependant, ces résultats n'ont pas été retrouvés dans d'autres cohortes (the International COPD Genomics Network [ICGN] and COPDGene), sûrement du fait de la petite taille de l'échantillonnage et des différences au niveau des critères d'inclusion.

Dans la cohorte Lovelace Smokers, deux polymorphismes dont G38A (le deuxième étant rs2509963) sont associés au déclin rapide de la fonction respiratoire ainsi qu'à l'altération du taux de *CCSP* dans le plasma (173).

Enfin, des poumons de donneurs porteurs de l'allèle A en position 38 au niveau du promoteur du gène *CCSP* sont associés à des taux de *CCSP* diminué dans le LBA du receveur après transplantation de poumons (171).

3. 5. Souris knock-out (KO)

L'étude de lignées murines *CCSP*^{-/-} a permis d'avancer dans la compréhension des fonctions physiologiques de la protéine CCSP. Stripp et al. (174) ont généré des souris *CCSP*^{-/-} à partir de souris de la souche-129. L'insertion de la cassette PGK-néo (gène hybride comprenant le promoteur de la PhosphoGlucoKinase et la séquence de la néomycine) dans le premier exon de *CCSP* permet d'interrompre l'expression du gène. En utilisant une stratégie différente, un autre modèle a été développé dans un autre laboratoire, par l'équipe de Zhang et al. (175) en supprimant cette fois-ci une partie du deuxième exon et une partie d'intron. Cette deuxième souche est la souris C57BL/6 *CCSP*^{-/-} .

Les souris souche-129 CCSP^{-/-}

Dans ce modèle, la déficience en protéine CCSP est associée à des changements structuraux au niveau des cellules Club : moins de granules de sécrétion, une réduction majeure de la présence de réticulum endoplasmique rugueux et des altérations au niveau de l'appareil de Golgi. De plus, la déficience en protéine CCSP semble associée à une composition altérée du liquide de surface des voies respiratoires (174). Ceci peut induire une plus grande susceptibilité des cellules épithéliales aux agressions extérieures.

Les souris-129 *CCSP*^{-/-} ont été placées en situation d'hyperoxie. Ainsi, il a été constaté que celles exposées à plus de 95% d'oxygène subissaient une mort prématurée due à un œdème pulmonaire et une augmentation de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β et IL-3 (176). Lorsqu'exposées à l'ozone, on retrouvait une augmentation d'ARNm d'éotaxine, de macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α et MIP-2 (177), ainsi qu'une réduction de la présence de Cyp2f2 (178). Ces données suggèrent que CCSP a un rôle important dans la régulation du stress oxydant.

Après une infection virale ou après exposition à des pathogènes extérieurs tels que *Pseudomonas aeruginosa*, les souris *CCSP*^{-/-} ont une réponse inflammatoire plus élevée avec une augmentation de production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6,

IL-1 α , et TNF- α) et de chimiokines (MIP-1 α , MIP-2 et monocyte chemotactic protein (MCP)-1) (179-181). Ce qui démontre que CCSP aurait une fonction anti-inflammatoire.

Enfin, CCSP semble inhiber la voie de signalisation des phospholipases A (PLA)₂ cytosolique (PLA₂c), une étude ayant montré que l'activité PLA₂ était significativement augmentée chez les souris CCSP^{-/-} (182).

Les souris C57BL/6 CCSP^{-/-}

Cette lignée de souris présente un phénotype létal (Figure 27) ; en cause des dépôts anormaux de fibronectine et de collagène provoquent une insuffisance rénale (175), ceci n'étant pas observé dans la lignée précédemment décrite.



Figure 27 : Souris sauvage (à gauche) et souris C57BL/6 CCSP^{-/-} (à droite) selon Mukherjee et al.

Les quelques souris CCSP^{-/-} qui arrivent à survivre au-delà de quelques mois développent des tumeurs, suggérant que la protéine CCSP a un rôle dans l'inhibition du développement tumoral. Cela a été confirmé *in vitro*, l'ajout de CCSP recombinant sur 13 lignées cellulaires tumorales permettant l'inhibition de la prolifération et de l'invasion cellulaire sur matrigel (183).

Ce n'est que plus récemment que ce modèle a servi pour l'étude et la compréhension des mécanismes de la BPCO. Après exposition de cette lignée de souris CCSP^{-/-} à la fumée de cigarette, Park et al. ont conclu que CCSP ne semblait pas modifier le risque de développer les caractéristiques de la BPCO (184). Or, Lacho-Contreras et al.

démontrent que ces souris KO développent une susceptibilité à la fibrose péribronchiolaire et à l'emphysème lorsqu'elles sont exposées à la fumée de cigarette. Egalement, ces souris présentent une inflammation exagérée au niveau des voies aériennes respiratoires avec une métaplasie de cellules à mucus et une apoptose cellulaire bronchique et alvéolaire augmentée. Les effets néfastes de la fumée de cigarette sont même corrigés grâce à un traitement inhalé de CCSP (185). Ces observations, très prometteuses, montrent que CCSP a un rôle majeur dans le maintien et l'équilibre de l'épithélium respiratoire bronchique. Les divergences de résultats entre ces deux dernières équipes, sur la même lignée de souris CCSP^{-/-}, s'expliqueraient par les différences de protocole d'exposition à la fumée de cigarette.

3. 6. La fonction anti-inflammatoire

Comme nous avons pu le voir précédemment, la protéine CCSP est multifonctionnelle. Elle semble pouvoir limiter le développement et la progression de la BPCO, en partie en réduisant l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette. Cette action peut cibler différents types cellulaires, impliqués dans la pathogénèse de la BPCO, comme les cellules épithéliales ou encore les neutrophiles.

Effet sur les cellules épithéliales et effet sur les neutrophiles

La supplémentation en CCSP recombinante humaine réduit la production d'IL-8 induite par les lipopolysaccharides (LPS) ou l'IL-13 (ainsi que la production de MUC5AC) (186) dans des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Aussi, il a été démontré que CCSP inhibait de manière dose-dépendante le chimiotactisme des neutrophiles stimulés par du N-FormylMéthionyl-Leucyl-Phénylalanine (fMLP) (187). Des études faites chez des chevaux, pouvant de façon naturelle présenter une obstruction des voies respiratoires s'apparentant à de l'asthme, montrent un marquage important de CCSP au sein des neutrophiles lorsqu'ils sont en condition d'exacerbation (marquages atténués lorsque l'animal était en rémission). De plus, l'incubation des neutrophiles sanguins et de ceux du LBA

obtenus à partir de chevaux malades avec du CCSP permet de réduire de façon significative le stress oxydant et l'activité phagocytaire de ces neutrophiles (188).

CCSP est reconnue comme un inhibiteur naturel de la fonction des neutrophiles dans le syndrome de détresse respiratoire aigu (189). Bien que plusieurs études aient été réalisées, le mécanisme moléculaire reste toujours inconnu. Une piste est un effet via le récepteur. En effet, la chimioattraction du fMLP est médiée par une famille de récepteurs couplés à la protéine G, les formyl peptide receptor (FPRs) (190). Ray et ses collègues ont montré que CCSP se liait au récepteur FPR2 et que cela induisait une inhibition du chimiotactisme des neutrophiles (191).

CCSP et son implication dans les voies de signalisation

CCSP semble donc inhiber l'activation de plusieurs voies de signalisation pro-inflammatoire, mais le détail du mécanisme d'action reste encore inconnu. Les interactions les plus étudiées sont celles entre CCSP et PLA2 / Nuclear Factor-kappa B (NF-κB).

Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer que CCSP inhibait plusieurs types d'enzymes PLA2, en l'occurrence les PLA2 sécrétoires (PLA2s) de type Ib et IIa et la PLA2c de type IV (Figure 28) (182, 192, 193).

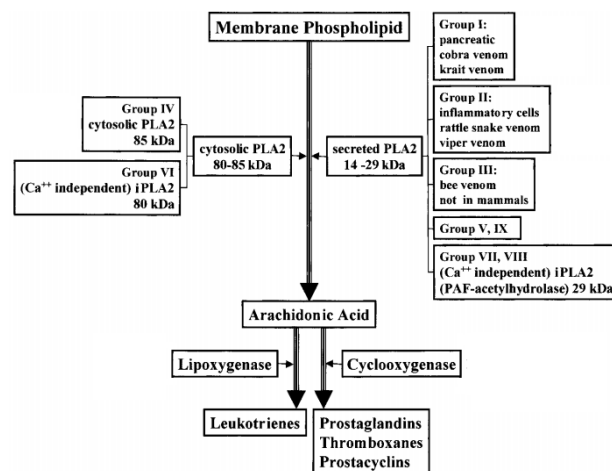


Figure 28 : Les différents types de PLA2 et leurs actions selon Cao et al.

Comme nous l'avons vu, CCSP de par sa poche hydrophobe, permet de lier différentes molécules. Il s'avère que la protéine se lierait au calcium (194) et à la phosphatidylcholine (195) qui servent respectivement de co-facteur ou de substrat à la PLA2s, perturbant à ce niveau aussi la voie de signalisation PLA2 et de ce fait inhibant la cascade de l'acide arachidonique.

Enfin, il a été démontré *in vitro* que CCSP inhibait l'activation de la voie NF- κ B dans des cellules épithéliales pulmonaires (150, 196) et des cellules pulmonaires cancéreuses (197). La sur-expression de CCSP via un plasmide transfecté dans des cellules épithéliales nasales permet d'inhiber l'activation de la voie NF- κ B par le blocage de la phosphorylation d'I κ B- α (inhibitor of NF- κ B subunit- α) réduisant ainsi la dégradation de cet inhibiteur (196).

4. Synthèse des rôles des cellules Club et de la protéine CCSP

Rôle Cellules Club	Modèle	Références bibliographiques
Métabolisme des xénobiotiques :		
Taux de GSH élevé	Souris Humain	West et al. 2002 (97) http://amazonia.transcriptome.eu/ (98)
Forte concentration en CYP	Rat	Weller et al. 1997 (101)
Prolifération/ différenciation :		
Renouvellement normal (niveau proximal)	Souris	Rawlins et al. 2009 (106)
Renouvellement normal (niveau distal)	Humain (Revue) Souris	Boers et al. 1999 (34) Stripp et al. 2008 (38) Guha et al. 2012 (118)
En condition d'agression (niveau distal)	Souris Rat Souris Souris Souris Souris	Perl et al. 2011 (105) Evans et al. 1976 (108) Hong et al. 2001 (110) Van Winkle et al. 1995 (117) Kim et al. 2005 (111) Giangreco et al. 2002 (119)

Tableau 7 : Récapitulatif des rôles évoqués des cellules Club.

Rôle protéine CCSP	Modèle	Références bibliographiques
Protéine ligand :		
Progestérone	Pharmacologique Pharmacologique/simulation	Beato et al. 1976 (145) Dunkel et al. 1995 (146)
PCB	Pharmacologique/ simulation Souris	Gillner et al. 1988 (147) Stripp et al. 1996 (148)
Rétinol	Pharmacologique	De Haro et al. 1994 (149)
PG-D2	Humain/Souris	Mandal et al. 2004 (151)
PG-F2 α	Humain	Mandal et al. 2005 (151)
Calcium	Pharmacologique	Andersson et al. 1994 (194)
Phosphatidylcholine	Pharmacologique	Umland et al. 1994 (195)
Polymorphisme et susceptibilité aux maladies :		
Asthme et rhinite allergique	Humain	Ku et al. 2011 (167)
Lupus érythémateux et néphropathie IgA	Humain	Menegatti et al. 2002 (168)
Sarcoïdose	Humain	Ohchi et al. 2004 (169)
Syndrome de détresse respiratoire aigu	Humain	Frerking et al. 2005 (170)
Syndrome de bronchiolite oblitérante	Humain	Bourdin et al. 2012 (171)
BPCO	Humain	Kim et al. 2012 (172)
Protéine impliquée dans la régulation :		
du stress oxydant	Souris Souris	Johnston et al. 1997 (176) Johnston et al. 1999 (177)

	Souris	Mango et al.1998 (178)
de l'inflammation (virus)	Souris	Wang et al. 2003 (179)
(virus)	Souris	Harrod et al. 1998 (180)
(bactérie)	Souris	Hayashida et al. 2000 (181)
Action au niveau :		
Des cellules épithéliales	Souris	Lauchó-Contreras et al. 2015 (185)
	Humain	Tokita et al. 2014 (186)
Du déplacement des neutrophiles	Pharmacologique	Vasanthakumar et al. 1988 (187)
	Cheval	Katavolos et al. 2011 (188)
	Humain	Geerts et al. 2001 (189)
	Souris	Ray et al. 2006 (191)
Protéine impliquée dans les voies de signalisation :		
PLA2 (via liaison au calcium) (via phosphatidylcholine)	Souris	Yoshikawa et al. 2005 (182)
	Pharmacologique	Mantile et al. 1993 (193)
	NR	Miele et al. 1987 (192)
	Pharmacologique	Andersson et al. 1994 (194)
	Pharmacologique	Umland et al. 1994 (195)
NF-κB	Souris / Humain	Long et al. 2012 (196)
	Humain	Yoon et al. 2005 (197)

Tableau 8 : Récapitulatif des rôles évoqués de la protéine CCSP.

5. Guerres et opportunités thérapeutiques : Ypérite et cellules Club

La commémoration de la Première Guerre Mondiale nous permet de rappeler que le tabac n'est pas l'unique cause de BPCO.

Le 2,2'-dichlorodiéthyle (autrement dit gaz moutarde ou ypérite) a été utilisé pour la première fois pendant la Première Guerre Mondiale en 1917. La principale cause de mortalité à court terme liée à cette arme chimique est d'origine pulmonaire.

En 1922, une étude clinique menée sur 83 vétérans de la Première Guerre Mondiale, reconnus grands invalides de guerre en raison d'une intoxication au gaz moutarde, rapporte que les principaux symptômes sont une dyspnée, une toux chronique et des expectorations. 26% d'entre eux présentaient de l'emphysème, et 20%, des signes cliniques de bronchite chronique. Dans la même année, Hankins et al. confirment ces résultats (198, 199); Comme nous l'avons expliqué précédemment, ces deux entités de nos jours se regroupent sous le terme de BPCO.

Cliniquement, l'exposition à l'ypérite se caractérise par une insuffisance respiratoire aiguë (agression physico-chimique des voies aériennes, bronchospasme, œdème lésionnel) et sur le long terme, par le développement de bronchopathie chronique, principalement BPCO et asthme (200, 201).

Permettant la détoxification des xénobiotiques et des particules gazeuses nocives et ayant un rôle progéniteur en cas d'agression de l'épithélium respiratoire (105, 106) les cellules Club pourraient avoir un potentiel thérapeutique intéressant concernant toutes agressions par arme chimique de l'épithélium respiratoire.

PRESENTATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Il n'existe pas de traitement curatif de la BPCO et les recommandations de prise en charge ainsi que les traitements utilisés sont essentiellement symptomatiques. La protéine CCSP, produite par les cellules Club au niveau de l'épithélium respiratoire, est déficitaire chez les patients atteints de BPCO. Il semblerait que cette protéine soit un anti-inflammatoire endogène puissant. Ainsi, rétablir sa production endogène ou supplémenter de façon exogène l'épithélium respiratoire bronchique pourrait avoir un intérêt thérapeutique.

Le but de ce travail est de comprendre la régulation et les différents rôles de la protéine CCSP afin d'en évaluer son intérêt thérapeutique potentiel.

Au cours de ce travail de recherche, nous avons effectué des travaux visant à comprendre la régulation endogène de la protéine CCSP ainsi que les effets de sa supplémentation exogène sur l'épithélium respiratoire bronchique.

Dans une première partie, nous avons étudié **l'influence du polymorphisme G38A du gène CCSP sur la transcription de CCSP**. *In vivo*, nous avons conduit une étude observationnelle prospective avec des patients BPCO suivis sur 1 an. *In silico*, nous avons étudié la conservation du site allélique et la probabilité de fixation des facteurs de transcription sur le site polymorphique. Enfin, *in vitro*, nous avons développé un modèle d'étude du polymorphisme du gène CCSP par transfection de vecteurs contenant soit l'allèle sauvage soit l'allèle muté dans des cellules BEAS-2B, lignée transformée de cellules épithéliales bronchiques humaines.

Dans une deuxième partie, nous avons travaillé sur **l'épithélium bronchique en utilisant des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines**. Nous avons étudié :

- **les cellules CCSP+ dans ce modèle ex vivo**. Nous avons caractérisé notre modèle par microscopie électronique à transmission ainsi qu'à balayage, puis par microscopie confocale afin d'analyser la morphologie des cellules. Les différents types cellulaires ont été mis en évidence par marquages immunofluorescents et la protéine CCSP a été révélée par immunogold en microscopie électronique à transmission. Enfin, nous

avons utilisé le naphthalène ou le paraquat pour dépléter nos épithélia en cellules CCSP+.

- **les facteurs de succès de la prise de la culture en interface air-liquide.** Le but de ce travail étant de chercher à mieux comprendre notre modèle d'étude.

Enfin, dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés aux **effets de la supplémentation exogène de la protéine CCSP sur l'épithélium respiratoire bronchique.** A partir du modèle cité ci-dessus et développé dans le laboratoire, nous avons étudié :

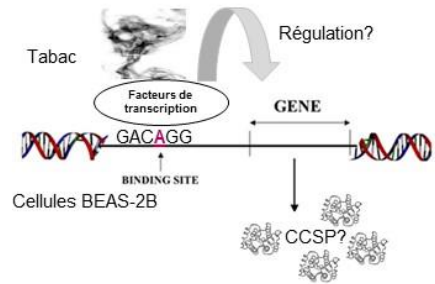
- **l'action de CCSP sur l'inflammation induite par le tabac.** Le but de ce travail était d'analyser l'effet thérapeutique potentiel de la protéine en supplémentant les épithélia en CCSP.

- **l'action de CCSP sur les neutrophiles, directe ou via l'épithélium bronchique.** Nous avons évalué le chimiotactisme des neutrophiles en utilisant des chambres de Dunn, un système s'affranchissant de la gravité pour observer la migration des neutrophiles dans un gradient de substances chimioattractantes. Les substances chimioattractantes étant symbolisées ici par le sécrétome des cultures en ALI ou encore la protéine CCSP seule. Enfin, la technique de co-immunoprécipitation nous a permis de vérifier nos hypothèses.

- **les variations du profil protéomique des sécrétions engendrées par la supplémentation en CCSP.** A partir d'un modèle de culture cellulaire NCI-H292, nous avons analysé le protéome sécrété suite à l'ajout de CCSP et suite à l'action de CCSP sur une inflammation induite par le tabac.

PARTIE 1 : Régulation endogène de CCSP

Article 1 : CCSP G38A polymorphism-environment interactions regulate CCSP levels differentially in COPD. (soumis à l'*AJPLung*)



PARTIE 2 : Caractérisation des cellules Club dans un modèle ex vivo d'épithélium bronchique

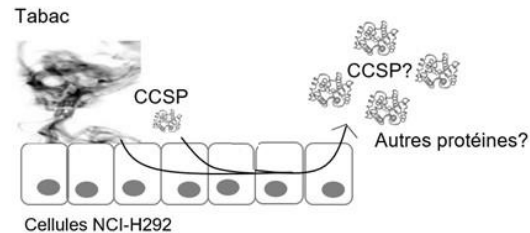
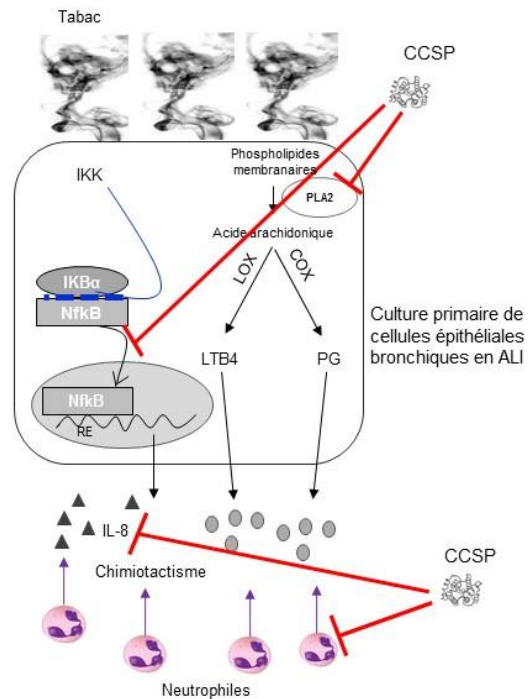
Article 2 : Characterization of Club Cell Secretory Protein Producing Cells in an *Ex Vivo* COPD Culture Model. (presentation poster A5927 ATS 2016, en cours de rédaction, pour soumission *AJRCMB*)

Article 3 : Epithelial ciliated beating cells, a key factors for *ex vivo* ALI culture success growth. (pour soumission *Lab Invest*)

PARTIE 3 : Supplémentation exogène en CCSP

Article 4 : Supplementing defect in Club Cell Secretory Protein attenuates airway inflammation in COPD. (*Chest*, 2014)

Article 5 : How does CCSP counterbalance airway epithelial-driven neutrophilic chemotaxis due to cigarette smoke? (pour soumission *AJRCCM*)



Article 6 : CCSP regulated CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells. (en cours de rédaction, pour soumission *Respirology*)

RESULTATS

I. Régulation endogène de *CCSP*

1. Résumé

Le polymorphisme G38A au niveau de la région promotrice du gène *CCSP* a été associé à plusieurs maladies inflammatoires (167-171). Il a notamment été lié dans la BPCO au taux de *CCSP*, avec une corrélation inverse entre l'allèle A et le taux de transcrite *CCSP* présent dans l'expectoration induite (172). Enfin, des poumons de donneurs porteurs de l'allèle muté sont associés à des taux de *CCSP* diminués dans le LBA après transplantation de poumons (171).

Notre hypothèse est que l'altération de l'homéostasie des voies aériennes dans la BPCO pourrait être partiellement reliée au déficit en protéine *CCSP* au niveau des voies aériennes distales. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence du polymorphisme G38A sur la transcription de *CCSP* et nous avons examiné les facteurs pouvant jouer sur la régulation du gène muté.

Nous avons évalué les taux de *CCSP* dans le sérum et l'expectoration induite de patients BPCO du groupe AA+AG (contenant au moins une fois l'allèle A en position 38 du gène *CCSP*) en comparaison à des patients du groupe GG (sans polymorphisme). Nous avons analysé l'expression de *CCSP* en fonction du statut tabagique des patients. Des études *in silico* nous ont permis d'étudier la phylogénie du site allélique et la probabilité de fixation de facteurs de transcription sur le site polymorphique. De plus, nous avons modélisé *in vitro* le polymorphisme G38A du gène *CCSP* par des constructions courtes ou longues soit contenant l'allèle G, sauvage, soit contenant l'allèle A, muté, transfectées dans des cellules épithéliales pulmonaires, les BEAS-2B. Enfin, nous avons réalisé des co-transfections avec des vecteurs contenant des facteurs de transcription tels que Nkx2.1 ou p53, en présence/absence de CSE ou de LPS.

Nous avons montré que :

- 1) Les taux de CCSP sérique et dans le surnageant d'expectoration induite de patients BPCO du groupe AA+AG sont significativement plus bas que ceux du groupe GG ($p = .002$ et $.013$ respectivement) (Figure 1a). Les patients BPCO avec un indice de BODE qui se détériore sur les 1 an de suivi sont plus fréquemment porteurs de l'allèle A ($p < .0001$) (Figure 1a). Enfin, le taux de CCSP sérique est affecté par l'interaction polymorphisme/statut tabagique, les taux les plus bas étant observés pour les patients BPCO porteurs de l'allèle A et toujours fumeurs (Figure 1b).
- 2) L'analyse *in silico* de la conservation du site allélique montre que l'allèle G est conservé au sein des Primates (Figure 2). Cependant, nous avons observé que les animaux proches du sol ont tendance à être porteur de l'allèle A. Deux facteurs de transcription semblent se fixer au site polymorphique (lorsque l'allèle est A) : p53 et Thing1-E47 (Figure 5a). Nkx2.1, lui, a de nombreux sites de fixation sur le promoteur du gène *CCSP* sauf aux alentours de la position 38 (Figure 5b).
- 3) *In vitro*, à l'état de base, le polymorphisme n'influence pas la transcription de *CCSP*, quelque soit la taille du promoteur (Figure 3). Les résultats des promoteurs distaux étant identiques aux proximaux, nous avons décidé, pour plus de clarté, de ne représenter que les résultats des promoteurs proximaux.
- 4) En présence de CSE, les constructions contenant l'allèle muté A produisent significativement moins de transcrit *CCSP* que les constructions sauvages ($p = .002$) (Figure 4a). Le LPS réprime la transcription du gène mais il n'y a pas de différence selon le polymorphisme (Figure 4b). Enfin, Nkx2.1 induit bien la transcription de *CCSP* quelque soit le polymorphisme de façon significative ($p < .001$) (Figure 5c). P53 induit une transcription différente selon le polymorphisme, réprimant *CCSP* lorsque l'allèle est sauvage (Figure 5d). Il n'y a pas de synergie observée lorsque la cotransfection du vecteur p53 est faite en présence de CSE (Figure 6).

2. Article 1 : « CCSP G38A polymorphism-environment interactions regulate CCSP levels differentially in COPD. »

Soumis à l'*AJPlung*

CCSP G38A polymorphism-environment interactions regulate CCSP levels differentially in COPD

Lucie Knabe^{1, 2}, Jessica Varilh³, Anne Bergougnoux⁴, Anne-Sophie Gamez², Jennifer Bonini³, Alexandra Pommier³, Aurélie Petit², Nicolas Molinari⁵, Isabelle Vachier², Magali Taulan-Cadars³, and Arnaud Bourdin^{1, 2}.

1. PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214.
2. Department of Respiratory Diseases, Montpellier University Hospital, Montpellier, France.
3. EA7402, Montpellier University, Montpellier, France.
4. Molecular Genetics Laboratory – IURC, Montpellier University Hospital, Montpellier, France.
5. IMAG U5149, Department of Medical Information, Montpellier University Hospital Montpellier, France.

Running Title: CCSP G38A polymorphism in COPD

Corresponding author: Pr Arnaud Bourdin. Département de Pneumologie et Addictologie, Hôpital Arnaud de Villeneuve. CHU Montpellier. 371 Av. Doyen Gaston Giraud. 34295 MONTPELLIER Cedex 5, France. E-mail: a-bourdin@chu-montpellier.fr

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

1 **Abstract**

2 Impaired airway homeostasis in COPD could be partly related to Club Cell Secretory Protein
3 (CCSP) deficiency. We assume that *CCSP* G38A polymorphism is involved and aim to examine
4 the influence of the *CCSP* G38A polymorphism on *CCSP* transcription levels and its regulatory
5 mechanisms. *CCSP* genotype and CCSP levels in serum and sputum were assessed in 66
6 subjects with stable COPD included in a one-year observational study. 49 of them had an
7 exacerbation. In an *in vitro* study, the impact on the *CCSP* promoter of 38G wild type or 38A
8 variant was assessed. BEAS-2B cells were transfected by either the 38G or 38A construct alone
9 or co-transfected with Nkx2.1 or p53 expression vectors, in the presence/absence of cigarette
10 smoke extract (CSE) or lipopolysaccharides (LPS). Allele carriers COPD patients had lower
11 serum and sputum CCSP levels, especially among active smokers, and a decreased BODE
12 score. *In vitro*, baseline *CCSP* transcription levels were similar between the wild and variant
13 constructs. CSE decreased more profoundly the *CCSP* transcription level of 38A compared to
14 38G transfected cells whereas the opposite effect was observed with p53 cotransfection. LPS
15 stimulation induced *CCSP* repression in 38A promoter transfected cells. Cotransfection with
16 Nkx2.1 significantly activated the *CCSP* promoters irrespective of the polymorphism.
17 Circulating CCSP levels are associated with smoking and the *CCSP* G38A polymorphism.
18 CSE, LPS and the Nkx2.1 and p53 transcription factors modulated the *CCSP* promoter
19 efficiency. The 38A polymorphism exaggerated the *CCSP* repression in response to p53 and
20 CSE.

21

22 **Keywords:** G38A polymorphism, CSE, CCSP, CC10, COPD

23

24 **Introduction**

25 Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is among the chronic diseases with the highest
26 morbidity and mortality burdens worldwide. Cigarette smoking is one of the main risk factors
27 of COPD, yet, only 25% of smokers develop the disease (7, 19). Multiple genetic factors may
28 influence the pro-destructive effect of cigarette smoke (25, 34-35).

29 Club Cell Secretory Protein (CCSP, CC10, international nomenclature SCGB1A1) belongs to
30 the secretoglobin family consisting of small disulphide bridge dimeric proteins. It is one of the
31 most abundant proteins secreted by the respiratory epithelium (up to 5% of the total protein
32 quantity recovered from a bronchoalveolar lavage) (2). CCSP is secreted by non-ciliated
33 epithelial club cells present in all airways, but more predominantly in the small airways. *CCSP*
34 gene is located on the human chromosome 11q12.3-13.1, a region occupied by other genes
35 involved in the regulation of inflammation (36). The 4995-bp long gene comprises a 5'
36 untranslated region of 550 bp and three short exons (118, 187 and 135 bp). Mutational screening
37 of the three exons detected an adenine to guanine substitution at position 38 (G38A),
38 downstream from the exon 1 transcription initiation site and within the non-coding region of
39 exon 1 (11). The G38A alteration described corresponds to c.-26G>A (GeneBank
40 NM_003357.4) with Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) ID number rs3741240.

41 CCSP may protect against the pro-inflammatory response in the lung (9, 14, 16, 30). Serum
42 CCSP level is a predictive biomarker of accelerated lung function decline in the ECLIPSE study
43 (32), and a predictor of lung function and development of COPD across the lifespan (10).
44 Noteworthy, serum CCSP levels were reduced in COPD patients and also correlated to smoking
45 status (17, 27).

46 Exogenous CCSP supplementation decreased the epithelial release of Interleukin(IL)-8 and
47 Mucin(MUC)5AC (9, 16, 30). Moreover, *CCSP* knockout mice exposed to cigarette smoke

48 developed a COPD-like phenotype reversible by exogenous CCSP supplementation (16). *CCSP*
49 G38A polymorphism has been associated with increased susceptibility to inflammatory lung
50 disorders, e.g. asthma, post-transplant obliterative bronchiolitis, acute respiratory distress
51 syndrome and sarcoidosis (3, 8, 15, 20, 21). This is supported by the genome-wide significant
52 association between G38A polymorphism and circulating CCSP levels in the ECLIPSE study
53 (13). A negative correlation between the presence of the A allele and the level of *CCSP* mRNA
54 expression in the induced sputum was also reported (13). Finally, donor *CCSP* G38A
55 polymorphism was associated with decreased CCSP levels in the bronchoalveolar lavage fluid
56 early after lung transplantation (3). These observations support the therapeutic ambition and
57 deserve research to better identify determinants of the transcription levels.

58 We hypothesized that the G38A *CCSP* gene polymorphism may alter either the production of
59 the protein and/or its activity. Thus, to better understand the molecular triggers involved, we
60 obtained data from COPD patients and implemented an *in vitro* model allowing modulations of
61 the *CCSP* promoter using a luciferase reporter.

62 **Materials and methods**

63 *Clinical study design*

64 66 patients were enrolled in a one-year prospective observational study (CLARA study,
65 EudraCT: 2009-A01200-57 approved by the ethics committee) to assess the potential of CCSP
66 as a surrogate biomarker in COPD. Patients were included at steady state if they met the
67 inclusion criteria (FEV1/FVC <0.7, smoking > 10 PY, no other respiratory disease than COPD,
68 optimally treated according to best standard of care, aged 40 to 80 years) and after signing the
69 informed consent. At the inclusion visit (V0) and one month later (V1), demographic and
70 functional data were recorded, and induced sputum and blood samples were obtained. A
71 separate specific inform consent form was obtained for genetic analysis. The BODE score was
72 computed according to body mass index, FEV1, dyspnea and 6-minute walking test (5). Patients
73 were asked to attend the clinic at the time of the first exacerbation (VX) and one month later
74 (VX+1). The final visit (V12) was planned one year after V0. COPD prognosis was estimated
75 based on the BODE score trend between V0 and V12 (“COPD progressors” were considered
76 when the BODE score increased).

77 **CCSP genotype and CCSP assay**

78 G38A genotyping was performed after blood DNA extraction using the RFLP method (22) to
79 define G/G group and A/G + A/A group. CCSP were quantified in serum and induced sputum
80 by ELISA using Human Club Cell Protein (CC16) ELISA (Biovendor, Czech Republic),
81 according to the manufacturer’s protocol.

82

83

84

85 *In vitro study*

86 **Computational analyses**

87 *CCSP* minimal and distal promoters were determined by assessing the importance of promoter
88 sequence conservation based on multiple sequence alignments of the sequence upstream the
89 ATG of various species (human, rat, rabbit, horse and mouse) using BLAST® software, and on
90 existing literature (1, 6, 18, 23, 26). The importance of the G38A polymorphic site was assessed
91 by evaluating its conservation through evolution, using ClustalW2 phylogeny software.
92 Potential binding sites to the G38A locus were performed using ConSite. The threshold was
93 designed at a score cutoff of 75.0 % (highest: 100.0%) to optimize both sensitivity and
94 specificity.

95 **Plasmid constructions**

96 Expression plasmids containing either the wild-type 38G or the mutated 38A minimal (229bp)
97 or distal (926bp) promoters downstream of the pGL3-Basic plasmid were constructed to
98 evaluate the transcription efficiency of the *CCSP* promoter. Based on computational analyses
99 and the sequence of the *CCSP* gene, 2 constructs were generated from genomic DNA of NCI-
100 H292, human pulmonary carcinoma cell lines, heterozygous for the G38A variant. PCR primers
101 were designed to amplify a minimal promoter of 229 bp and a distal promoter of 926 bp, using
102 Primer3Plus. The PCR product was cloned into pGL3-Basic vector (Promega, USA), and
103 sequenced. After verification of the PCR products, they were restricted with XhoI and NcoI
104 endonucleases and then ligated using heat-shock protocol into the pGL3-Basic vector
105 downstream of the luciferase cDNA. Chemically competent *Escherichia coli* JM109 (Promega,
106 USA) were transformed. Positive clones were selected after verification conducted through
107 DNA sequencing. The successfully constructed plasmids were named 229bp-38G; 229bp-38A
108 and 926bp-38G, 926bp-38A.

109 For co-transfection assays, the following expression vectors were used: pCMV6-XL4-Nkx2.1
110 and its control vector pCMV6-XL4, provided from OriGene; pcDNA3.1-TP53 and its control
111 vector pcDNA3.1, constructed from pC53-C1N, generously gifted by Pr D. Reisman
112 (University of South Carolina). The full length human TP53 cDNA was excised from the
113 plasmid with ApaI and XhoI and ligated into the pcDNA3.1 expression vector. All the primers
114 are listed on Table 1.

115 **Cell culture and transfection assays**

116 Human pulmonary epithelial BEAS-2B cell line obtained from ATCC was grown in DMEM
117 1640 completed with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% ultroser G, 1% antibiotics and 1% L-
118 glutamine. They were seeded at a density of about 10,000 cells/100 μ l of medium and plated in
119 96-well plates. After a culturing period of 28 hours, cells were transfected with Fugene6®
120 transfection reagent (Roche, France) according to the manufacturer's recommendations. For
121 transient transfection, 72 ng of each CCSP constructs and 8 ng of internal control pRL-SV40
122 containing Renilla luciferase (Promega, USA) were used. For cotransfection experiments, 40
123 ng of either pCMV6-XL4-Nkx2.1 or pCMV6-XL4 vectors and 10 ng of pcDNA3.1 or
124 pcDNA3.1-P53 vectors were also transfected. After 24 hours, cells were cultivated with or
125 without CSE at a different concentration and with or without LPS. Samples were harvested 48
126 hours after transfection. The luciferase activity was evaluated using Dual Luciferase Reporter
127 Assay System (Promega, France). Luminescence measurements were performed on a
128 Luminoskan Ascent luminometer (ThermoLabsystem Corporation, France). Firefly luciferase
129 activity was normalized to Renilla luciferase activity. All luciferase activities represent at least
130 4 independent experiments with each construct tested in triplicate per experiment.

131

132

133 **Cigarette smoke extract (CSE)**

134 CSE was prepared as previously described (9): the smoke of 3 commercial cigarettes
135 (Marlboro®) was withdrawn into a Pasteur pipette and bubbled into 30 ml of DMEM 1640
136 containing 5% FBS, 1% ultrosor G, 1% antibiotics and 1% L-glutamine. CSE was adjusted at
137 pH 7.4 and sterilized through a 0.22µm filter.

138 **Statistical analyses**

139 Clinical data were expressed as means±SD. Homozygous (G/G) patients were compared to
140 heterozygous (G/A) and homozygous (A/A) patients using a Mann-Whitney test for
141 quantitative data and a Fisher test for qualitative data. Mixed effect models were built to test
142 differences of serum and sputum levels of the CCSP protein at different visits based on the
143 G38A SNP and the BODE score trend.

144 Transfection data were expressed as means±SEM. Paired comparisons were made using
145 Wilcoxon matched pair tests.

146 Data were considered statistically significant at $p < 0.05$. All graphical data and statistical
147 analyses were generated with GraphPAD Prism software (Version 6.0).

148 **Results**

149 **Clinical study**

150 Subject baseline characteristics are displayed in Table 2. Patients had mild to moderate COPD,
151 were mostly male and had a similar cumulative smoking history. The G/G patient group was
152 older than the A/G + A/A group. Serum and induced sputum CCSP levels were significantly
153 higher in G/G patients compared to A/A + A/G patients ($p=.002$ and $.013$ respectively)
154 suggesting that CCSP production was affected by the G38A polymorphism (Figure 1a). COPD
155 progressors defined by a worsening BODE score at one year were more frequently A allele
156 carriers ($p<.0001$) (Figure 1a). Influences of the G38A polymorphism and smoking status on
157 blood CCSP level are described in Figure 1b. Serum CCSP levels were significantly affected
158 by the interaction between G38A polymorphism and the smoking status ($p=0.02$ for overall
159 interaction) (Figure 1b). The lowest CCSP levels were seen in A allele carriers still actively
160 smoking.

161 ***In silico* study: G38 allele conservation**

162 To evaluate the importance of this polymorphic site, orthologous *CCSP* promoter regions from
163 several mammalian species classically representing Primates (Rhesus macaque, Human,
164 Common chimpanzee, Western lowland gorilla, Northern white-cheeked gibbon), Carnivora
165 (Cat), Rodentia (House mouse, Brown rat), Lagomorpha (European rabbit) and Soricomorpha
166 (Common shrew) were compared *in silico* using ClustalW multiple *CCSP* sequence alignments.
167 The human *CCSP* promoter was remarkably conserved (Figure 2). A strict homology for the
168 38G allele was observed in the primates studied, whereas more genetically distant species
169 carried the A allele.

170

171

172 ***In vitro* study: CCSP baseline**

173 Transcriptional regulation of CCSP was assessed through a reporter assay using different
174 constructions containing either the wild-type (WT) 38G or the mutated 38A minimal or distal
175 promoters. Luciferase activity, reflecting basal activity of the *CCSP* promoter, indicated no
176 significant difference between the WT and the 38A variant, irrespective of the length of the
177 constructions (Figure 3).

178 ***In vitro* study: Influence of CSE, LPS and transcription factors on CCSP promoter**
179 **activity**

180 CSE influence was subsequently assessed. CSE repressed *CCSP* transcription. This repression
181 was significantly more intense with the 38A variant compared to the 38G WT construction (p-
182 value: 0.02) (Figure 4a). LPS was tested to mimic exacerbation conditions. LPS also repressed
183 *CCSP* transcription, significantly with the 38A variant construction (p=.001) (Figure 4b). We
184 obtained exactly the same results with the long construct promoters and data were not
185 represented for clarity.

186 ConSite *in silico* search identified two transcription factors which may bind differentially to the
187 polymorphic site: Thing1-E47 and p53 (scores: 5.487 and 12.917 respectively) (Figure 5a).
188 Elsewhere, many *Nkx2.1* binding sites on the promoter were predicted by this analysis
189 irrespective of the G38A polymorphism (Figure 5b). BEAS-2B cells were co-transfected with
190 the pCMV6-XL4-Nkx2.1 and its control empty vector pCMV6-XL4 with the different CCSP
191 promoter constructs. Co-transfection with Nkx2.1 significantly increased *CCSP* transcription
192 irrespective of the construction tested (p<.001 for each comparison, Figure 5c). Subsequent co-
193 transfection with the pcDNA3.1-P53 and its control empty vector pcDNA3.1 was then tested.
194 P53 decreased the *CCSP* transcription level more intensely with the WT than with the mutated
195 constructions (p=0.03) (Figure 5d). To evaluate whether CSE and p53 exerted synergistic

196 effects, co-transfected cells with either pcDNA3.1-P53 and its control vector pcDNA3.1 with
197 the different CCSP constructs were exposed to CSE. No synergistic effect of CSE and p53 was
198 observed (Figure 6).

199 **Discussion**

200 In this study, we observed that circulating levels of CCSP in COPD patients were influenced
201 both by the G38A polymorphism located in the *CCSP* promoter and by active cigarette
202 smoking. This SNP also affected the COPD prognosis using the BODE score progression in a
203 one-year prospective clinical observational study. We noted that the G allele, at the
204 polymorphic site within the *CCSP* promoter, was highly conserved especially across primates.
205 Thus, *in vitro* experiments confirmed the deeper repression induced by CSE on *CCSP*
206 transcription levels in A-allele carrying transfected cells. LPS globally repressed *CCSP*
207 transcription in our transfection model. Transcription factors such as p53 was predicted *in silico*
208 to bind the promoter differentially according to the *CCSP* G38A polymorphism. This was
209 further confirmed *in vitro* where p53 repressed the *CCSP* transcription more in G than in A
210 allele transfected cells. Finally, no synergistic effect of CSE and p53 was observed in our
211 transfection model.

212 First, we consider worth recalling that “G38A” is the right nomenclature for this polymorphism,
213 but too often the literature still erroneously refers to it as “A38G”. Nomenclature efforts have
214 been proposed here to use the acknowledged symbol (International nomenclature recommended
215 by the Human Genome Variation Society, <http://www.hgvs.org/mutnomen/>). The present study
216 aims to establish and understand the biological link between this polymorphism within the
217 promoter and the transcription levels. The high level of conservation of the promoter site
218 throughout different animal species improved our confidence in the biological potential of this
219 polymorphism. Interestingly, phylogenetic tree analyses suggested that the G allele was
220 privileged throughout Primates segmentation. We dare hypothesize that the presence of the A
221 allele in the other species could have been influenced by the environment. Indeed, the supposed
222 immunosuppressive ability of CCSP to inhibit neutrophil chemotaxis (31) could be potentially
223 deleterious in highly exposed and stimulated airways closer to the ground.

224 Luciferase reporter is a well-established technique (24) satisfactorily reproducible throughout
225 our assays. Nevertheless, this technique limits information to transcription, and confirmation at
226 the protein level is required. Impact on stability of the *CCSP* mRNA is also neglected. Clinical
227 observations could also result from post-transcriptional modifications impossible to address in
228 the present study.

229 BEAS-2B cells were used for this study because they are of non-tumoral bronchial origin and
230 their endogenous *CCSP* production is nearly absent. This reduces the impact of the cell by itself
231 and makes it a “pure” model for studying transfected *CCSP* promoters.

232 Nkx2.1 strongly activated the *CCSP* gene as reported before (4) irrespective of the SNP as
233 predicted by our *in silico* analysis. This assay was tested as a control of our model. We gained
234 confidence in our model when *in vivo* findings were reproduced as CSE repression of the *CCSP*
235 transcription level was deeper in A-allele transfected cells. This was one further translational
236 confirmation of previous reports from the longitudinal ECLIPSE study (17). Although p53 is an
237 ubiquitous transcription factor critical in cancer, p53 deregulation was already reported in
238 COPD (28, 29). This protein encoded by the antioncogene may be influenced by the exposome
239 mutagenic pressure. We think it may not represent a realistic therapeutic target for modulation.
240 Another candidate transcription factor was identified by Consite *in silico* analysis, “Thing1-
241 E47”. It is a basic helix-loop-helix transcription factor but its link with pulmonary disease is
242 unclear. Moreover, extensive research failed to clearly identify a validated structure.
243 Subsequently, it was not tested in our model.

244 In COPD, exacerbations highly affect the history of the disease (12). Because *CCSP* may play
245 a protective role by maintaining airway homeostasis (14), exacerbations were events of special
246 interest in our longitudinal study. We found no clear influence of the polymorphism in this
247 period and at recovery. *In vivo*, there seems to be no difference regarding the exacerbation. Yet,

248 we showed that LPS, a model of bacteria-induced exacerbations, provoked a stronger *CCSP*
249 repression with the A-allele constructions.

250 Finally, our *in vivo* study confirmed that circulating *CCSP* levels are associated with smoking
251 and G38A polymorphism. Our *in vitro* study supports those findings as CSE repressed the
252 *CCSP* transcription of the A allele transfected cells more intensely than the WT cells.

253 In conclusion, cigarette smoke is a confirmed repressor of *CCSP* transcription amplified by the
254 G38A polymorphism. We demonstrated the potential involvement of a gene-environment
255 interaction in airway susceptibility. We suggest testing whether surveying active smokers with
256 low *CCSP* levels and A allele carriers at this site would help early identification of susceptible
257 patients.

258

259

260

261 **Acknowledgments**

262 We thank D. Reisman from the University of South Carolina for providing the pC53-C1N
263 vector. We also wish to thank Ms Renaud-Mallet Mireille, Interpreter-Translator, member of
264 AMWA, EMWA and SFT, for her contribution in editing this paper.

265

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

268

269

270 **Figure Legend**

271 Figure 1. (a) Evolution of serum and induced sputum CCSP levels depending on BODE
272 prognosis and G38A polymorphism. (b) Evolution of serum CCSP concentrations depending
273 on smoking status and G38A polymorphism. Serum CCSP levels were significantly affected
274 by the combination of interactions between G38A polymorphism and the smoking status using
275 a mixed effect model ($p=0.02$ for overall interaction).

276 Figure 2. Dendrogram representing *CCSP* gene promoter in different animal species; the black
277 arrow highlights the relevant polymorphic nucleotide. The promoter of the *CCSP* gene was
278 highly conserved throughout different species and especially across primates.

279 Figure 3. Left: Four constructions of the *CCSP* promoter mounted with a luciferase reporter
280 sequence (A mutated vs G WT allele, proximal and distal promoters). Right: basal *CCSP*
281 transcription levels according to different constructions and the G38A polymorphism. There
282 was no significant difference between the WT and the 38A variant constructions.

283 Figure 4. (a) Cigarette smoke extract (CSE) repressed *CCSP* transcription. CSE repression was
284 deeper with the A vs. G allele construction ($p=0.03$, Wilcoxon matched pair tests) (b) LPS
285 repressed *CCSP* transcription. Repression was stronger in the A construction.

286 Figure 5. (a) Modification of binding sites induced by the G38A polymorphism according to
287 ConSite. The threshold was designed at 75.0 point (highest: 100.0) to optimize sensitivity and
288 specificity. (b) In depth-in silico analyzes (consite.genereg.net) revealed many Nkx binding
289 sites. (c) Nkx2.1 strongly increased the *CCSP* transcription irrespective of the G38A
290 polymorphism. (d) p53 repressed *CCSP* transcription. Deeper repression was noted in G-allele
291 constructions ($p=0.03$, Wilcoxon matched pair tests).

292 Figure 6. Absence of differential synergistic effect of CSE and p53 cotransfection in *CCSP*
293 transcription levels according to the G38A polymorphism.

294 **References**

295

- 296 1. Abi-Rizk A, Desloire S, Dolmazon C, Gineys B, Guiguen F, Cottin V, Mornex J, Leroux C.
297 Regulation of Clara cell secretory protein gene expression by the CCAAT-binding factor NF-Y.
298 *Archives of Biochemistry and Biophysics* 459: 33-39, 2007.
- 299 2. Bernard A, March FX, Marchandise FX, Depelchin S, Lauwerys R, Sibille Y. Clara cell protein
300 in serum and bronchoalveolar lavage. *The European respiratory journal* 5: 1231-8, 1992.
- 301 3. Bourdin A, Mifsud NA, Chanez B, McLean C, Chanez P, Snell G, Kotsimbos TC. Donor Clara Cell
302 Secretory Protein Polymorphism is a Risk Factor for Bronchiolitis Obliterans Syndrome After Lung
303 Transplantation. *Transplantation Journal* 94: 652-658, 2012.
- 304 4. Cassel TN, Berg T, Suske G, Nord M. Synergistic transactivation of the differentiation-dependent
305 lung gene Clara cell secretory protein (secretoglobin 1a1) by the basic region leucine zipper factor
306 CCAAT/enhancer-binding protein alpha and the homeodomain factor Nkx2.1/thyroid transcription
307 factor-1. *The Journal of biological chemistry* 277: 36970-7, 2002.
- 308 5. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, de Oca MM, Mendez RA, Plata VP, Cabral HJ. The
309 body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive
310 pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 350: 1005-12, 2004.
- 311 6. Chang A, Ramsay P, Zhao B, Park M, Magdaleno S, Reardon MJ, Welty S, DeMayo FJ. Physiological
312 regulation of uteroglobin/CCSP expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 923: 181-92,
313 2000.
- 314 7. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman
315 EK, Balmes JR. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and
316 the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and
317 Critical Care Medicine* 182: 693-718, 2010.
- 318 8. Frerking I, Sengler C, Günther A, Walmrath H, Stevens P, Witt H, Landt O, Pison U, Nickel R.
319 Evaluation of the -26G>A CC16 polymorphism in acute respiratory distress syndrome. *Critical care
320 medicine* 33: 2404-6, 2005.
- 321 9. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, Chanez P, Bourdin A. Supplementing
322 defect in Club Cell Secretory Protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* (December 4,
323 2014). doi: 10.1378/chest.14-1174.
- 324 10. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, Spangenberg A, Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Lavi I,
325 Tarès L, Carsin A, Dobaño C, Barreiro E, Zock J, Martínez-Moratalla J, Urrutia I, Sunyer J, Keidel D,
326 Imboden M, Probst-Hensch N, Hallberg J, Melén E, Wickman M, Bousquet J, Belgrave DCM, Simpson
327 A, Custovic A, Antó JM, Martínez FD. Relation between circulating CC16 concentrations, lung
328 function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective
329 study. *The Lancet. Respiratory medicine* 3: 613-20, 2015.
- 330 11. Hay JG, Danel C, Chu CS, Crystal RG. Human CC10 gene expression in airway epithelium and
331 subchromosomal locus suggest linkage to airway disease. *The American journal of physiology* 268:
332 L565-75, 1995.
- 333 12. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA,
334 Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EFM, Wedzicha JA. Susceptibility to

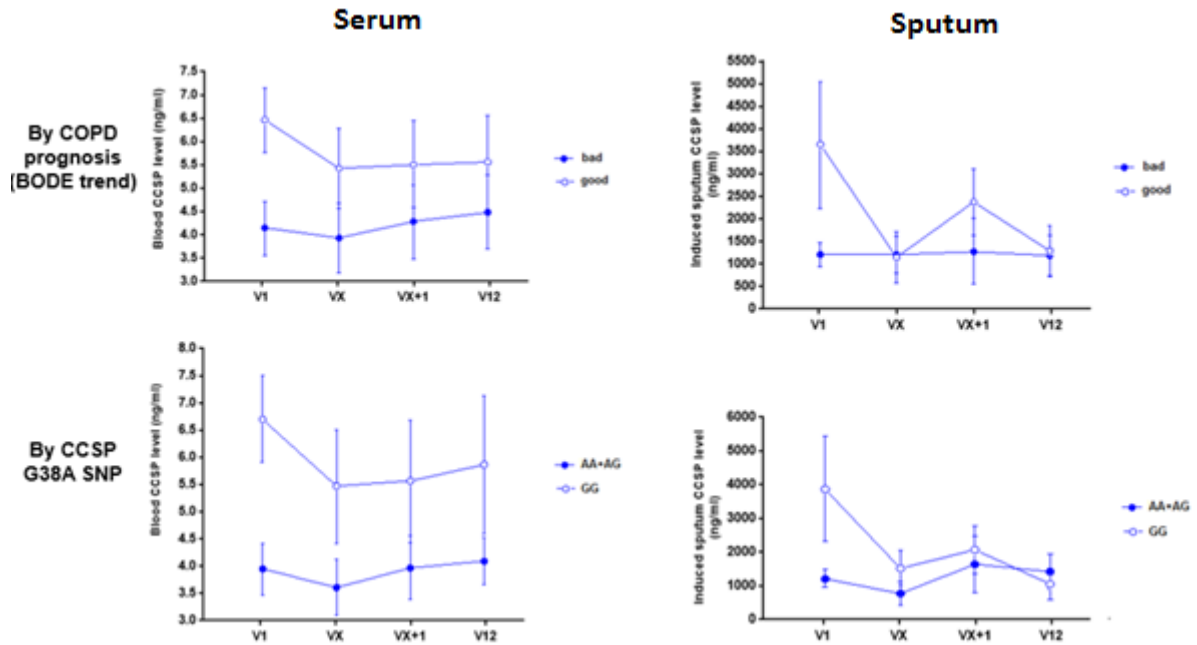
- 335 exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 363:
336 1128-38, 2010.
- 337 13. Kim DK, Cho MH, Hersh CP, Lomas DA, Miller BE, Kong X, Bakke P, Gulsvik A, Agustí A,
338 Wouters E, Celli B, Coxson H, Vestbo J, MacNee W, Yates JC, Rennard S, Litonjua A, Qiu W, Beaty
339 TH, Crapo JD, Riley JH, Tal-Singer R, Silverman EK. Genome-wide association analysis of blood
340 biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical
341 Care Medicine* 186: 1238-47, 2012.
- 342 14. Knabe L, Fort A, Chanez P, Bourdin A. Club cells and CC16: another “smoking gun”? (With
343 potential bullets against COPD). *The European respiratory journal* 45: 1519-20, 2015.
- 344 15. Ku M, Sun H, Lu K, Sheu J, Lee H, Yang S, Lue K. The CC16 A38G polymorphism is associated
345 with the development of asthma in children with allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy :*
346 *journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 41: 794-800, 2011.
- 347 16. Laucho-Contreras ME, Polverino F, Gupta K, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, Divo M, Ashfaq
348 N, Petersen H, Stripp B, Pilon AL, Tesfaigzi Y, Celli BR, Owen CA. Protective role for club cell
349 secretory protein-16 (CC16) in the development of COPD. *The European respiratory journal* 45: 1544-
350 56, 2015.
- 351 17. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Miller BE, Coxson HO, Tal-Singer R. Evaluation of serum
352 CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 63: 1058-1063, 2008.
- 353 18. Long X, Hu S, Wang N, Zhen H, Cui Y, Liu Z. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits
354 NF- κ B Activity in Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 7: e35960, 2012.
- 355 19. Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study
356 of the general population. *Thorax* 61: 935-9, 2006.
- 357 20. Menegatti E, Nardacchione A, Alpa M, Agnes C, Rossi D, Chiara M, Modena V, Sena LM,
358 Roccatello D. Polymorphism of the uteroglobin gene in systemic lupus erythematosus and IgA
359 nephropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82: 543-6, 2002.
- 360 21. Ohchi T, Shijubo N, Kawabata I, Ichimiya S, Inomata S, Yamaguchi A, Umemori Y, Itoh Y, Abe
361 S, Hiraga Y, Sato N. Polymorphism of Clara cell 10-kD protein gene of sarcoidosis. *American Journal
362 of Respiratory and Critical Care Medicine* 169: 180-6, 2004.
- 363 22. Pourzand C, Cerutti P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutation research* 288: 113-21,
364 1993.
- 365 23. Ray MK, Chen CY, Schwartz RJ, DeMayo FJ. Transcriptional regulation of a mouse Clara cell-
366 specific protein (mCC10) gene by the NKx transcription factor family members thyroid transcription
367 factor 1 and cardiac muscle-specific homeobox protein (CSX). *Molecular and cellular biology* 16: 2056-
368 64, 1996.
- 369 24. René C, Taulan M, Iral F, Doudement J, L'Honoré A, Gerbon C, Demaille J, Claustres M, Romey
370 M. Binding of serum response factor to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CArG-like
371 elements, as a new potential CFTR transcriptional regulation pathway. *Nucleic acids research* 33: 5271-
372 90, 2005.
- 373 25. Sadeghnejad A, Meyers DA, Bottai M, Sterling DA, Bleecker ER, Ohar JA. IL13 promoter
374 polymorphism 1112C/T modulates the adverse effect of tobacco smoking on lung function. *American
375 Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176: 748-52, 2007.

- 376 26. Sawaya PL, Stripp BR, Whitsett JA, Luse DS. The lung-specific CC10 gene is regulated by
377 transcription factors from the AP-1, octamer, and hepatocyte nuclear factor 3 families. *Molecular and*
378 *cellular biology* 13: 3860-71, 1993.
- 379 27. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Shibuya Y, Morita Y, Hirasawa M, Okutani R, Kawai T, Abe S.
380 Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are
381 decreased in smokers. *The European respiratory journal* 10: 1108-14, 1997.
- 382 28. Siganaki M, Koutsopoulos AV, Neofytou E, Vlachaki E, Psarrou M, Soultzis N, Pentilas N, Schiza
383 S, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Deregulation of apoptosis mediators' p53 and bcl2 in lung tissue of
384 COPD patients. *Respiratory Research* 11: 46, 2010.
- 385 29. Tiwari N, Marudamuthu AS, Tsukasaki Y, Ikebe M, Fu J, Shetty S. p53- and PAI-1-mediated
386 induction of C-X-C chemokines and CXCR2: Importance in Pulmonary Inflammation due to Cigarette
387 Smoke exposure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* (January 8,
388 2016). doi: 10.1152/ajplung.00290.2015.
- 389 30. Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzaki H, Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuates airway
390 mucus hypersecretion and inflammation. *The European respiratory journal* 44: 1002-10, 2014.
- 391 31. Vasanthakumar G, Manjunath R, Mukherjee AB, Warabi H, Schiffmann E. Inhibition of phagocyte
392 chemotaxis by uteroglobin, an inhibitor of blastocyst rejection. *Biochemical pharmacology* 37: 389-94,
393 1988.
- 394 32. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, Calverley PMA, Celli B, Coxson
395 HO, Crim C, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Rennard SI.
396 Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *The New England journal of*
397 *medicine* 365: 1184-92, 2011.
- 398 33. Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, Varilh J, Chiron R, Tabary O, Molinari N, Claustres M, Taulan-
399 Cadars M. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are
400 new targets for cystic fibrosis. *The European respiratory journal* 45: 116-28, 2015.
- 401 34. Wain LV, Sayers I, Artigas MS, Portelli MA, Zeggini E, Obeidat M, Sin DD, Bossé Y, Nickle D,
402 Br C, Brandsma C, sma, Malarstig A, Vangjeli C, Jelinsky SA, John S, Kilty I, McKeever T, Shrine
403 NRG, Cook JP, Patel S, Spector TD, Hollox EJ, Hall IP, Tobin MD. Whole exome re-sequencing
404 implicates CCDC38 and cilia structure and function in resistance to smoking related airflow obstruction.
405 *PLoS genetics* 10: e1004314, 2014.
- 406 35. Wang Z, Chen C, Niu T, Wu D, Yang J, Wang B, Fang Z, Y CN, Yandava CN, ava, Drazen JM,
407 Weiss ST, Xu X. Association of asthma with beta(2)-adrenergic receptor gene polymorphism and
408 cigarette smoking. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163: 1404-9, 2001.
- 409 36. Wolf M, Klug J, Hackenberg R, Gessler M, Grzeschik KH, Beato M, Suske G. Human CC10, the
410 homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning, chromosomal localization and expression in
411 endometrial cell lines. *Human molecular genetics* 1: 371-8, 1992.

412

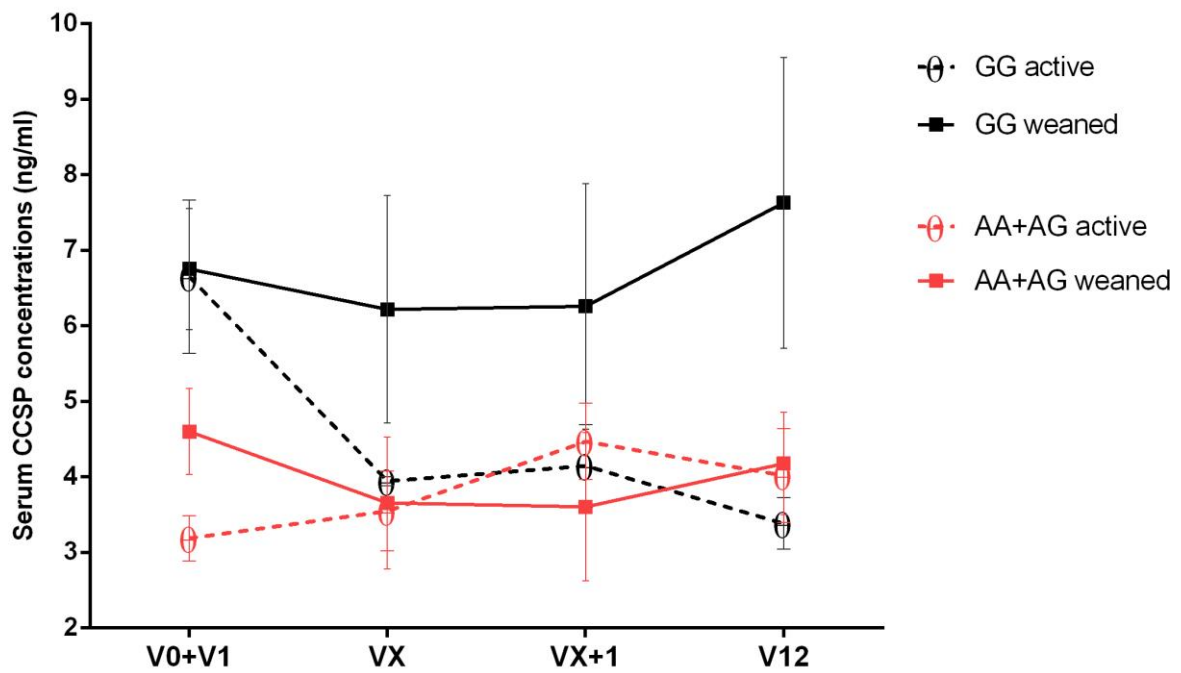
413 Figure 1.

414 (a)



415

416 (b)



417

418 Figure 2.

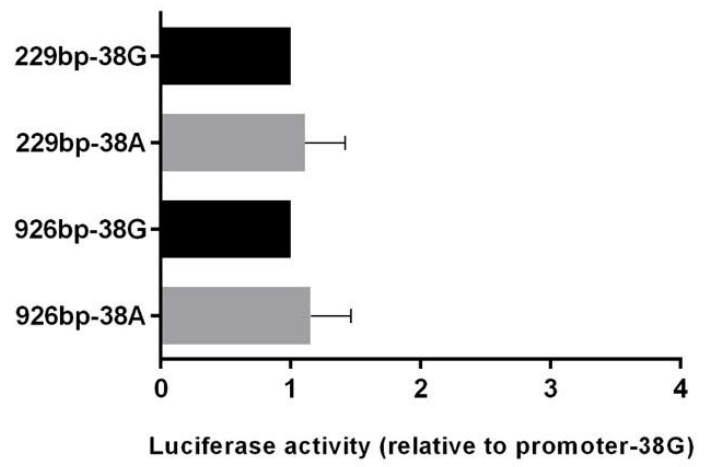
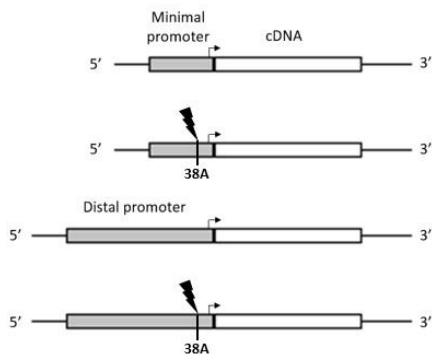
419



420

421 Figure 3.

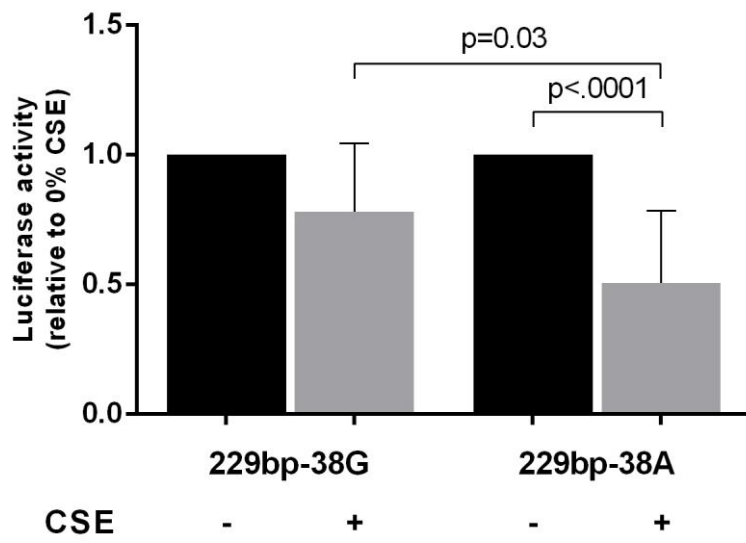
422



423

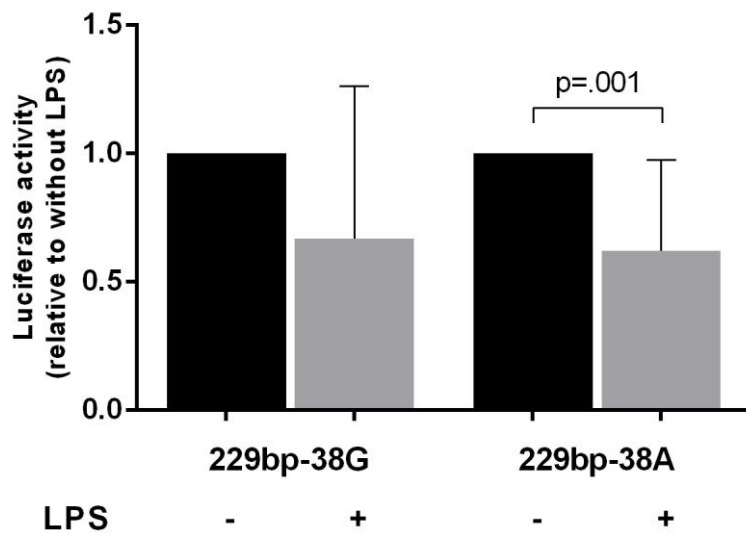
424 Figure 4.

425 (a)



426

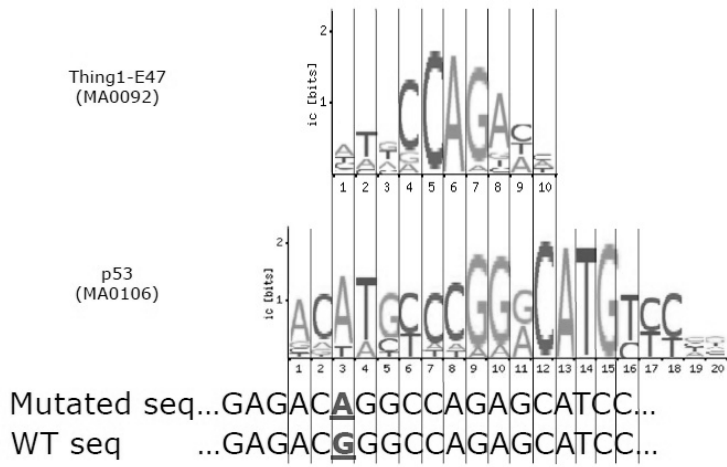
427 (b)



428

429 Figure 5.

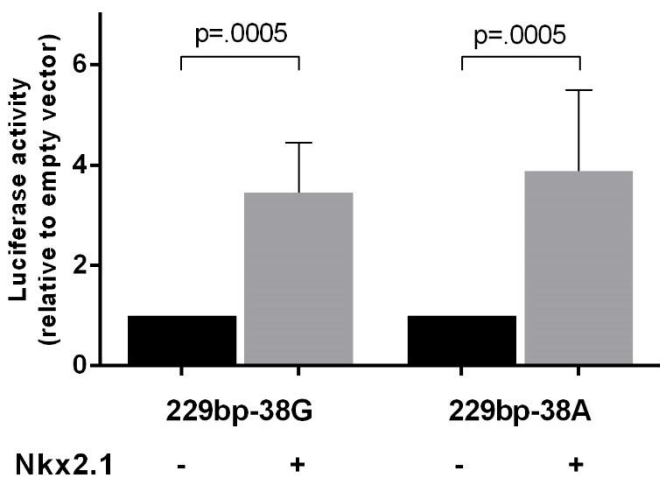
430 (a)



431

432

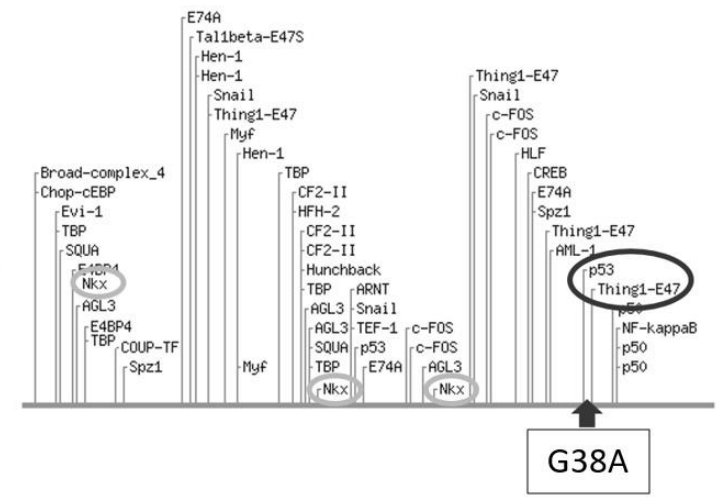
433 (c)



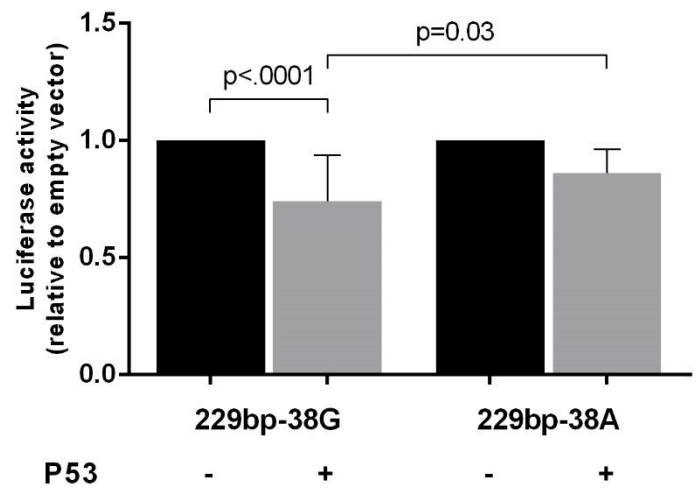
434

(b)

Putative transcription factor binding sites found along *Seq* allele A

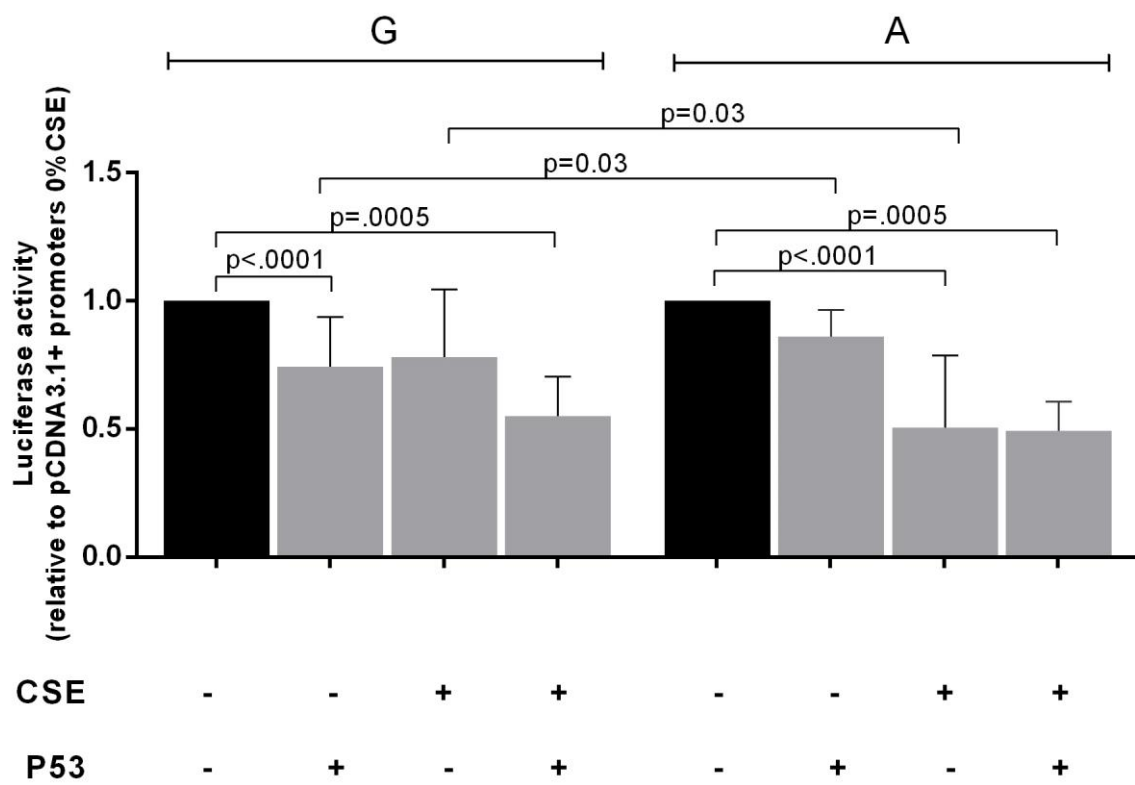


(d)



435 Figure 6.

436



437

438 Table 1. List of mRNA primers

Constructs	Forward ^a	Reverse ^a
229bp-CCSP	CTCGAGCAGTGGGGACAGAACTGG	CCATGGCATGGTGGAGGAGGGGGAT
926bp-CCSP	CTCGAGGAGGCAAGAAAGGGGAGAA	CCATGGCATGGTGGAGGAGGGGGAT
P53	CTCGAGATGGAGGAGCCGCAGTCAG	GGGCCCATTTCTTCCTCTGTGCGCCG

439 ^a Bold type indicates the restriction sites: XhoI, NcoI and ApaI

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455 Table 2. ^a Subject baseline characteristics.

	G/G	A/A + A/G	p- value
n	32	34	NA
Age, years (mean±SD)	62.1 ±11.1	55.4 ±9.09	0.028 ^b
Gender [n(% male)]	25(78)	23(68)	0.413
Smoking history, pack years (mean±SD)	43.8 ±17.6	42.6 ±21.2	0.566
Smoking status [n(% weaned>1 year)]	22(69)	18(53)	0.216
GOLD “2011” status [n(% I-II)]	22(69)	26(79)	0.407
FEV1, % th (mean±SD)	60.6 ±21.2	69.4 ±21.2	0.102
FEV1/FVC (mean±SD)	0.53 ±0.15	0.57 ±0.16	0.324
BODE index (mean±SD)	2.53 ±2.44	2.55 ±2.45	0.948
BODE trend at 1 year [n(% increased index)]	4(12)	26(76)	< 0.0001 ^b
Blood CCSP level, ng/ml (mean±SD)	7.17 ±4.18	3.77 ±2.10	0.002 ^b
Induced sputum CCSP level, ng/ml (mean±SD)	3466 ±4610	1220 ±1599	0.013 ^b

456 ^aData are expressed as means±standard deviation

457 ^bG/G vs A/G and A/A patients comparison by Fisher or Mann-Whitney’s test with p < 0.05

458 being significant

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

460 capacity

461

3. Discussion

La conservation au sein des espèces de l'allèle G correspondant au site allélique en position 38 chez l'humain confirme l'importance biologique de cet allèle. Les analyses par arbre phylogénétique de la séquence promotrice de *CCSP* suggèrent de façon intéressante que l'allèle G est privilégié au sein des Primates. Nous émettons l'hypothèse que la présence de l'allèle A en tant que site sauvage dans les autres espèces serait le fruit de l'influence de l'environnement. En effet, le rôle immunosuppresseur de la protéine CCSP pourrait être délétère pour les animaux ayant des voies aériennes proches du sol et donc hautement exposées aux allergènes par exemple. Une transcription moindre de *CCSP* pourrait permettre à ces animaux d'avoir une réponse inflammatoire moins réprimée.

Nous avons établi et testé des constructions courtes et longues, mimant le promoteur proximal et distal de *CCSP*. La construction longue reflète probablement mieux la situation physiologique mais empêche d'isoler plus précisément le rôle du polymorphisme, le contrôle du système étant plus difficile sur une séquence plus grande. Ce qui justifie l'étude d'une construction plus courte. Le système de gène rapporteur luciférase utilisé ici pour détecter la quantité de transcrite directement lié aux promoteurs *CCSP* est une technique reconnue. Nos résultats sont parfaitement reproductibles. Néanmoins, cette technique limite l'information à la transcription et il est nécessaire de confirmer ces résultats au niveau protéique. Aussi, il serait intéressant de vérifier si le polymorphisme a un impact sur la stabilité des transcrits *CCSP*. Les observations cliniques que nous avons pu faire peuvent tout autant résulter de modifications post-transcriptionnelles.

Nous avons reproduit l'activation de la transcription de *CCSP* par Nkx2.1 (159) indépendamment du polymorphisme, comme attendu selon l'étude menée *in silico*. Cela nous a confortés dans la fiabilité de notre modèle. D'autant plus que nous reproduisons ensuite *in vitro* les observations recueillies *in vivo*, le CSE induisant une répression de la transcription de *CCSP* de façon plus importante chez les cellules contenant l'allèle A.

La répression de la transcription de *CCSP* induite par la co-transfection du vecteur p53 chez les cellules contenant l'allèle G peut s'expliquer par l'intervention d'autres

éléments de régulation se fixant autour du site allélique. Bien que p53 soit dérégulé dans la BPCO (202, 203) il semble tout de même peu réaliste de l'utiliser comme cible thérapeutique afin de moduler la transcription de *CCSP*, ce facteur de transcription étant ubiquitaire et critique dans le cancer. L'autre facteur de transcription candidat pour se fixer au niveau de la séquence promotrice mutée *CCSP* est Thing1-E47. Il n'a pas été testé, son lien avec les maladies pulmonaires n'étant pas établi et sa séquence étant difficile à déterminer.

Dans la BPCO, les périodes d'exacerbations affectent clairement l'histoire de la maladie (204). *CCSP* pouvant jouer un rôle protecteur en maintenant l'homéostasie des voies aériennes, une attention particulière a été donnée aux évènements d'exacerbation au cours de l'étude *in vivo* longitudinale. Nous n'avons trouvé aucune influence du polymorphisme G38A sur *CCSP* ni durant l'exacerbation ni au cours de la récupération. Mais il ne faut pas écarter tout lien possible, les échantillons de sang ont été prélevés pour la plupart après la prise de traitements antibiotiques et/ou corticothérapies, et notre étude repose sur une petite cohorte donc manque de puissance. *In vivo*, il ne semble y avoir aucune différence de transcription de *CCSP* en rapport avec l'exacerbation.

4. Conclusion

L'étude *in vivo* que nous avons menée confirme la relation entre *CCSP* et fumée de cigarette. De plus, le polymorphisme G38A du gène *CCSP* associé au statut tabagique affecte de façon significative les taux de *CCSP* circulants. Ceci pourrait expliquer le fait que certains fumeurs développent la BPCO et d'autres pas, en supposant que le polymorphisme G38A soit une des caractéristiques de la maladie, étant à l'origine de la diminution du taux de *CCSP*. L'étude *in vitro* conforte cette hypothèse, le CSE réprimant de façon significative la transcription du gène dans les cellules mutées comparées aux cellules sauvages.

Finalement, nous avons démontré l'implication d'une interaction gène-environnement sur la susceptibilité des voies aériennes.

II. Caractérisation des cellules Club dans un modèle *ex vivo* d'épithélium bronchique

1. Résumé de l'article 2

Le déficit en cellules Club semble associé à la BPCO. A l'heure actuelle, de nombreuses études ont été réalisées dans le modèle murin, dans le but de caractériser ce type cellulaire et de comprendre son implication dans la physiopathologie de la BPCO. Cependant, comme nous avons pu le voir précédemment, l'épithélium de la souris est différent de celui de l'homme. Il est donc nécessaire d'étudier plus spécifiquement ce type cellulaire en contexte physiologique. Nous avons développé dans le laboratoire un modèle de culture des cellules épithéliales bronchiques en interface air-liquide (ALI) (modèle présenté dans le chapitre II.5). Ainsi, l'étude des maladies chroniques des voies respiratoires est rendu possible (205).

Nous avons analysé un épithélium en culture ALI *ex vivo* d'un sujet témoin par microscopie électronique à balayage, à transmission et par microscopie confocale. Nous avons marqué par immunogold la protéine CCSP en microscopie électronique à transmission. Puis nous avons réalisé des marquages par immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-CCSP, anti-MUC5AC, anti-tubuline IV et anti-p63 afin de mettre en évidence les différents types cellulaires éventuellement présents dans notre modèle, les cellules Club, les cellules à mucus, les cellules ciliées et les cellules basales respectivement. Nous avons aussi réalisé des marquages anti-Ki67 afin de déterminer le potentiel prolifératif des cellules Club. Ensuite, nous avons évalué la production d'IL8, cytokine pro-inflammatoires, et de MUC5AC, protéine reflet de l'hypersécrétion bronchique, des cellules cultivées en ALI de sujets sains et de patients BPCO. Nous nous sommes assurés de la cohésion épithéliale par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER). Nous avons quantifié par immunofluorescence le pourcentage de cellules CCSP+ dans chacune de ces populations. Finalement, nous avons tenté de reproduire un modèle de déplétion en cellules CCSP+ par l'utilisation de naphthalène ou de paraquat.

Nous avons montré que :

- 1) Nous sommes capables d'obtenir un épithélium pseudostratifié complètement différencié avec des cellules en forme de dôme marquées CCSP+ (Figure 1), des cellules à mucus MUC5AC+, des cellules ciliées tubulineIV+ et des cellules basales p63+ (Figure 2).
- 2) Les épithélia reconstitués *ex vivo* de patients BPCO produisent plus d'IL8 ($p=.026$) et de MUC5AC que les épithélia de sujets sains (Figure 3b). La TEER est identique pour les deux populations (Figure 3a).
- 3) L'ajout de naphtalène ou de paraquat tout au long de la culture en ALI sur des épithélia de sujets sains ne nous permet pas de dépléter les cellules CCSP+ de notre modèle (Figure 6).
- 4) Nous avons observé les co-marquages suivants : CCSP+ et Ki-67+, CCSP+MUC5AC+ et CCSP+p63+. Aussi, nous avons pu constater des cellules triplement marquées CCSP+/Ki-67+/p63+ (Figure 4).
- 5) Enfin, le marquage immunofluorescent des cellules CCSP+ des épithélia de sujets sains et de patients BPCO à J28 nous permet de mettre en évidence deux profils différents de protéine CCSP : un profil sécrété et un profil cytoplasmique (Figure 5). Sur les épithélia obtenus à partir de patients BPCO, la diminution du taux de CCSP de type sécrété contraste avec l'augmentation du taux de CCSP de type cytoplasmique.

2. Article 2 : « Characterization of Club Cell Secretory Protein Producing Cells in an *ex vivo* COPD Culture Model. »

Résumé sous forme de poster (Présentation poster A5927 ATS 2016)

Article en cours de préparation, pour soumission à l'ARJCMC

Characterization of Club Cell Secretory Protein Producing Cells in an *Ex Vivo* COPD Culture Model.

L. Knabe^{1,2*}, A. Fort-Petit^{2*}, D. Gras³, J. Charriot², R. Jean², E. Ahmed², A. S. Gamez², P. Chanez³, N. Molinari⁴, I. Vachier², J. P. Berthet², A Bourdin^{1,2}

¹ U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, Montpellier University, Montpellier, France; ² Department of respiratory diseases, CHRU Montpellier, France; ³ UMR INSERM U1067 CNRS 7333, Aix Marseille University, Marseille, France; ⁴ IMAG U5149, Department of Medical Information, CHRU Montpellier, France

BACKGROUND

A decreased number of Club Cell Secretory Protein (CCSP) producing cells has been consistently reported at the small airway level which may contribute to COPD pathophysiology. Naphthalene specifically depletes CCSP expressing cells in mice and induced COPD-like lung alterations similar to KO-models. But CCSP expressing cells in mice present major differences with humans.

OBJECTIVES

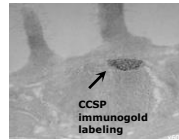
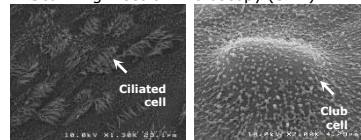
We aimed to better characterize CCSP expressing cells in Humans. For this purpose we analyzed CCSP expressing cells in reconstituted air-liquid interface (ALI) cultures obtained from human proximal airway biopsies of control and COPD patients.

METHODS

ALI cultures of bronchial epithelial cells obtained from healthy control subjects and COPD patients (Proximal biopsies obtain from bronchoscopy).

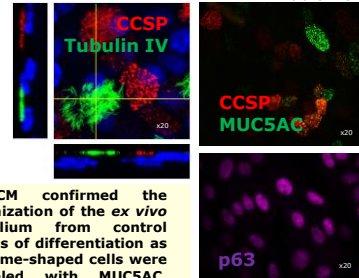
Healthy control subject:

- 1/ Morphological characterization
Transmission Electron Microscopy (TEM)
Immunogold CCSP
Scanning Electron Microscopy (SEM)



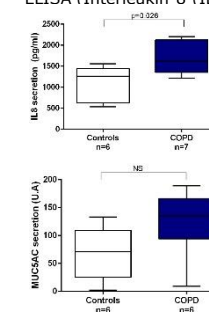
TEM, SEM and CM confirmed the pseudostratified organization of the *ex vivo* reconstituted epithelium from control subject, with evidences of differentiation as goblet, ciliated and dome-shaped cells were identified and labeled with MUC5AC, tubulinIV and CCSP.

- 2/ Cellular characterization
Immunofluorescence (IF)
Dot Blot (MUC5AC)
ELISA (Interleukin-8 (IL-8))
Confocal Microscopy (CM)

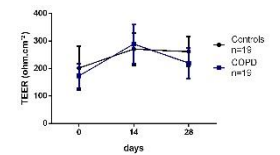


Healthy control subject and COPD patients:

- 1/ Epithelial secretion
Dot Blot (MUC5AC)
ELISA (Interleukin-8 (IL-8))



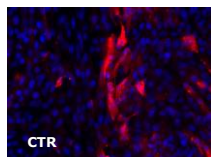
- 2/ Epithelium integrity
TEER measurements



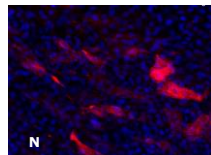
The *ex vivo* reconstituted COPD epithelium released higher levels of IL8 and MUC5AC while TEER levels and trends were similar. We developed a reliable model to study human bronchial epithelial cells.

RESULTS

1/ No effect of naphthalene or paraquat on CCSP+ cells

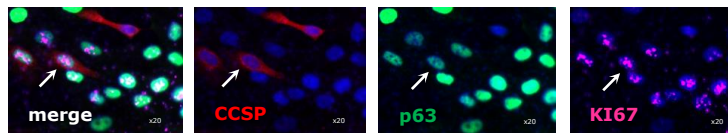


At day 28 of culture: Naphthalene and Paraquat were tested as specific CCSP depleting agents (10⁻³ to 10⁻⁹ in the basolateral

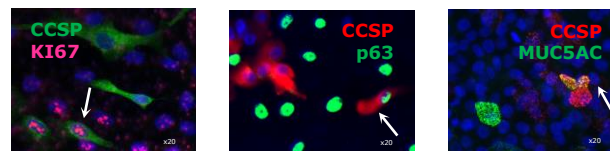


No CCSP (in red) depletion by naphthalene (N) or paraquat (P) was observed at day 28.

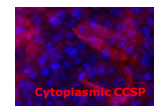
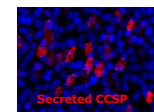
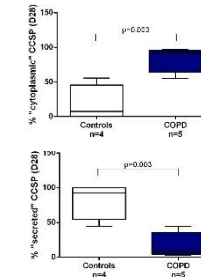
2/ Progenitor function for CCSP positive cells



Ki-67 and collocating antibodies (p63, MUC5AC) argued for an accessory stem cell and transitory differentiating roles for CCSP positive cells.



3/ CCSP cells presented two patterns



CCSP cells presented two patterns at full differentiation, one secretory and one cytoplasmic. Decreased secreted CCSP stained cells contrasted with increased cytoplasmic CCSP stained cells in COPD.

Conclusion: Cell lineage tracing and specific depletion in human airway epithelial cultures are required to definitely establish the critical importance of CCSP expressing cells in COPD.

Characterization of Club Cell Secretory Protein Producing Cells in an *ex vivo* COPD Culture Model.

Lucie Knabe^{1, 2*}, Aurélie Petit^{2*}, Delphine Gras³, Pascal Chanez^{3, 4}, Isabelle Vachier², Jean-Philippe Berthet², Arnaud Bourdin^{1, 2}

1. PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214.
2. Department of respiratory diseases, CHRU Montpellier, France.
3. CNRS UMR 7333, INSERM U1067, Aix Marseille University, France.
4. AP-HM, Department of respiratory diseases, Aix Marseille University, France.

Correspondence:

Professor Arnaud Bourdin
Department of Respiratory Diseases
Hôpital Arnaud de Villeneuve
CHU Montpellier
371 Av. Doyen G. Giraud
34295 MONTPELLIER Cedex 5, France
Telephone: + 33 4 67 33 61 26
Fax: +33 4 67 63 36 45
E-mail: a-bourdin@chu-montpellier.fr

Author contributions: LK and AP collected the clinical data, performed the experiments and statistical analyses and interpreted the data. LK wrote the manuscript. DG, PC, IV and JPB participated in the study design, interpreted the data, and provided critical edits of the manuscript. JPB recruited patients. AB designed the study, recruited patients, collected the clinical data, performed statistical analyses, interpreted the data, and provided critical edits

of the manuscript. All authors provided critical review of the manuscript and approved its submission.

Running Head: Club Cells in a COPD culture model

Descriptor number:

Word count:

At a Glance Commentary:

Scientific Knowledge on the Subject:

A decreased number of Club Cell Secretory Protein (CCSP) producing (+) cells has been reported at the small airway level which may contribute to COPD pathophysiology. CCSP+ cells are characterized in mice models but mice airway presents major differences with human.

What This Study Adds to the Field:

CCSP+ cells were present in ex vivo COPD culture model and seemed to support progenitor functions. CCSP presented two patterns, one secretory and one cytoplasmic. No CCSP depletion by naphthalene or paraquat was observed.

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

Abstract (297 words)

Rationale: The airway epithelium contains multiple cell types among which Club Cell Secretory Protein (CCSP) producing (+) cells are of unclear function in human proximal airways. Naphthalene specifically depletes CCSP+ cells in mice and induced-COPD like lung alterations similar to KO-models. But CCSP+ cells in mice present major differences with humans.

Objectives: To understand the behavior of CCSP+ cells in human bronchial epithelial cells explaining whether or not CCSP+ cells are a promising therapeutic target.

Methods: Human bronchial epithelial cells were obtained from biopsies of control subjects and COPD patients undergoing bronchoscopy. Cells were maintained in air-liquid interface (ALI) for 28 days. Morphological characterization was assessed in control ALI culture using Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy (CM). Differential cell types were identified by immunofluorescence (p63, MUC5AC, tubulinIV, CCSP) and Ki67-double stained cell rates were assessed every week. COPD and control ALI culture epithelial secretions were determined by dot blot (MUC5AC) and ELISA (CCSP and IL8). Naphthalene and paraquat were tested as specific CCSP depleting agents.

Measurements and Main Results: TEM, SEM and CM confirmed the pseudostratified organization of the reconstituted epithelium with evidences of full differentiation as goblet, ciliated and dome-shaped cells were identified and labeled with MUC5AC, tubulinIV and CCSP. Moreover, the ex vivo reconstituted COPD epithelium released higher levels of IL8 and MUC5AC. CCSP cells presented two patterns, one secretory and one cytoplasmic. Decreased CCSP concentrations in the supernatant contrasted with increased cytoplasmic CCSP stained cells in COPD. Ki-67 and collocating antibodies argued for an accessory stem cell and transitory

differentiating role for CCSP+ cells. No CCSP depletion was observed by naphthalene or paraquat.

Conclusions: Cell lineage tracing and specific depletion in human airway epithelial cultures are required to definitely establish the critical importance of CCSP+ cells in COPD.

Abstract word count: 297

Keywords: Club cell, CCSP, CCSP+ cells, COPD, bronchial cell culture model

Methods

Patients

Bronchial biopsies from control subjects (n=19) and COPD patients (n=19) were collected during endobronchial bronchoscopy. Subjects were recruited at the Arnaud de Villeneuve hospital, Montpellier, France, under a study protocol approved by the ethics committee (RRR study, NCT02354677) of our institution, and all patients agreed to participate by reading and signing written informed consent forms. COPD diagnosis was based upon evidence of non-reversible obstructive airflow $FEV_1/FVC < 0.7$ and a smoking history above 30 pack-year, and without any evidence for any alternative diagnosis according to best standard of care (i.e. no history of any other respiratory disease based on clinical examination, computed tomography scan findings). At the time of the biopsy collection, patients were at steady-state and free of any exacerbation for at least 6 weeks.

Cell culture

Human primary bronchial epithelial cells (HBECs) were obtained from endobronchial biopsies and cultured under air-liquid interface conditions, as described previously {Gamez:2014fb}. Briefly, bronchial epithelial biopsies were mechanically dissociated and suspended in Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM). After seeding in multiwell plates coated with a solution of fibronectin and collagen, cells were expanded in a flask (0.75 cm²) and then plated (250,000 cells per well) on uncoated nucleopore membranes in a 1:1 mixture of BEGM and Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) applied at the basal side only to establish the air-liquid interface. Cells were maintained in culture for 28 days to obtain a differentiated cell population with a pseudostratified mucociliary epithelium. All cell cultures were maintained at 37°C under 5% CO₂. The cells were treated for 24 h with Naphthalene or Paraquat. The

supernatants were collected for epithelial secretion analyses. The cells were fixed for microscopy.

Immunofluorescence and confocal microscopy

HBECs were fixed with 10% formalin for 15min followed by permeabilisation in PBS-0.1% Triton for 15min. Nonspecific binding sites were blocked for 1h with 10% donkey serum diluted in PBS-1% BSA. The cells were then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-CCSP antibody at 1:1000; mouse anti-tubulinIV antibody at 1:400; mouse anti-MUC5AC antibody at 1:100; goat anti-P63 antibody at 1:50; mouse anti-Ki-67 antibody at 1:200. As a negative control, the primary antibody was omitted. After several rinses in PBS-0.025% Triton, the cells were incubated for 1h with Alexa Fluor secondary antibodies at 1:2000 (Invitrogen), proceeding in the darkness, and counterstained for nuclei with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 1:5000 for 1 min. The coverslips were mounted using Fluoroshield mounting medium (Abcam). The stained cells were visualized under a Zeiss Axio Imager fluorescence microscope and a Zeiss LSM 780 confocal microscope. All images were processed with Axio Vision Software and Image J software for image analysis.

Ultrastructural evaluation

Inserts with *ex vivo* differentiated epithelial cells were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer (pH 7.4) overnight at 4°C. They were then rinsed in PHEM buffer and post-fixed in a 0.5% osmic acid for 2h at dark and room temperature. After 2 rinses in PHEM buffer, the cells were dehydrated in a graded series of ethanol solutions (30-100%). The cells were embedded in EmBed 812 using an Automated Microwave Tissue Processor for Electronic Microscopy, Leica EM AMW. Thin sections (70 nm; Leica-Reichert Ultracut E) were collected at different levels of each block. These sections were counterstained with uranyl

acetate 1.5% in 70% ethanol and lead citrate and observed using a Tecnai F20 transmission electron microscope at 200KV in the CoMET MRI facilities, INM France.

Scanning electron microscopy

PBS washed-bronchial epithelial cells cultured in ALI were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer (pH 7.2) for 1h at room temperature, followed by washing in PHEM buffer. Fixed samples were dehydrated using a graded ethanol series (30-100%), followed by 10min in graded ethanol - hexamethyldisilazane. And then hexamethyldisilazane alone. Subsequently, the samples were sputter coated with an approximative 10nm thick gold film and then examined under a scanning electron microscope (Hitachi S4000, at CoMET, MRI-RIO Imaging, Biocampus, INM Montpellier France) using a lens detector with an acceleration voltage of 10KV at calibrated magnifications.

Measurement of CCSP, Interleukin (IL)8 and Mucin (MUC)5AC concentrations

Secreted CCSP and IL8 were quantified in cell supernatants by ELISA using Human Club Cell Protein (CC16) ELISA (Biovendor) and the IL-8 Eli-pair kit (Diaclone) respectively, according to manufacturer's protocol. Determinations of the relative values of MUC5AC in supernatants were assessed by Dot Blot assay. Briefly, 10 μ l of cell supernatants were spotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with blocking odyssey buffer (Licor) for 1h at room temperature. They were incubated with primary antibodies (1:1000 MUC5AC) for 2h and then with secondary fluorescent antibodies for 45min. Positive signals were detected using Odyssey Imager. The intensities of the spots were measured with Dot Blot analyzer, an Image J software.

Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm SEM. Paired comparisons were made using Mann-Whitney tests and were considered statistically significant at p -value <0.05 . All graphical data and statistical analyses were generated with GraphPAD Prism software (Version 6.0).

Results

Reconstitution of a pseudostratified bronchial epithelium fully differentiated

TEM and SEM confirmed the cohesiveness of the *ex vivo* reconstituted epithelium from control subject (Figure 1a), with evidences of differentiation as ciliated (Figure 1a, 1e and 1f) and dome-shaped cells were identified (Figure 1b and 1c) and labeled with CCSP (Figure 1g). CM allowed us to visualize a polarized epithelium (Figure 2d) which contained all the cell types normally present in human bronchial epithelia: Club cells labeled CCSP+ (Figure 2a, 2c and 2d); basal cells labeled p63+ (Figure 2b); goblet cells labeled MUC5AC+ (Figure 2a) and ciliated cells labeled tubulinIV+ (Figure 2c).

A model of *ex vivo* reconstituted COPD epithelium

Bronchial cells cultured at ALI obtained from COPD patients released higher levels of IL8 ($p=0.026$) and MUC5AC (Figure 3b) while TEER levels and trends were similar (Figure 3a).

Accessory stem cell and transitory differentiating roles for CCSP+ cells

CCSP+ cells were labeled Ki-67+ and p63+, respectively a proliferative and a basal cell marker.

CCSP labeling also collocated with MUC5AC and Ki-67 labeling. The immunofluorescence is represented on Figure 4.

“Cytoplasmic” and “secretory” CCSP

CCSP+ cells presented two patterns at full differentiation, one secretory and one cytoplasmic. Decreased secreted CCSP stained cells contrasted with increased cytoplasmic CCSP stained cells in COPD (Figure 5).

No CCSP+ cell specific depletion

At day 28 of culture: Naphthalene and Paraquat were tested as specific CCSP depleting agents (10^{-3} to 10^{-9} M in the basolateral compartment) but no decreased in CCSP+ cells was observed (Figure 6).

Discussion

Acknowledgments: The authors are grateful to Chantal Cazevaille for her technical assistance.

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

Figure 1

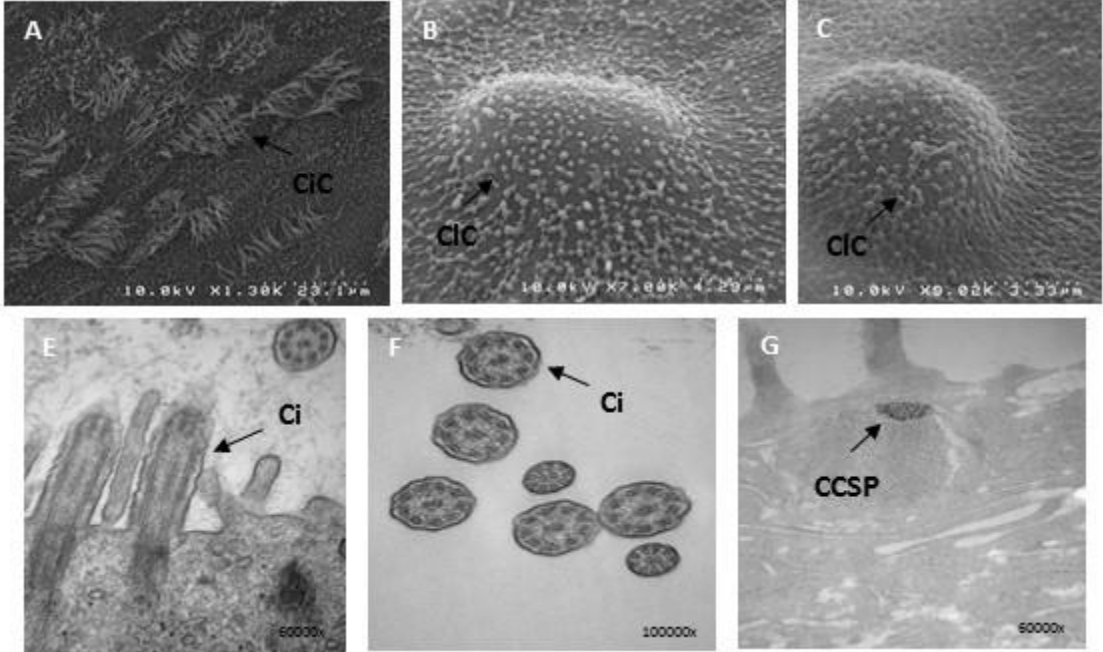


Figure 2

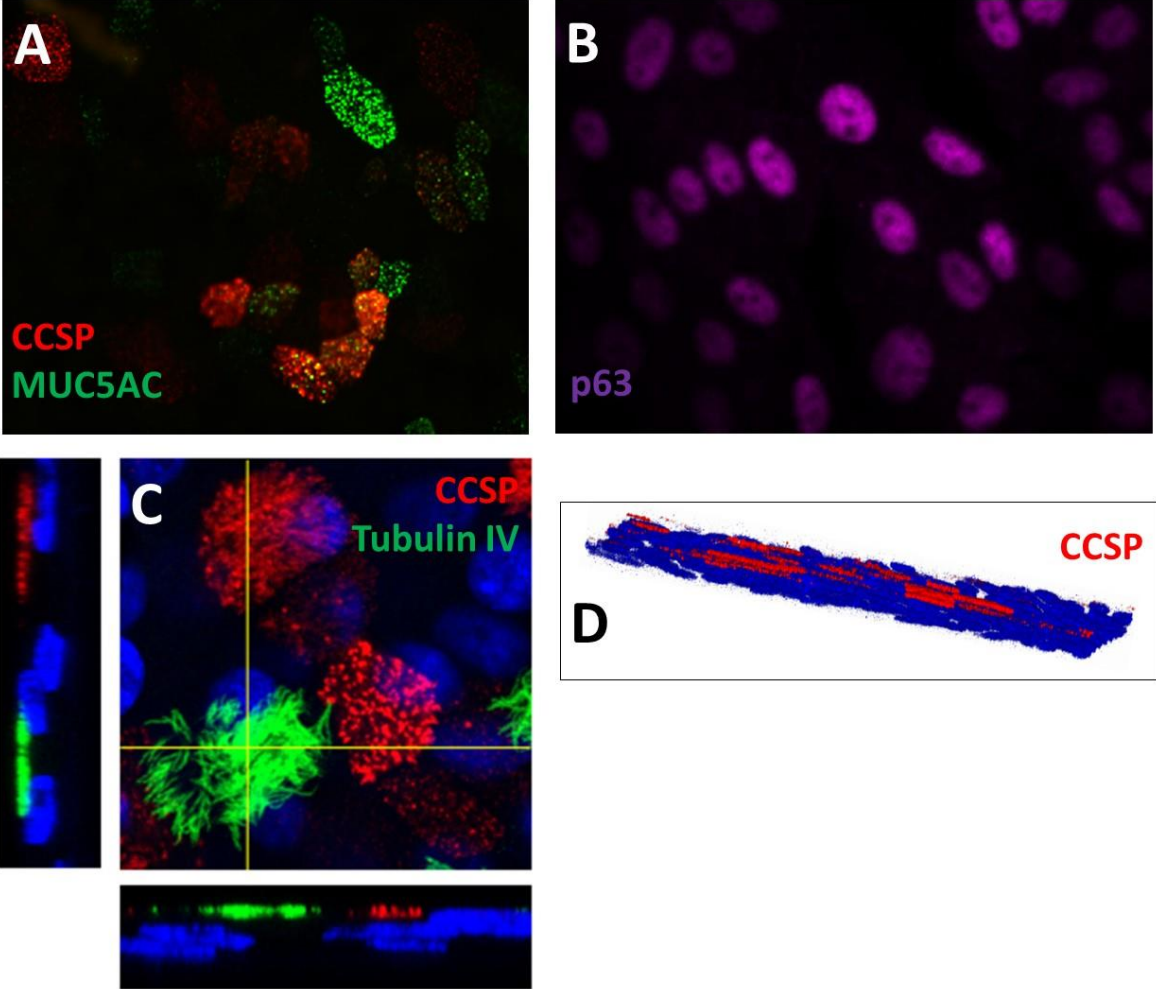
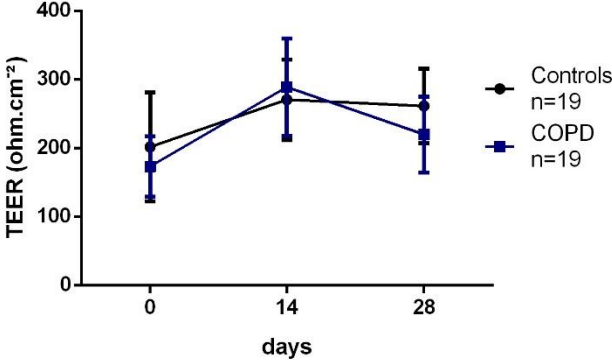


Figure 3

a



b

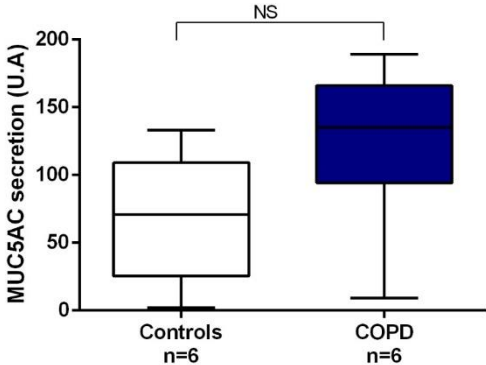
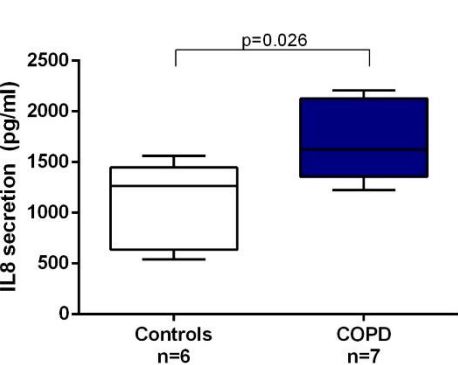


Figure 4

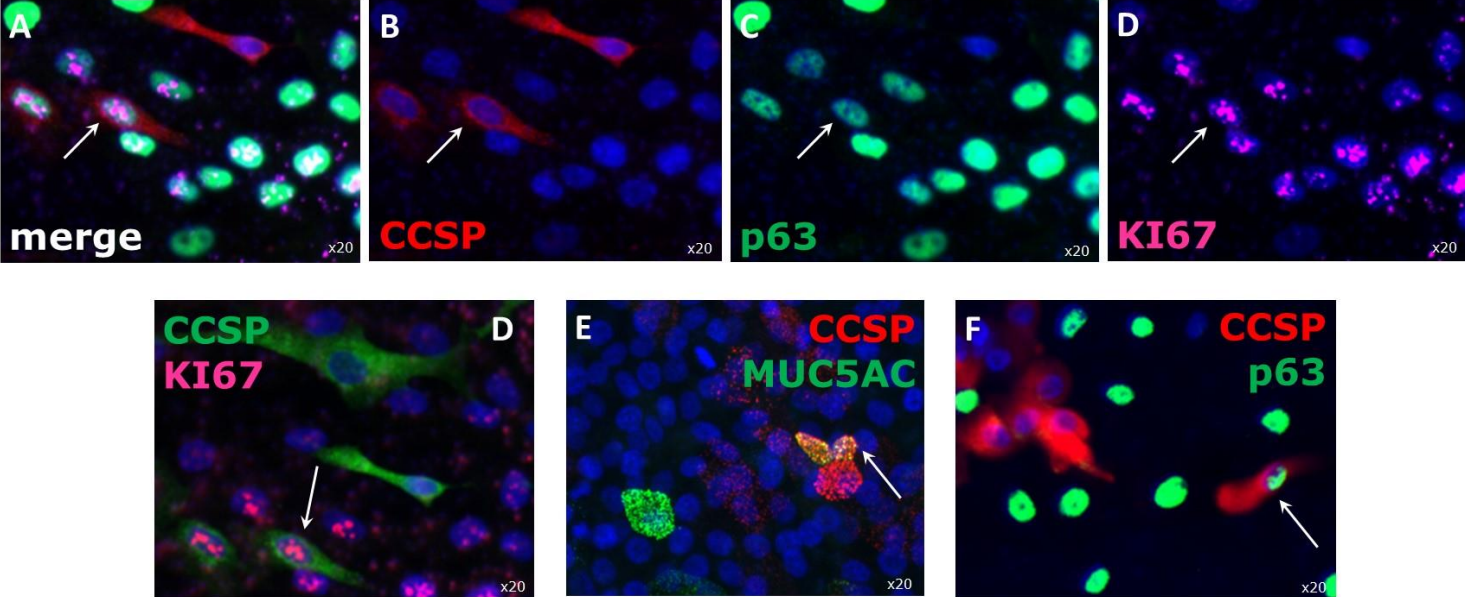


Figure 5

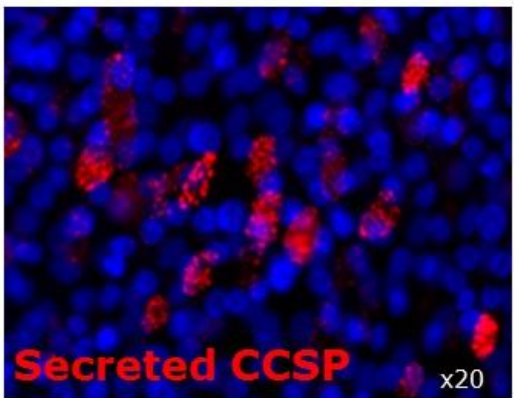
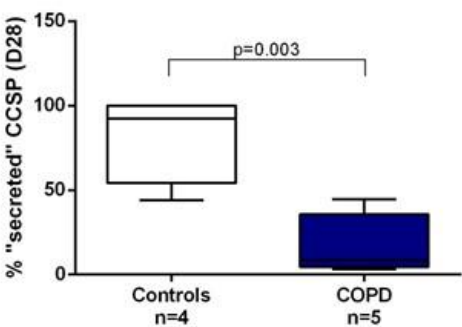
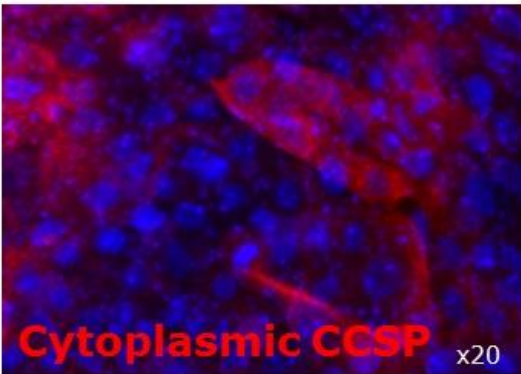
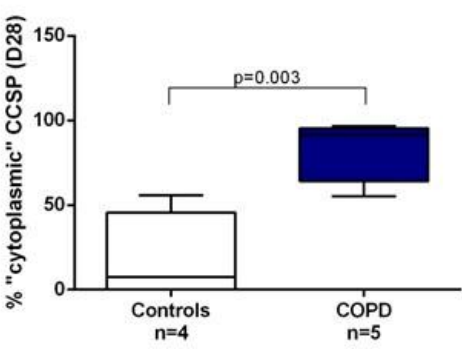
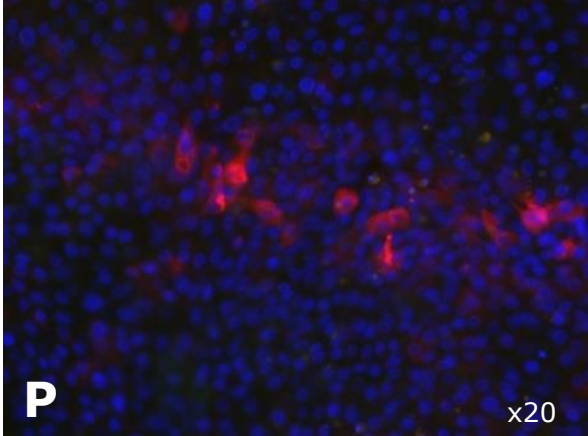
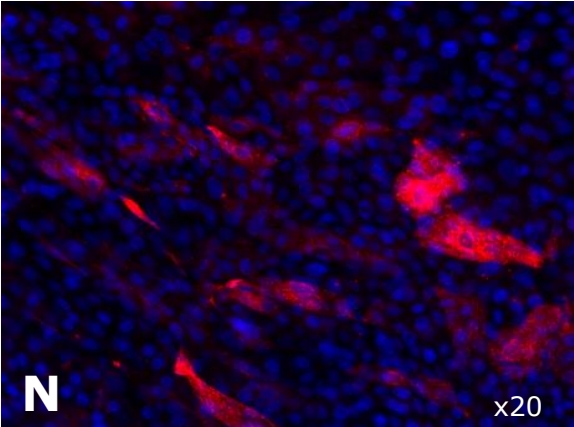
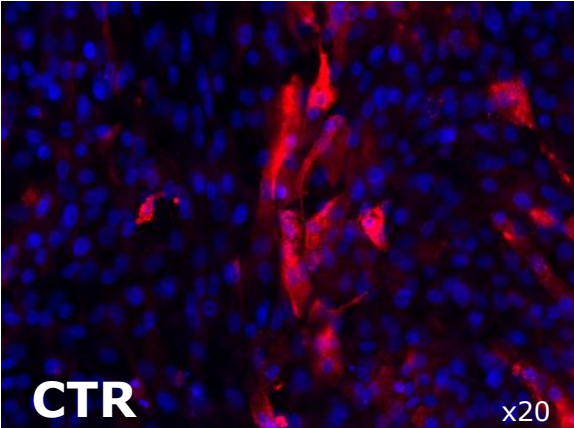


Figure 6



3. Discussion de l'article 2

La microscopie électronique à balayage et à transmission nous permet de visualiser un épithélium reconstitué *ex vivo* de sujet sain complètement différencié et cohésif, ponctué par la présence de cils et la découverte de dômes. La microscopie confocale met en évidence au niveau apical la protéine CCSP et permet également de constater la présence de touffe de cils, signe d'une polarité des cellules bien établie. Finalement, nous retrouvons tous les types cellulaires propres à un épithélium bronchique ce qui nous permet de valider un modèle fiable pour l'étude des cellules des voies aériennes. Il s'avère que peu de littérature décrit la présence des cellules Club au niveau proximal, or, les prélèvements de biopsies permettant la reconstitution des épithélia *ex vivo* se font au niveau proximal. La proportion de cellules Club retrouvées dans les cultures en ALI est-elle le reflet de celles présentes sur les biopsies initiales ? Il serait intéressant d'explorer cette question. Il est évident que la biopsie obtenue par l'arrachement du tissu au niveau de l'éperon est un geste traumatique. Les cellules qui prolifèrent ensuite *in vitro* pourraient garder en mémoire cet événement et générer un tissu plus riche en cellules progénitrices ou étant impliquées dans le renouvellement de l'épithélium.

Les épithélia de BPCO reconstitués en ALI produisent plus de façon significative d'IL8 que ceux reconstitués à partir de sujets sains. On ne trouve qu'une tendance concernant la protéine MUC5AC due probablement au faible effectif. Le fait que les cellules de BPCO produisent plus d'IL8 et de MUC5AC permet de penser qu'il y a une persistance du phénotype du patient *in vitro*. Cela a déjà été observé pour le modèle de cellules épithéliales bronchiques cultivées en ALI de patients asthmatiques (205). Ceci, malgré la dédifférenciation qui s'opère entre le prélèvement et le premier passage de mise en culture, suivi de la re-différenciation en 28 jours de ces cellules en un épithélium pseudostratifié totalement différencié. Les TEER des épithélia sont du même ordre de grandeur, signe d'une bonne cohésion cellulaire.

Nous avons tenté de reproduire le modèle de déplétion utilisé chez la souris par l'utilisation de naphthalène. Nous avons aussi utilisé du paraquat, herbicide connu pour s'accumuler également dans les cellules Club (206). Il s'avère que dans notre modèle, nous n'arrivons pas à dépléter les cellules Club par l'effet toxique de ces deux

composants, déposés sur les cellules, de façon indépendante, tout le long de la culture en ALI. L'effet du naphthalène est largement admis dans le modèle murin. Il est métabolisé par Cyp2f2 induisant la sécrétion de toxiques détruisant la cellule. Le pendant de Cyp2f2 de la souris est CYP2F1 chez l'homme et cette dernière a une activité métabolique envers le naphthalène beaucoup moins forte (102). Pour le paraquat, cela a été démontré chez le rat. Ces modèles expérimentaux de déplétion cellulaire sont donc beaucoup moins pertinents chez l'homme.

Nous avons observé des cellules CCSP+ co-marquées par la protéine MUC5AC et la protéine p63 dans les épithélia de sujets sains. Ceci suggère que les cellules Club dites progénitrices « facultatives » aient la propriété fonctionnelle d'être à l'état de base un type cellulaire différencié, mais qu'elles puissent switcher vers un état prolifératif actif avec des propriétés similaires à une « transient-amplifying cell » (ces dernières restant relativement indifférenciées et ayant une capacité limitée de prolifération) (107, 108). Nous avons pu voir des cellules triplement marquées CCSP+/Ki-67+/p63+ ainsi que des cellules CCSP+/Ki-67+, démontrant clairement leur rôle souche dans notre modèle de cellules épithéliales reconstituées en ALI.

Finalement, deux profils de protéine CCSP sont mis en évidence. Il est important de démontrer maintenant s'il s'agit d'une vraie différence de propriété cellulaire ou d'une étape dans la différenciation de la cellule. Aussi, s'il s'agit d'un défaut d'exocytose, est-ce que cela empêcherait l'action anti-inflammatoire de la protéine CCSP ? Beaucoup de questions restent en suspens et auront besoin d'expériences supplémentaires pour être élucidées.

Il serait intéressant de déposer de l'extrait de cigarette sur ces épithélia *ex vivo* afin d'analyser l'action du tabac sur les cellules Club, tant au niveau de leur morphologie, de leur présence que de leur fonction. L'analyse plus fine des épithélia reconstitués *ex vivo* de patients BPCO est nécessaire également pour une meilleure compréhension de l'évolution de ce type cellulaire, pour déterminer si la protéine CCSP et les cellules Club sont bels et bien des cibles de la pathologie.

4. Conclusion de l'article 2

L'étude que nous avons menée vise à une meilleure compréhension des cellules Club de l'épithélium respiratoire chez l'humain. Nous avons reproduit un modèle d'étude de cellules épithéliales bronchiques fiables, de sujets sains et de patients BPCO, au plus proche des conditions physiologiques (en ALI). Ce modèle nous a permis de caractériser morphologiquement les cellules Club et d'essayer d'avancer dans les hypothèses de rôle progéniteur de ce type cellulaire, mais il est nécessaire d'approfondir ces recherches afin d'établir réellement les fonctions de cette cellule ainsi que de sa protéine, chez l'homme.

5. Résumé de l'article 3

Les cellules épithéliales bronchiques constituent une véritable barrière de défense contre les agents pathogènes et les particules inhalés (207, 208). De nombreuses techniques de culture cellulaire ont été développées afin de pouvoir étudier finement la composition de cet épithélium, sa régulation et son implication dans les maladies chroniques des voies respiratoires (209-211). Il s'avère que le modèle le plus physiologique semble être la culture de cellules primaires bronchiques en ALI (212, 213). Cette technique est complexe et nécessite une pratique spécifique. L'obtention d'un épithélium bronchique polarisé, pseudostratifié complètement différencié fournit l'outil idéal pour l'étude *in vitro* de la biologie des cellules épithéliales bronchiques (205). L'objectif de ce travail est de comprendre les variables associées à la réussite de la culture en ALI afin d'améliorer cette technique et ainsi de pouvoir avancer dans l'étude biologique des cellules épithéliales bronchiques.

Nous avons mené une étude bi-centrique prospective de 4 ans incluant 463 sujets sains, fumeurs, patients asthmatiques et patients BPCO. Après prélèvement de biopsies bronchiques, toutes les caractéristiques suivantes ont été recueillies : âge, sexe, statut tabagique, BMI, FEV1/FVC, FEV1, FVC, traitements (ICS, OCS, SABA, LABA, LAMA), centre et opérateur de bronchoscopie. Après mise en culture des biopsies, ont été noté : l'opérateur de culture cellulaire, le nombre de biopsies et la présence de cils sur ces échantillons. Des modèles statistiques univarié et multivarié ont été établis. Des marquages immunofluorescents des cellules ciliées (tubulineIV+), basales (p63+), Club (CCSP+) et à mucus (MUC5AC+) ont été réalisés.

Nous avons montré que :

- 1) 40% des biopsies recueillies permettent d'obtenir au bout de 28 jours de culture en ALI des épithélia bronchiques exploitables, complètement différenciés (Figure 1a et 1b).
- 2) Le pourcentage de cellules ciliées et de cellules à mucus augmente du jour 0 de culture en ALI au jour 28, alors que celui des cellules basales a tendance à diminuer (Figure 1c).

- 3) L'analyse univariée montre que la réussite de la culture en ALI est associée à l'absence de prise de LABA (OR=0,62 ; p=0,01) et d'ICS (OR=0,64 ; p=0,02) ainsi qu'à la présence de cils sur les biopsies initiales (OR=2,18 ; p<0,001) (Figure 3).
- 4) L'analyse multivariée montre que la réussite de la culture en ALI est uniquement associée à la présence de cils sur les biopsies initiales (Figure 4).

6. Article 3 : « Epithelial ciliated beating cells, a key factors for ex vivo ALI culture success growth. »

Pour soumission à *Lab Invest*

Epithelial ciliated beating cells, a key factors for ex vivo ALI culture success growth.

**Delphine Gras*¹, Aurélie Petit*², Jérémy Charriot², Lucie Knabe^{2, 3}, Khuder Alagha⁴,
Anne Sophie Gamez², Céline Garulli¹, Arnaud Bourdin^{2, 3}, Pascal Chanez^{1, 4},
Nicolas Molinari⁵ and Isabelle Vachier²**

1. UMR INSERM U1067 CNRS 7333, Aix Marseille University, Marseille, France.
2. Department of Respiratory Diseases, CHRU Montpellier, Montpellier, France.
3. U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, Montpellier University, Montpellier, France
4. Department of RespiratoryMedicine, Assistance Publique Hopitaux de Marseille, Aix Marseille University, Marseille, France.
5. Department of Statistics, CHRU Montpellier, Montpellier, France.

Corresponding author: Dr Isabelle Vachier
CHU Montpellier
Hôpital Arnaud de Villeneuve
371 Av Doyen G Giraud
34295 Montpellier Cx 5
Tel : +33 467 042 020
Fax : +33 467 042 000
isabelle.vachier@inserm.fr

* These authors contributed equally to this work.

Running title: Ciliated beating cells predict ALI success.

Abstract

The bronchial epithelium plays a key role in orchestrating innate and adaptive immunity in health and diseases. *Ex vivo* airway epithelial cultures growing at Air Liquid Interface (ALI) derived from human endo-bronchial biopsies or brushings are not easy to anticipate. Calibrating and differentiating these cells is a long and expensive process that needs a specific expertise. The knowledge of the factors associated with ALI culture success will help the researchers to better understand the epithelial progenitor behavior. A valuable ALI culture was defined as obtaining a pseudostratified epithelium after 28 days with the presence of all the differentiated epithelial cells. A 4 years prospective, bi-center study was conducted, including adult subjects, enrolled in different approved research studies exploring bronchial epithelium behavior. 463 consecutive endobronchial biopsies were obtained from normal healthy volunteers, healthy smokers, asthmatic patients and smokers with COPD. All the demographic variables of the subjects, the different fiberoptic centers and culture operators, and numbers of endo-bronchial biopsies and the presence of ciliated cells within the initial bronchial biopsy were carefully collected. Univariate and Multivariate models were established. A stepwise procedure was used to select the final logistic regression model. The success of the ALI culture was independently associated with the presence of living ciliated cells within the initial biopsy (OR=2.18 [1.50 – 3.16], $p < 0.001$). This findings highlights the multipotent property of the derived basal-like cells issued from the dedifferentiation process of the epithelium. Pursuing the process requested to reach ALI cultures when ciliated cells beating cells could be absent while examining the initial biopsy will probably save time and money. Whether it is related to stem cell state of the ciliated beating cells is still unknown.

Introduction

Bronchial epithelial cells represent the main barrier acting as the primary defense for the airways against inhaled pathogens and particles (1,2). This epithelium plays a crucial role in maintaining the homeostasis of the airways regulating innate and acquired immunity (3) through the production of a wide range of cytokines, chemokines and mediators. The bronchial epithelium follows a pseudostratified organization of basal, ciliated, goblet and other-more rare, types of cells (1,4). The presence of these different cell types appears to be mandatory ensuring its function (1,2).

At the beginning, the majority of studies compared epithelial content through experiment performed using biopsies, lung resections or autopsies but only recently through bronchoscopies (5). Culture techniques of the epithelial cells have been well documented for many years including study on cell lines (immortalized or not) and on primary cell recovering obtained in volunteers sampled by brushing (6) or forceps biopsies (7) (used as primary cells or after monolayer cultures). Working with cell lines is easy, reproducible and not very expensive, when working with primary culture is limited by the cost, the variability between donors, the dissociation process and finally the limited number of cells suitable for experiments. When cultured as monolayers, the number of passage used is becoming critical and cells clearly undergo a dedifferentiation process and loss their phenotype (8). This leads to develop new cell line systems with first a monolayer culture follow with air-liquid interface (ALI) using an appropriate medium to preserve cell phenotypes (9,10). This model of human bronchial epithelial cells (HBEC) achieves a polarized, pseudostratified epithelium composed of most known cells types (11). This culture system provides a useful tool for the *in vitro* study

of airway epithelial biology and cell differentiation (11,12) including functional studies of the specific differentiated cells (ie ciliary beating, mucus secretion and cytokine production).

Nowadays, there is an increasing number of publications reporting results from the use of ALI technique which present the advantage of reproducing a well differentiated airway epithelium with functional distinct type of cells (13). Up to date, this widely used difficult technique to achieve ALI culture from different type of samples in different diseases may vary through in terms of achievement or not of expansion and full differentiation (14,15).

The objective of our work is to identify potential predictive factors associated with obtaining a valuable ALI culture that can be used for future experiments. We investigated these variables for the overall experiments performed in our laboratory experience for all the bronchial biopsies obtained from healthy volunteers, smokers, mild moderate and severe asthmatic subjects and COPD patients of all GOLD stages of severity.

Materials and Methods

Subjects

463 adults were consecutively included from March 2009 to July 2013 in Arnaud de Villeneuve Hospital (Montpellier, France) and Assistance Publique des Hopitaux de Marseille (Marseille, France). They all signed an informed consent form in order to participate in a study approved by Ethic committees of our institutions, for the purpose of specific biomedical research on epithelial pathophysiologic mechanisms.

Control (n=83) and smokers (n=65) without COPD (no asthma, no allergy, normal chest X-ray and pulmonary function tests), underwent bronchoscopy for various purposes (foreign body removal, unconfirmed hemoptysis suspicions or peripheral nodule (< 10 mm) found at CT scan examination) and had normal macroscopic appearance of the airways. Smokers were defined by at least a smoking status above 10 packs-year.

Asthma diagnosis (n=175) was based on the assessment of clinical features consistent with asthma and evidence of variable expiratory airflow obstruction in functional testing (FEV1 increase of at least 12 % and 200 ml after inhalation of 200 µg of salbutamol or after 4 weeks of oral corticosteroids treatment, an average daily diurnal PEF variability < 10%). Asthma severity was evaluated according to the current GINA guidelines (www.ginaasthma.org). Patients with severe asthma (n=124) also met the American Thoracic Society (ATS) criteria for refractory asthma (16). Asthmatic patients had been free of respiratory infections and asthma exacerbations for at least 6 weeks at the time of inclusion; they were current non-smokers or had a smoking history of less than 5 packs year (17).

COPD diagnosis (n=130) was based upon evidence of non-reversible obstructive airflow FEV1/FVC<0.7, FEV1 improvement after inhaling 200 to 400 µg of albuterol below 12% and 200 ml, and a smoking history greater than 10 packs year without any evidence for any

alternative diagnosis according to best standard of care (i.e. no history of any other respiratory disease based on clinical examination, computed tomography scan findings) (18).

Endobronchial biopsies

Flexible bronchoscopy were performed usually under local anesthesia and two biopsies from each donor were removed using alligator forceps (Olympus, Tokyo, Japan) on a subsegmental bronchus of the left lower lobe, as previously described(19). Briefly, after subcutaneous atropine (0.25mg) and midazolam (5 mg) premedication, local naso-pharyngeal anesthesia was achieved with lidocaine (1 to 5%, with a maximum individual dose of 300 mg). Then, fiberoptic bronchoscope (Olympus BF20) was inserted by nasal way into trachea. Some biopsies were obtained during general anesthesia (<10%), data frequently missing and not included in the analysis.

Cell culture

Primary human bronchial epithelial cells were obtained from bronchial biopsy specimens and cultured under air-liquid interface (ALI) conditions, as described previously (14). Briefly, bronchial epithelial biopsy tissue was dissociated and suspended in bronchial epithelial growth medium (Lonza, Basel, Switzerland). After an expansion phase in monolayer, cells were plated on uncoated nucleopore membranes (24-mm diameter, 0.4-mm pore size, Transwell Clear; Costar, Cambridge, Mass) in a 1:1mixture of bronchial epithelial growth medium and Dulbecco modified Eagle medium (Lonza, Basel, Switzerland) applied only at the basal side to establish the ALI. Cells were maintained in culture for 28 days to obtain a polarized and differentiated cell population with a mucociliary phenotype.

Immunofluorescence

ALI cultured cells were fixed in situ on inserts and transferred to glass slides for visualisation. Cells were fixed using 10% formalin and blocked / permeabilized with PBS, 10% donkey serum, 1% BSA, and 0.1% Triton-X. Cells were incubated with appropriate primary antibodies at 4°C overnight (mouse monoclonal anti β -tubulin IV (ONS.1A6) (Sigma-Aldrich), mouse monoclonal (45M1) anti Muc5AC (abcam), goat polyclonal anti p63 (S16) (Santa Cruz Biotechnology)). Alexa 488, alexa555 or alexa 647 secondary labelling (Invitrogen) was applied for 1 hour at room temperature and incubated with DAPI before mounting. Negative controls were incubated with secondary antibody alone. Cells were visualized using the Zeiss axioimager microscope using axiovision software (Zeiss).

Result expression and statistical analysis

We defined 3 steps of culture achievement. First, we considered the achievement of a monolayer culture success when cells grow on monolayer but did not reach the ALI transfer (named "ML"). Then, we studied the achievement of the ALI passage success when cells were able to reach the ALI step without success of the 28 days culture, named "pALI". Finally, an ALI culture success was defined as obtaining a pseudostratified epithelium with the presence of at least basal, ciliated and goblet cells and without any contamination after 28 days ALI culture, named "ALI 28d".

Continuous parametric data are presented as means \pm standard deviation (SD), and categorical variables as numbers and percentages. We used χ^2 test for categorical variables. A multivariate analysis was conducted using a Cox regression model to determine independent factors of success, focusing on parameters available from the initial management, in which we included all variables associated with a p value below 0.20 in the univariate analysis. Then, a stepwise

procedure allowed obtaining the final multivariate model. Survival curves were estimated with the Kaplan Meier method and the log rank test was used. Statistical tests were performed from R (version 3.1.0 (2014-04-10), The R Foundation for Statistical Computing) software. The significance was obtained when $p \leq 0.05$.

Results

Patient'-s' characteristics

Table 1 summarized the demographic and clinical characteristics of subjects included in the study.

As expected FEV1 was significantly decreased in severe asthma and COPD patients, FEV1/FVC was decreased in COPD. Moreover the treatments are more important in severe asthma, COPD than in mild-moderate asthmatics and control or smokers.

Biopsy cultures from asthmatic patients were mainly performed and obtained in Marseille (MRS) center while COPD and smokers were mainly performed and cultured in Montpellier (MTP).

The HBEC cultures

Overall, 65 % of biopsies were successfully grown as monolayer in flask with no success difference between groups of subjects. The major reason for unsuccessful monolayer culture was bacterial and/or fungal contaminations at an early stage. In this case the cultures were excluded in order to avoid any further contamination within the incubator. The other finding at this stage was the incapacity of cells to adhere and grow. In this case, cells remained in culture up to 2 weeks, then were stopped.

Then after, 47 % of samples were able to be transferred on transwell for the first step Liquid-Liquid interface. Finally 40 % of the total initial biopsies obtained, achieved a valuable ALI culture at 28 days allowing the use for future experiments (Figure 1 A). At this stage a well differentiated pseudostratified epithelium was obtained with the presence of at least basal, ciliated and goblet cells (Figure 1 B). The percentage of ciliated and goblet cells increased from

Day 0 to Day 28, in contrast the percentage of basal cells did not change or tended to decrease (Figure 1 C).

Factors associated with the ALI culture at 28 days

The univariate analysis showed that the success of the ALI 28 days culture was associated with absence of ICS use (HR = 0.64 [0.45 – 0.92] p = 0.02) and LABA use (HR = 0.62 [0.43 – 0.88] p = 0.01), and the presence of beating ciliated cells within the initial bronchial biopsy (HR = 2.18 [1.50 – 3.16] p < 0.001).

The success for a valuable culture at ALI for 28 days was only associated with the presence of beating ciliated cells when multivariate analysis was applied (Figure 2).

Success with and without the presence of beating ciliated cells within the initial bronchial biopsy

We obtained a significantly higher percentage of success achieving a well pseudostratified epithelium at 28 days ALI cultures for all condition pathologies (p= .00001, .000002, .0002 using χ^2 test respectively for ML, pALI and ALI 28d), when beating ciliated cells were present at the beginning of the processing, just after the bronchoscopy procedure (Figure 3).

In order to test the effect of the presence of beating ciliated cells within the initial biopsy, we applied a Cox proportional hazards model (Figure 4). Clearly, the presence of beating ciliated cells within the initial biopsy allows an increased success rate.

Discussion

In the present study we aimed to describe our expertise in the development of human bronchial epithelial cell ALI cultures obtained from human bronchial biopsies, and to identify potential predictive factors associated with its success at 28 days. We consecutively included in this study the 463 bronchial biopsies taken in order to develop ALI culture in both expert centers, in control subjects as well as pathological conditions. We noted, an exhaustive list of patient characteristics, and procedures details which can interfere with the success yield. The main results obtained from the multivariate analysis was that the presence of ciliated beating epithelial cells at the beginning of the procedure just after the bronchial biopsy intake was the only parameter associated with the percentage of success in obtaining a well pseudostratified epithelium in ALI culture after 28 days.

Bronchial epithelium is characterized by the presence of differentiated epithelial cell types organized as a pseudostratified epithelium. Currently, from the beginning of the story of *in vitro* study of human bronchial epithelial cells, the model of cultures where mainly form these different sources (8). Carcinoma-derived cells formed confluent polarized monolayers but lack of pseudostratification and presence of ciliated cells, even those this effect might be counteract when cultured in ALI (20). Virus transformed cell lines formed polarized multilayer cultures but often lack of mucus production and relevant genes might be altered or not expressed (21). Finally primary cells presented well differentiated cultures representative of human bronchial phenotype but with a limited life-span. Culturing at an ALI is essential to allow polarity and differentiation of these cells (11).

For this purpose we aimed for 10 years now finding technologies to obtain well pseudostratified structures as well as other *in vivo*-like differentiation characteristics. Especially primary bronchial epithelial cells showed a mucociliary differentiation pattern

comparable to the *in vivo* situation (22). Nowadays this technique to obtain *in vitro* epithelium is widely used but the study of the characterisation of the model is still unclear even if the persistence of the pathological phenotype have been well described (14,15). The generation of differentiated cultures of normal human bronchial epithelial cells is a time- and labor-intensive procedure, especially when providing a large number of cell cultures for investigations (23). This is the reason why we wanted to describe the optimal conditions to securely obtain an epithelial culture for further experiments, and to address a list of factors which can predict this success. This study was performed on all subsequent samples obtain in two expert centres from 2009 to 2013. The result found that only 40 percent of samples were successfully cultured, can be low, but it reflects the real difficulty to be trained and to practice in order to increase the culture rate of success. Moreover all predictive conditions which might increase this yield are also welcome.

In order to better describe the dynamic changes of the culture differentiated epithelium, we were able in a subset of culture wells from different phenotype subjects to count the numbers of ciliated, goblet and basal cells using specific labelled antibodies. At the initial step of mucociliary differentiation (day 0 of ALI culture), we detected a population of basal epithelial stem cells (p63⁺) and undifferentiated cells, which then decreased over time. It has been reported that basal stem/progenitor cells are implicated in the regeneration of human bronchial epithelium (24). Basal and undifferentiated epithelial cells decreased during mucociliary differentiation, whereas goblet and ciliated cells were seen to be increasing from day 7 and day 14, respectively to reach their maximal differentiation at 28 days. These findings are in accordance with previous studies describing the mucociliary differentiation of normal human tracheobronchial (25).

Our major finding is to explain partly the success of the 28 days culturing by the presence within the original biopsy of ciliated beating cells. One of the limitations is that we did not assess a histologic pattern of this initial biopsy. In order to increase the success of the culture, we wanted to use all the initial material obtained from the bronchoscopy. Whether this result reflects the presence of ciliated cells which may act as progenitors or the fact that visual beating is an index of the better viability of original cells, is still unclear. Under physiological conditions, the normal adult human bronchial epithelium turns over relatively slowly, approximately every 1 to 4 months (26) and basal cells are relatively quiescent. *In vivo* lineage-tracing studies in the pseudostratified mucociliary epithelium of mouse trachea have shown that basal cells can function as classical stem cells and both self-renew and give rise to ciliated and secretory cells (27). Notch signalling promotes this differentiation favouring the production of ciliated cells and high levels promoting secretory cell fate (28). Therefore, differentiated cells are commonly thought to send back signals to their respective stem and progenitor cells to regulate their proliferation and differentiation (29). The term dedifferentiation was used to suggest that differentiated epithelial cells reverted to a previous developmental stage before their subsequent differentiation into an alternative cell fate (30). These authors highlight the existence of multiple cellular reservoirs of regenerative capacity which may allow a more effective reparative response.

Moreover, on light microscopy observations, beating cilia were easily observed when the biopsy was just viewed before cell detachment in order to begin the monolayer culture. The assurance of cell viability could easily relate to the better cell behaviour leading to increase cell adherence for further dedifferentiation/differentiation process.

The biology and relevance of stem cells in bronchial epithelium remain unclear. Identification of cellular and molecular mechanisms of bronchial stem cells involved in repair, proliferation,

and mucociliary differentiation under normal and pathological conditions will provide better knowledge of the cellular differentiation in regards to the development of new therapeutic strategies or developing methods of airway reconstruction such as an artificial trachea.

Acknowledgments

This study have been supported by grants from the Agence Nationale de Recherche (ANR) Mucocil (ANR-13BSV5-0015-02), and the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC IR) AP-HM (2013-14), and the CHRU Montpellier (AOI 9244).

The authors would to thank all the bronchoscopists and the patients for making our work possible.

Disclosure/Duality of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Figure Legends

Figure 1: (A) Percentage of success to obtain a monolayer culture (ML), the passage on filter (pALI) and the complete success of 28 days ALI culture (ALI 28d) in controls, smokers, COPD, mild and severe asthma. (B) A representative figure of an ALI culture at 28 days differentiation. (C) Percentage of epithelial cells (ciliated, goblet and basal cells) during the differentiation process to 28 days ALI cultures using immunofluorescence with specific antibody respectively against β -tubulin IV, Muc5AC and p63.

Figure 2: Characteristic of beating ciliated epithelial cells using light microscopy when endobronchial biopsy was obtained before the culture process.

Figure 3: Percentage of success to obtain a monolayer culture (ML), the passage on filter (pALI) and the complete success of 28 days ALI culture (ALI 28d) in bronchial biopsies from the overall patients significantly different between cultures obtained from initial biopsies where beating ciliated cells were present versus not ($p = .00001, .000002, .0002$ using χ^2 test respectively).

Figure 4: Cox model applied to evaluate the time of success for cultures differentiated with the presence or not of beating ciliated epithelial cells.

References

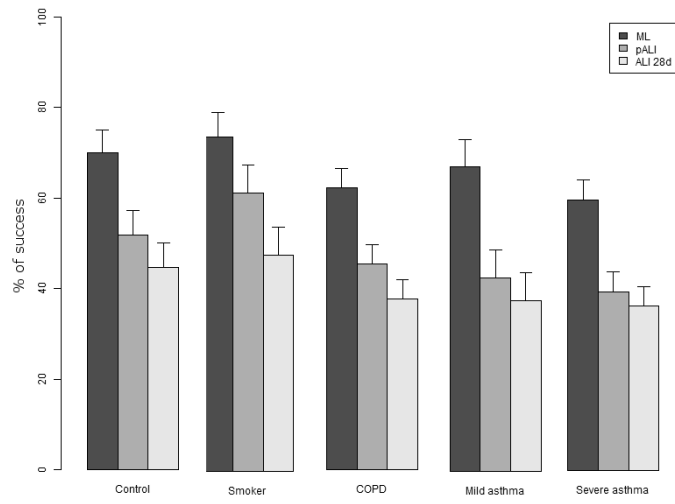
1. Davies DE. Epithelial Barrier Function and Immunity in Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Dec 1;11(Supplement 5):S244–51.
2. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27–35.
3. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;120(6):1279–84.
4. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirol Carlton Vic*. 2003 Dec;8(4):432–46.
5. National Institutes of Health workshop summary. Summary and recommendations of a workshop on the investigative use of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in individuals with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1985 Aug;76(2 Pt 1):145–7.
6. Stokes AB, Kieninger E, Schögler A, Kopf BS, Casaulta C, Geiser T, et al. Comparison of three different brushing techniques to isolate and culture primary nasal epithelial cells from human subjects. *Exp Lung Res*. 2014 Sep;40(7):327–32.
7. Ramirez RD, Sheridan S, Girard L, Sato M, Kim Y, Pollack J, et al. Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res*. 2004 Dec 15;64(24):9027–34.
8. Prytherch Z, Job C, Marshall H, Oreffo V, Foster M, BéruBé K. Tissue-Specific stem cell differentiation in an in vitro airway model. *Macromol Biosci*. 2011 Nov 10;11(11):1467–77.
9. Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 1992 Jun 1;262(6):L713–24.
10. Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *Vitro Cell Dev Biol J Tissue Cult Assoc*. 1988 May;24(5):420–8.
11. Wu R, Sato GH, Whitcutt MJ. Developing differentiated epithelial cell cultures: airway epithelial cells. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol*. 1986 May;6(4):580–90.
12. Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, Traver GL, Tilley AE, Harvey B-G, et al. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Jan 1;300(1):L25–31.
13. Sellgren KL, Butala EJ, Gilmour BP, Randell SH, Grego S. A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells. *Lab Chip*. 2014 Sep 7;14(17):3349–58.
14. Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1259–66.e1.
15. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, et al. Supplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest*. 2015 Jun;147(6):1467–76.

16. Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, Anto JM, Bel EH, Boulet L-P, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jun;119(6):1337–48.
17. Reddy AP, Gupta MR. Management of asthma: the current US and European guidelines. *Adv Exp Med Biol*. 2014;795:81–103.
18. Cooper CB, Barjaktarevic I. A new algorithm for the management of COPD. *Lancet Respir Med*. 2015 Apr;3(4):266–8.
19. Vachier I, Chiappara G, Vignola AM, Gagliardo R, Altieri E, Térouanne B, et al. Glucocorticoid receptors in bronchial epithelial cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Sep;158(3):963–70.
20. Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res*. 2006 Jul;23(7):1482–90.
21. Forbes B, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2005 Jul;60(2):193–205.
22. Fulcher ML, Gabriel S, Burns KA, Yankaskas JR, Randell SH. Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol Med*. 2005;107:183–206.
23. Aufderheide M, Förster C, Beschay M, Branscheid D, Emura M. A new computer-controlled air-liquid interface cultivation system for the generation of differentiated cell cultures of the airway epithelium. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Für Toxikol Pathol*. 2016 Jan;68(1):77–87.
24. Stripp BR, Reynolds SD. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Apr 15;5(3):328–33.
25. Ross AJ, Dailey LA, Brighton LE, Devlin RB. Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Aug;37(2):169–85.
26. Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis*. 1977 Oct;116(4):705–77.
27. Pardo-Saganta A, Tata PR, Law BM, Saez B, Chow RD-W, Prabhu M, et al. Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. *Nature*. 2015 Jul 30;523(7562):597–601.
28. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BLM. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011 Jun 3;8(6):639–48.
29. Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D, Hogan BLM. BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. *Dev Camb Engl*. 2016 Mar 1;143(5):764–73.
30. Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Law BM, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 2013 Nov 14;503(7475):218–23.

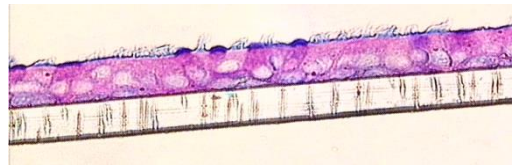
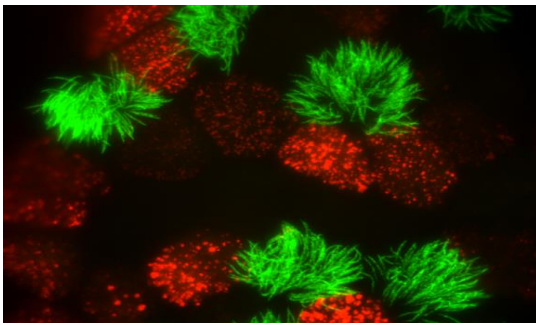
Table 1: Demographic and clinical characteristics of subjects

	Overall N=463	Control N=83	Smoker N=65	COPD N=130	Mild-Mod A N=61	Severe A N=124
Sex F (n, %)	214 (47)	49 (60)	20 (31)	22 (17)	39 (66)	84 (68)
Age (mean \pm sd)	54.7 \pm 14.4	50.1 \pm 17.0	53.5 \pm 14.2	62.4 \pm 10.2	52.5 \pm 14.6	51.5 \pm 13.1
BMI	24.3 \pm 4.7	23.5 \pm 4.6	24.9 \pm 4.8	23.8 \pm 4.2	22.4 \pm 2.8	27.9 \pm 6.3
FEV1 %	78.8 \pm 22.7	97.8 \pm 12.9	96.4 \pm 18.4	64.2 \pm 20.5	89.6 \pm 15.0	71.3 \pm 19.1
FVC %	94.8 \pm 21.7	98.2 \pm 19.4	103.5 \pm 21.9	88.7 \pm 20.8	112.4 \pm 15.4	83.5 \pm 14.5
FEV1/FVC	64.8 \pm 14.0	78.5 \pm 9.5	75.6 \pm 6.0	55.7 \pm 11.1	69.8 \pm 10.7	59.1 \pm 13.7
ICS (n, %)	172 (37)	0 (0)	0 (0)	33 (25)	38 (62)	101 (81)
OCS (n, %)	70 (15)	6 (7)	4 (6)	4 (3)	2 (3)	54 (44)
SABA (n, %)	102 (22)	0 (0)	0 (0)	15 (12)	15 (25)	71 (57)
LABA (n, %)	165 (36)	0 (0)	0 (0)	36 (28)	28 (46)	99 (80)
LAMA (n, %)	23 (5)	0 (0)	0 (0)	18 (24)	1 (2)	3 (2)
MTP/MRS	204/259	34/49	64/1	82/48	9/52	15/109
Biopsy Number (mean \pm sd)	1.57 \pm 1.09	1.58 \pm 1.16	2.88 \pm 0.96	1.90 \pm 1.28	1.25 \pm 0.85	1.07 \pm 0.40
Biopsies grown by a senior operator (n, %)	259 (70)	48 (77)	32 (49)	69 (53)	37 (79)	73 (85)

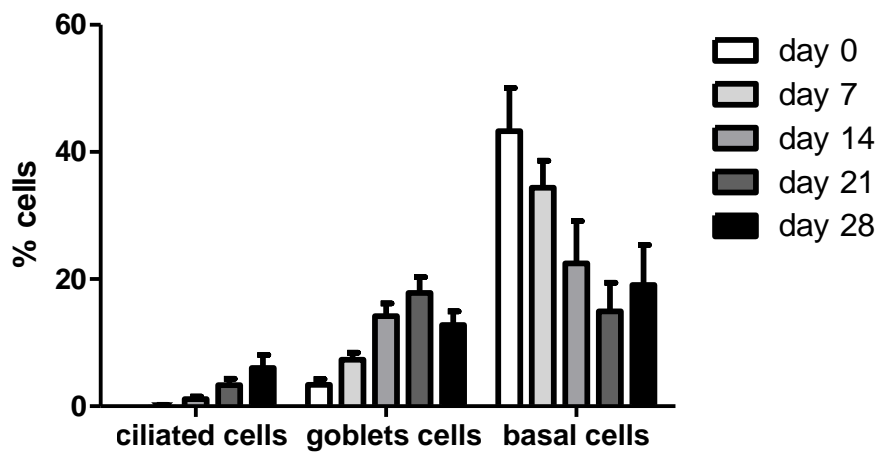
A



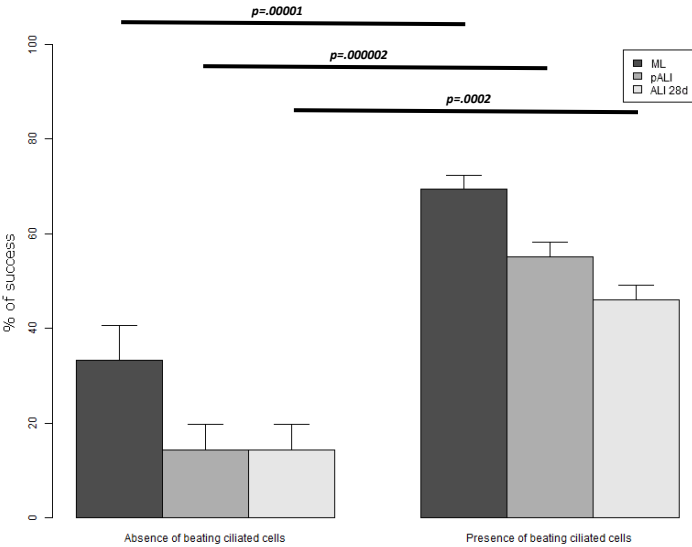
B

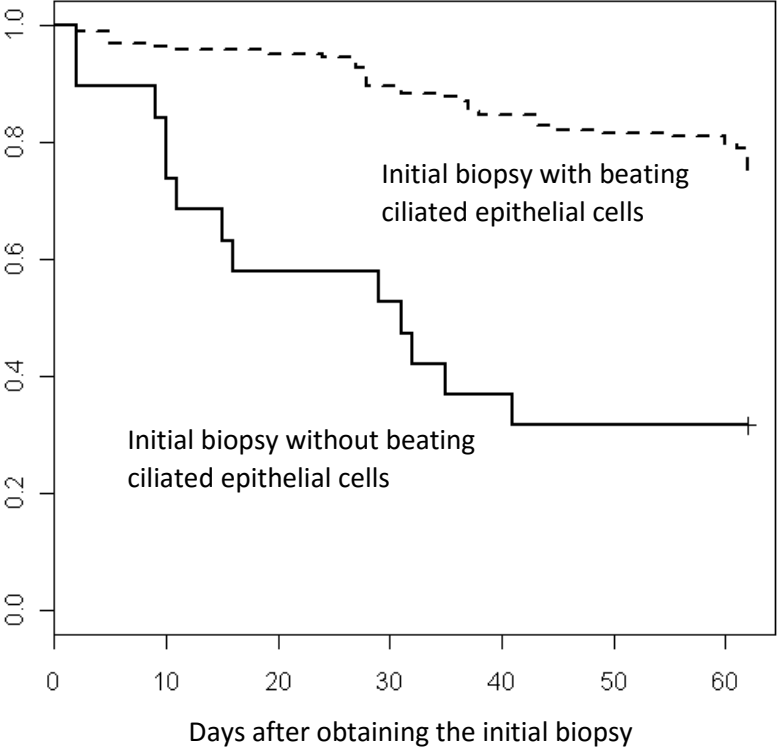


C









7. Discussion de l'article 3

Depuis le début de l'histoire des études *in vitro* des cellules épithéliales bronchiques, plusieurs modèles ont été établis, tentant de représenter fidèlement cet épithélium pseudostratifié complètement différencié. L'utilisation de cellules dérivées de carcinome, telles que les cellules Calu-3, a permis d'obtenir des épithélia unistratifiés, avec des cellules polarisées et confluentes, mais sans présence de cils. Toutefois, la culture de ces cellules en ALI génère des épithélia morphologiquement plus représentatif de la structure *in vivo* (214). Egalement, des lignées cellulaires transformées par des virus (les 16HBE14o-) ont été cultivées dans le but d'obtenir un modèle d'étude de cellules épithéliales bronchiques. Cela a mené à la formation de multicouches de cellules polarisées ayant un défaut de production de mucus (215). Enfin, des cellules primaires bronchiques ont été utilisées afin d'obtenir cette fois des cellules bien différenciées, représentatives du phénotype bronchique humain, mais avec un temps de demi-vie limité. Il est essentiel de cultiver ces cellules en ALI afin d'avoir des cellules polarisées complètement différenciées (216).

Nous essayons depuis une dizaine d'années maintenant de développer des techniques afin d'obtenir des structures pseudostratifiées bien différenciées ayant également des caractéristiques de différenciation identique à la situation *in vivo*. Les cellules épithéliales bronchiques primaires, plus particulièrement, présentent une différenciation mucociliaire comparable à la situation *in vivo* lorsque cultivées en ALI (217). Aujourd'hui, cette technique pour obtenir des épithélia *in vitro* est largement utilisée mais la caractérisation de ce modèle n'est pas complètement établie, même si la persistance du phénotype pathologique a bien été décrit (205).

La procédure de culture en ALI des cellules épithéliales bronchiques est chronophage ainsi que complexe, en ajoutant la difficulté qu'il est nécessaire d'avoir un nombre conséquent de matériel biologique pour pouvoir effectuer les expériences (218). C'est la raison pour laquelle nous voulons décrire les conditions optimales d'obtention d'épithélium bronchique cultivé ALI, afin d'adresser une liste de facteurs de risque pouvant prédire le succès de la prise de la culture.

Cette étude a été réalisée par deux centres experts permettant le recueil d'échantillons de 2009 à 2013. Seulement 40% des biopsies provenant des 463 bronchoscopies

effectuées ont permis d'obtenir un épithélium bronchique exploitable, cultivé en ALI pendant 28 jours. Le pourcentage de prise de la culture paraît faible mais reflète complètement les difficultés techniques de la méthode.

Ensuite, afin de caractériser l'évolution de la différenciation dans notre modèle, nous avons comptabilisé la proportion des types cellulaires présents au cours de la culture cellulaire. Des marqueurs spécifiques des cellules ciliées (anticorps anti-tubulineIV), des cellules à mucus (anticorps anti-MUC5AC) et des cellules basales (anticorps anti-p63) ont été utilisés. Au stade initial de différenciation mucociliaire (au jour 0 de culture en ALI), nous détectons des populations de cellules souches, marquées p63+ ou indifférenciées, qui ensuite régressent au cours de la culture. Il a déjà été rapporté que les cellules basales étaient impliquées dans la régénération de l'épithélium bronchique humain(38). Au contraire, les cellules ciliées et à mucus augmentent en proportion, de J7 à J14 de culture en ALI, pour atteindre leur différenciation maximale à J28. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes décrivant la différenciation mucociliaire de l'arbre trachéobronchique (219).

La découverte majeure de notre étude est de corrélérer le succès de la culture en ALI par la présence de cellules ciliées qui battent au niveau de la biopsie initiale. Il aurait été intéressant d'étudier le profil histologique de ces biopsies, mais tous les échantillons obtenus lors des bronchoscopies ont été utilisés afin d'optimiser les chances de prise de la culture. Ce résultat est-il le reflet d'un rôle progéniteur des cellules ciliées, ou seulement un indice visuel de la viabilité cellulaire des cellules initialement présentes sur la biopsie ? D'autres expériences doivent être faites pour répondre à cette question.

8. Conclusion de l'article 3

La biologie des cellules souches de l'épithélium bronchique reste inconnue. L'identification de leurs mécanismes cellulaires et moléculaires, impliqués dans la réparation et la prolifération cellulaire ainsi que dans la différenciation mucociliaire, en conditions normales et pathologiques, pourrait apporter une meilleure connaissance de la différenciation cellulaire. Ainsi, il sera possible d'envisager le développement de

nouvelles stratégies thérapeutiques ou de nouvelles méthodes de reconstruction des voies respiratoires tels que des trachées ou des bronches artificielles.

III. Supplémentation exogène en CCSP

1. Résumé de l'article 4

Un déficit en cellules Club et en protéine CCSP est observé chez les patients atteints de BPCO et d'autres maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme ou le syndrome de bronchiolite oblitérante (78, 171, 220). Il semble évident que les cellules CCSP+ jouent un rôle dans la prolifération cellulaire ainsi que dans l'immunomodulation et l'anti-inflammation via sa protéine sécrétée CCSP (35, 105, 181, 183). Cependant, comme discutés précédemment, la plupart des travaux ont été effectués dans un modèle murin ayant un phénotype cellulaire différent de l'épithélium respiratoire humain.

Nous avons donc étudié l'effet de la supplémentation en CCSP sur l'inflammation bronchique dans la BPCO, dans le modèle *ex vivo* d'épithélium bronchique développé dans notre laboratoire.

Nous avons réalisé une analyse morphométrique des biopsies bronchiques initiales de 13 patients BPCO, 8 fumeurs et 8 sujets contrôles. Les cultures en ALI de ces mêmes biopsies ont ensuite été exposées au CSE et traitées ou non avec CCSPrh. Les concentrations en IL8 et en protéine CCSP ont été déterminées dans les surnageants épithéliaux à l'état de base et après stimulation tabagique.

Nous avons montré que :

- 1) Au niveau des biopsies bronchiques, la densité cellulaire des épithélia de patients BPCO est plus importante tandis que les cellules marquées CCSP+ sont moins présentes comparativement à des épithélia de sujets sains ($p=0.03$) (Table 2).
- 2) A l'état de base, les épithélia de BPCO cultivés en ALI sécrètent moins de protéine CCSP ($p=0.04$) et plus d'IL8 ($p<.0001$) (Figure 2a et 3a).
- 3) La supplémentation exogène en CCSP des épithélia de BPCO cultivés en ALI permet de diminuer la sécrétion d'IL8 induite par le CSE (Figure 3b). Cela

permet de rétablir des concentrations en IL8 proche de celles mesurées dans les surnageants d'épithéla de fumeurs et de sujets sains.

- 4) Une corrélation inverse est observée entre la sécrétion d'IL8 par les épithéla cultivés en ALI et la densité de cellules CCSP+ dans les biopsies bronchiques correspondantes ($p=.0073$) (Figure 4).

2. Article 4 : « Supplementing Defect in Club Cell Secretory Protein Attenuates Airway Inflammation in COPD. »

Publié dans *Chest* en 2014

Supplementing Defect in Club Cell Secretory Protein Attenuates Airway Inflammation in COPD

Anne Sophie Gamez, MD; Delphine Gras, PhD; Aurélie Petit, PhD; Lucie Knabe, MSc; Nicolas Molinari, PhD; Isabelle Vachier, PhD; Pascal Chanez, MD, PhD; and Arnaud Bourdin, MD, PhD

BACKGROUND: Club cell secretory protein (CCSP) is a protective biomarker associated with annual decline in lung function. COPD progression results from an imbalance between injury and repair initially triggered by cigarette smoking.

OBJECTIVE: We investigated the effect of CCSP as a therapeutic strategy to restore the balance between injury and repair in COPD simultaneously, validating an ex vivo air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cells.

METHODS: Endobronchial biopsy specimens (EBBs) were obtained from 13 patients with COPD, eight smokers, and eight control subjects. Morphometric analysis of the initial EBBs was performed. ALI cultures derived from the same EBBs were exposed to cigarette smoke extract (CSE) with or without exogenous recombinant human CCSP (rhCCSP) supplementation. CCSP and IL-8 concentrations were assessed at steady state and after CSE exposure.

RESULTS: Morphometric analysis of the initial EBBs showed increased cell density but decreased immunostaining of CCSP+ cells in EBBs of patients with COPD ($P = .03$ vs control subjects). At steady state, lower CCSP ($P = .04$) and higher IL-8 levels ($P < .0001$) were found in COPD ALI epithelium. Exogenous rhCCSP supplementation dampened CSE-induced IL-8-release in patients with COPD and returned to levels similar to those of smokers and control subjects ($P = .0001$). A negative correlation was found between IL-8-release in ALI and CCSP+ cell density in initial biopsy specimens ($P = .0073$).

CONCLUSIONS: In vitro, rhCCSP exogenous supplementation can reverse CSE-induced IL-8 release in biopsy specimens from patients with COPD, indicating a potential use of this strategy in vivo.

CHEST 2015; 147(6):1467-1476

Manuscript received May 15, 2014; revision accepted November 3, 2014; originally published Online First December 4, 2014.

ABBREVIATIONS: ALI = air-liquid interface; CCSP = club cell secretory protein; CSE = cigarette smoke extract; DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole; EBB = endobronchial biopsy specimen; LDH = lactate dehydrogenase; PBS = phosphate-buffered saline; rhCCSP = recombinant human club cell secretory protein

AFFILIATIONS: From the Département de Pneumologie et Addictologie (Drs Gamez, Petit, Vachier, and Bourdin and Ms Knabe), Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU Montpellier; INSERM CNRS U1067 UMR7333 (Drs Gras and Chanez), Aix Marseille Université, Marseille; Département de l'Information Médicale (Dr Molinari), CHU Montpellier, Montpellier; UMR729 MISTEA (Dr Molinari), Montpellier SupAgro, Montpellier; Département des Maladies Respiratoires (Dr Chanez),

Hôpital Nord, AP-HM, Marseille; and INSERM U1046 (Ms Knabe and Dr Bourdin), Université Montpellier 1 et 2, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU Montpellier, France.

FUNDING/SUPPORT: Master's degree support was provided to Dr Gamez by Association Pour Assistance Respiratoire à Domicile.

CORRESPONDENCE TO: Arnaud Bourdin, MD, PhD, Département de Pneumologie et Addictologie, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 ave Doyen Gaston Giraud, CHU Montpellier, 34295 Montpellier Cedex 5, France; e-mail: a-bourdin@chu-montpellier.fr

© 2015 AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS. Reproduction of this article is prohibited without written permission from the American College of Chest Physicians. See online for more details.

DOI: 10.1378/chest.14-1174

Imbalance between injury and repair is thought to play a critical role in COPD progression, as depicted by the presence of peribronchiolar fibrosis and hyperplasia of mucus-secreting epithelial cells.¹ Interestingly, the club cell secretory protein (CCSP) polymorphisms have been involved in COPD pathogenesis,² while serum CCSP level was found to be a major protective biomarker associated with annual decline of lung function.³ Club cells⁴ are thought to be a heterogeneous cellular population⁵ that plays a protective role in COPD thanks to its roles in proliferation (as a resident stem cell niche), detoxification, antiinflammation, and immunomodulation.⁶⁻⁹ Now a large body of evidence supports the notion that these cells play a critical role in epithelial regeneration and airway repair after injury.¹⁰ Moreover, fewer CCSP-producing cells has been observed in COPD and other chronic airway diseases with a remodeling feature, such as asthma or post-transplant obliterative bronchiolitis.¹¹⁻¹⁶

CCSP is a 10-kDa protein. It is the most abundant protein found in BAL (2-4 mg/L) in humans. It is a small, globular, nonglycosylated, monodimeric protein. Its roles cover endogenous antiinflammatory properties through phospholipase A2 inhibition¹⁷ and subsequent decreased eicosanoid production. CCSP is also known to play an immunosuppressive role, predominantly against

T-helper 2 cells. It is an antioxidant protein that contains a hydrophobic pocket for phospholipids and pollutants. Other properties may involve a direct interaction with

FOR EDITORIAL COMMENT SEE PAGE 1447

neutrophils that are potential, key cellular partners in COPD.¹⁸

Most of these findings rely on animal studies, in which club-cell biology is rather different from cell biology in humans. In mice, club cells are the predominant cell type in the airway from the trachea to the terminal bronchiole.⁸

Air-liquid interface (ALI) cultures of airway epithelium obtained from endobronchial biopsy specimens (EBBs) collected during bronchoscopy allow new insights into the dynamics and interactions of different epithelial cell phenotypes at steady state and after stimulation, in health and disease.¹⁹⁻²² We investigated if a CCSP defect is a hallmark of the airway epithelium in COPD and if it could be reproduced *ex vivo* in ALI cultures. We tried to restore the imbalance between injury and repair by using exogenous CCSP supplementation in ALI cultures obtained from control subjects, smokers, and patients with COPD, and from cultures exposed to cigarette smoke extracts (CSEs), with IL-8 release being the marker of injury.

Materials and Methods

Subjects

The study recruited 29 subjects (13 patients with COPD, eight smokers, and eight control subjects who had never smoked) at the Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier, France, in 2010. COPD diagnosis was based upon evidence of nonreversible obstructive airflow FEV₁/FVC < 0.7, FEV₁ improvement after inhaling 200 to 400 µg of albuterol < 12% and 200 mL, and a smoking history of > 10 pack-years; and without any evidence for alternative diagnosis according to the best standard of care (ie, no history of any other respiratory disease based on clinical examination or CT scan findings). Smoking status was recorded (active vs weaned). Smokers and healthy subjects had no airflow limitation. At the time of EBB collection, patients were at steady state and free of any exacerbation for at least 6 weeks. Bronchoscopy was performed when indicated by a chest physician, usually for peripheral-nodule exploration or other CT scan abnormalities. Bronchoscopy indication in control subjects was checked by the operator before enrollment and confirmed as follows: foreign body suspicion and/or removal (n = 5), traumatic pneumomediastinum (n = 2), and CT scan abnormality (n = 1; corresponded to a peripheral nodule in a young patient without any respiratory disease, but discovered with an opacity at medical occupational visit on systematic chest radiograph [final diagnosis, hamartochondroma]). The study protocol was approved by the ethics committee of our institution (approval No. 2013-A00553-42), and all patients agreed to participate by reading and signing written informed consent forms. All measurements and experiments were performed in a blinded fashion.

Endobronchial Biopsy Specimens

All subjects underwent flexible bronchoscopy, and two to three biopsy specimens were collected from each patient by using alligator forceps

(Olympus Corp) on a subsegmental bronchus of the left lower lobe, as previously described.²³ Briefly, local anesthesia (lidocaine, 1%-5%; maximum dose, 300 mg; AstraZeneca plc) was administered to the nasal and buccal cavity, followed by insertion of a fiber-optic bronchoscope (Olympus BF20; Olympus Corp) into the trachea through the nose.

Measurements of Basement Membrane and Epithelial Thickness and of CCSP Positive Staining

One biopsy specimen from each patient was fixed in neutral 4% formaldehyde buffer and embedded in paraffin. Four to six sections were apposed on a slide and stained with hematoxylin and eosin. Basement membrane and epithelial thicknesses were expressed as the average area-to-length ratio using Wilson's method, as previously described.²⁴ All measurements were generated with a light microscope at × 400 magnification (Olympus TH2; Olympus Corp) linked to a charged-couple device camera (Sony DXC950P; Sony Corp). Morphometric analyses were performed using dedicated software (ImageJ; US National Institutes of Health). The pixel resolution was 0.02 µm.

CCSP staining was performed using CC protein human rabbit polyclonal antibody (Biovendor Inc). The stained area was expressed as a percentage of the total epithelial area. All nuclei were manually counted and cell density per µm² of epithelial area was computed. All well-oriented (ie, perpendicular to the basement membrane with respect to a pseudostratified organization) fields per slice were measured. Results were expressed as a density of CCSP+ cells (stained area of CCSP divided by total cell density).

To further characterize CCSP-expressing cells, dual staining was performed using, respectively, MUC5AC (Abcam plc) and tubulin IV (Sigma-Aldrich Co LLC) antibodies in four patients with COPD and

four control subjects. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (DAPI stain; Sigma-Aldrich Co LLC) was applied for nuclei counterstaining. Negative control subjects were assessed by applying the secondary antibody only (Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG for MUC5AC and tubulin IV, and Alexa fluor 555 donkey anti-rabbit IgG for CCSP, respectively (both from InVitroGen Corp). Morphometric analysis was done at $\times 40$ magnification using dedicated software (Cell P; Olympus Corp). Total epithelial cell count was obtained by assessing the number of DAPI-counterstained nuclei, and different cell types were assessed. For each biopsy specimen, all adequate fields were analyzed eliciting computations from epithelial areas corresponding to 1 to 1.5 mm of the basement membrane length.

Human Bronchial Epithelial Cell Primary Cultures Under ALI

Primary human bronchial epithelial cells were obtained from remaining EBBs (usually two) and cultured under ALI conditions, as previously described by Gras et al.¹⁹ Cells were maintained in culture for 21 days to obtain a differentiated cell population with a mucociliary phenotype.

Cigarette Smoke Extract

Commercial cigarettes (Marlboro; Philip Morris USA Inc) were smoked by continuous suction in a chamber connected to a vacuum. Mainstream smoke was drawn through 30 mL of phosphate-buffered saline (PBS) that was prewarmed to 37°C by application of a vacuum to the vessel containing the PBS. Each cigarette was smoked for 8 min, and three cigarettes were used per 30 mL of PBS to generate a CSE-PBS solution. This solution was adjusted to pH 7.4 and the solution was sterilized through a 0.2- μ m filter. We obtained a 100% stock solution of CSE, diluted to 50%, 25%, and 10% CSE solution. Solution equivalent to 0% CSE contained PBS only.

Exposure of Bronchial Epithelial Cell Culture to CSE

Time-course and dose-response slopes were acquired in seven control samples at time points 6, 12, 24, and 48 h to select the most appropriate conditions. Mixed-effect models taking into account the repeated measurements showed no significant differences. Basically, CSE-induced IL-8 release was then visually chosen as being maximal without excessive

cell mortality at 24 h of CSE exposure at a dilution of 50%. Epithelial integrity and cell mortality were tested using morphologic appearance of the culture, and lactate dehydrogenase (LDH) release (enzyme-linked immunosorbent assay; Abcam plc) was assessed in the supernatant collected at 24 h in controlled conditions, and in CSE 50%, and compared with Triton 1% (used as a reference for 100% mortality) in three samples.

Exposure of Bronchial Epithelial Cells to Recombinant CCSP

Inhibitory potentials of recombinant human CCSP (rhCCSP) (rhUteroglobin/SCGB1A1; R&D Systems Inc) were tested at two different concentrations: 3 and 0.3 μ g/mL, which were the maximal and minimal concentrations found in BAL. rhCCSP was applied at the apical pole of culture cells in ALI with and without CSE.

Measurement of IL-8 and CCSP Concentrations

IL-8 and CCSP concentrations were assessed in the apical lavage of ALI cultures before and after CSE stimulation using enzyme-linked immunosorbent assay kits (Diacclone SAS and Biovendor Inc, respectively). Apical lavage was a brief rinse of the apical side of the cell layer in culture with 200 μ L of PBS gently reaspirated. Total RNA was purified from cell lysates (RNeasy; Qiagen NV), and cDNA was synthesized (Ready-to-Go RT-PCR beads; General Electric Co). Human CCSP gene expression was determined by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (LightCycler480; F. Hoffmann-La Roche Ltd) using SybrGreen and specific primers (Eurofins MWG Operon Inc), and using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an internal control.

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as mean and SD when normally distributed and then compared using analysis of variance; in other cases, median and interquartile ranges were considered and comparisons done using a nonparametric test. A mixed-effect model was built to test for repeated measures when applicable. A nonlinear regression was tested for correlations between initial biopsy-specimen data derived from morphometric analysis and data generated upon ALI cultures. As there were no data available in the literature, the study size was based upon our preliminary results.

Results

Subject Characteristics

Bronchial biopsy specimens from 13 patients with COPD, eight smokers, and eight healthy subjects successfully grew in ALI culture and were considered for analysis. Clinical characteristics of the subjects are reported in Table 1. Most patients with COPD had mild airflow obstruction, were men, and had been weaned from smoking for more than 1 year. Cumulative smoking history was similar in patients with COPD and smokers. Patients with COPD were taking more medications than the smokers, including inhaled corticosteroids and long-acting bronchodilators.

Morphometric Analysis and CCSP Staining in Proximal Airways

Morphometric analysis showed a significant increase in epithelial cell density in COPD as compared with smokers and control subjects (Table 2). While negative control cultures (secondary antibody only) showed no detectable staining, we found a significant decrease in

CCSP-expressing cell density in the airway epithelium obtained from patients with COPD ($P = .030$ between control subjects and COPD) (Table 2). Representative pictures of CCSP immunostaining are given in Figures 1A and 1B. CCSP-expressing cells usually presented as undistinguishable epithelial cells, nonciliated and non-mucous, with staining predominant at the apical side next to the lumen. Representative pictures of dual staining assessed for CCSP-MUC5AC and CCSP-tubulin IV are presented in Figure 1C. Basically, only few cells exhibited dual staining for both MUC5AC and CCSP, and this never occurred with tubulin IV. Similar levels of those double-positive CCSP-MUC5AC cells were seen in cultures from patients with COPD and control subjects. More MUC5AC- and fewer CCSP-expressing cells were observed in cultures from patients with COPD (ratio CCSP/MUC5AC-expressing cells, 0.2 ± 0.1 vs 0.8 ± 0.8 ; $P = .05$).

CCSP in Upper Lavage of Cell Cultures

CCSP concentrations were significantly lower in the apical lavage of ALI cultures from patients with COPD

TABLE 1] Demographic Description of the Subjects

Characteristics	COPD (n = 13)	Smokers (n = 8)	Control Subjects (n = 8)	P Value
Age, mean ± SD, y	60.6 ± 14.2	47.7 ± 17.4	44.1 ± 22.9	.1422
Sex, % male	92.3	62.5	50	.0660
Cumulative smoking, mean ± SD, pack-y	37.3 ± 17.7	40.0 ± 16.8	NA	.7880 ^a
FEV ₁ /FVC, mean ± SD	0.547 ± 0.135	0.805 ± 0.076	0.782 ± 0.058	<.0001
FEV ₁ , mean ± SD, %	59.8 ± 25.7	91.1 ± 10.4	106.3 ± 18.4	.0004
GOLD 2011 status, % I-II	61	NA	NA	NA
Smoking status, % weaned > 1 y	69.3	0	NA	NA
Treatments, %				NA
ICS	39	0	0	
LABA	54	0	0	
LAMA	39	0	0	
Other ^b	23	25	0	

GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; ICS = inhaled corticosteroid; LABA = long-acting β-adrenoceptor agonist; LAMA = long-acting muscarinic antagonist; NA = not applicable.

^aDifference between patients with COPD and smokers.

^bOther treatments included statins and angiotensin-converting enzyme inhibitors, respectively, in three and two patients with COPD and statins in two smokers.

when compared with that of control subjects ($P = .040$). CSE was added at 50% for 24 h and had no significant effect on CCSP release (Fig 2A). CCSP mRNA expression was not significantly different between groups (Fig 2B). Epithelial integrity and viability were unaffected by CSE 50%, as direct observation of the cultures showed persistent cilia beating and mucus secretion; LDH concentrations remained similar to control conditions and lower than cultures exposed to Triton 1% (Fig 2C).

rhCCSP Modulates CSE-Induced IL-8 Release

Basal levels of IL-8 were significantly increased at steady state and after CSE exposure in ALI cultures from patients with COPD ($P = .048$) (Fig 3A). Exogenous supplementation with rhCCSP dramatically reduced CSE-induced IL-8 release in patients with COPD (mixed-effect model, overall P value in COPD = .0005; combined group and rhCCSP effect in COPD, $P = .0001$ for both rhCCSP concentrations of 300 and 3,000 ng/mL). There was no significant effect in other groups and conditions (Fig 3B). At the basolateral side, IL-8 con-

centrations were similar in upper lavages (t test $P = .74$ for $n = 11$; as some data were missing, only upper lavages were analyzed).

Correlation Between CCSP+ Cells and Basal IL-8 Levels

Exploratory correlations between initial biopsy and culture finding were tested. The number of CCSP-expressing cells in the initial EBB was significantly negatively correlated with the initial IL-8 concentration in the apical ALI culture lavage following an exponential distribution ($r^2 = 0.7249$, $P = .0073$) (Fig 4).

Discussion

In the present study, we first demonstrated fewer CCSP+ cells associated with an increased epithelial density in the proximal airways of patients with COPD. For the first time to our knowledge, decreased CCSP production contrasted with increased IL-8 production was reproduced in the ex vivo model of ALI culture of bronchial epithelium, mimicking the imbalance between

TABLE 2] Morphometric Analysis of the Initial Endobronchial Biopsy Specimens

Criteria	COPD (n = 13)	Smokers (n = 8)	Control Subjects (n = 8)	P Value
Basement membrane thickness, μm	8.8 ± 0.9	12.0 ± 2.1	10.1 ± 4.3	.389
Epithelial thickness, μm	55.8 ± 22.6	42.4 ± 7.1	41.4 ± 8.3	.144
Epithelial cell density (No. of cells/mm BM)	0.640 ± 0.403	0.337 ± 0.106	0.305 ± 0.055	.003
CCSP+ cell density (% stained area/cell density)	10.8 ± 9.9	35.9 ± 59.2	51.6 ± 33.4	.030

Data given as mean ± SD. BM = basement membrane; CCSP = club cell secretory protein.

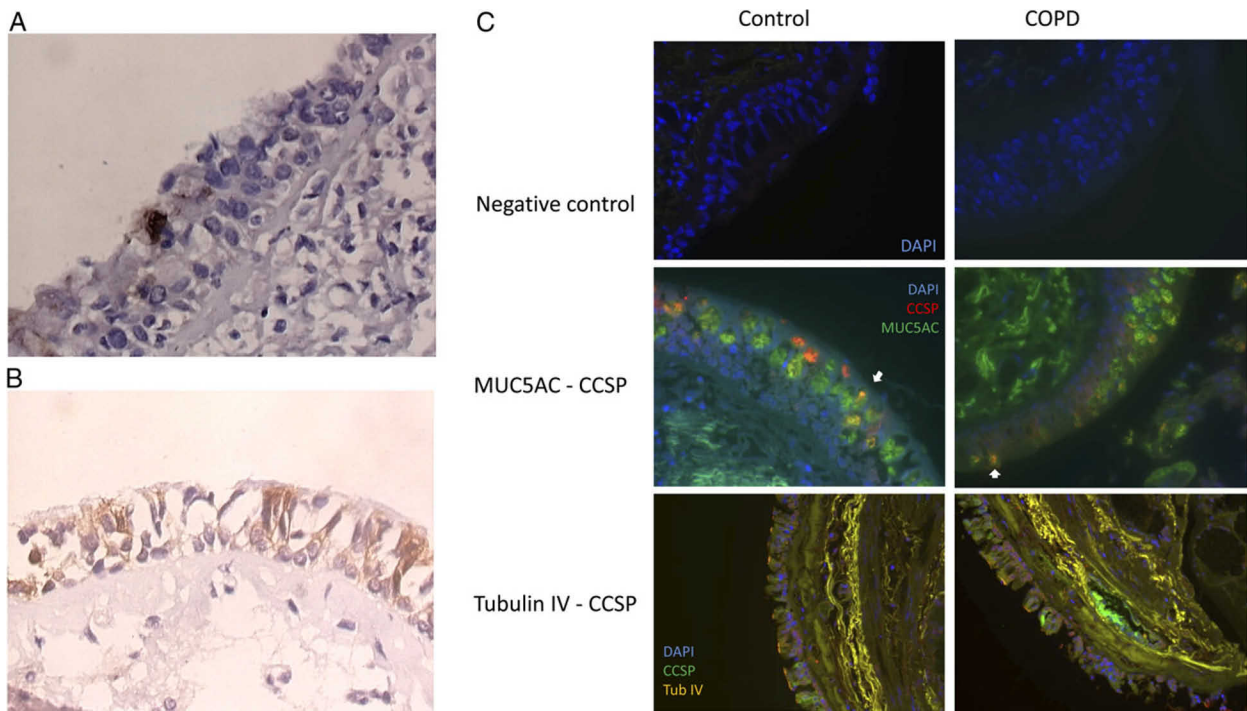


Figure 1 – Representative pictures of CCSP staining in paraffin-embedded biopsy specimens (CCSP stain, original magnification $\times 400$). A, Staining of a biopsy specimen from a patient with COPD. B, Only few apical CCSP+ stained areas are seen contrasting with a wider repartition and intensity in control subjects. C, Representative pictures of dual staining for CCSP-MUC5AC and CCSP-tubulin IV in specimens from control subjects and patients with COPD and their respective control cultures (secondary antibodies only) observed in paraffin-embedded, initial bronchial biopsy specimens. White arrows indicate dual-stained cells. CCSP = club cell secretory protein; DAPI = 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

inflammation and repair that are the hallmarks of COPD. Second, addition of rhCCSP in ALI cultures, stimulated by CSE, showed a dramatic decrease of apical IL-8 released in patients with COPD. Finally, density of CCSP-expressing cells in the initial EBB negatively correlated with basal IL-8 release assessed during ALI culture.

CCSP-related cells were reported in the proximal airways in the present study and were found in our reconstituted model. These cells were initially described in the distal airways, but they have been found by other authors in the whole bronchial tree.^{14,25} The present findings confirmed previous reports^{13,14,25} showing fewer CCSP+ cells in various diseases, including COPD and bronchiolitis obliterans syndrome, at the distal level. Of note, CCSP-expressing cells in the proximal airways may also express MUC5AC but not tubulin IV, suggesting a potential of CCSP-expressing cells to differentiate into goblet cells. In that case, double-stained cells may represent cells following this process and expressing both markers transiently.^{5,20}

The decrease in CCSP release from the reconstituted epithelium in ALI was consistent with previous reports showing a decreased level in BAL and sputum fluid supernatants.^{11,26} Some reports related CCSP polymor-

phisms to COPD clinical and functional characteristics. CCSP was proposed as a potential biomarker that may protect against accelerated FEV₁ decline in COPD.^{2,3} This came with the development of the pneumoprotein serum levels increase as pneumoproteins leak from the airway due to various injuries.²⁷

The defect in CCSP cells and the low level observed in the present study suggest a crucial role for CCSP as a marker of structural changes in the epithelium in COPD. CCSP can orchestrate regeneration/repair at the site of epithelial injury, especially in distal airways. We extended this role to the whole bronchial tree. It can be an important marker for COPD and a potential agent participating in the healing process.

ALI cultures are widely used as interesting human-derived cellular models to test new hypotheses and treatments in chronic airway diseases. We reported that airway epithelial cell phenotype was sustained ex vivo in severe asthma.¹⁹ These findings led us to use this model in COPD and investigate new mechanisms associated with this devastating disease.

Using this ex vivo model, we report an exaggerated release of the inflammatory mediator IL-8 and a

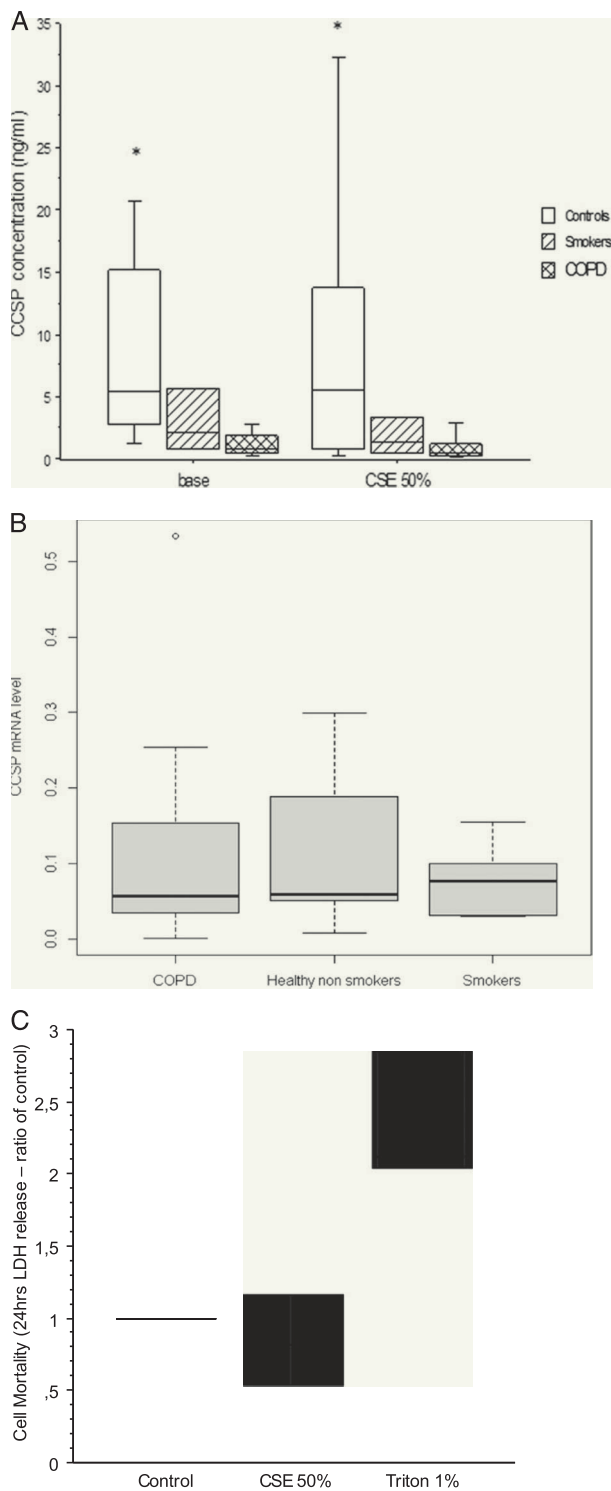


Figure 2 – A, CCSP levels in air-liquid interface (ALI) apical lavage (between-group $P = .04$ at baseline; CSE had no significant effect [mixed-effect model $P = .84$ for interaction between condition and groups]). Boxplots display median and interquartile ranges, while error bars represent 95% CIs. B, CCSP mRNA values at baseline (between-group $P = .72$). Boxplots display median and interquartile ranges, while whisker bars represent 1 SD above the mean. Outliers are plotted as individual points. C, LDH release at 24 h in the ALI supernatant from cultures unexposed (control), exposed to CSE 50%, and compared with Triton 1%. CSE = cigarette smoke extract; LDH = lactate dehydrogenase; mRNA = messenger RNA. See Figure 1 legend for expansion of other abbreviation.

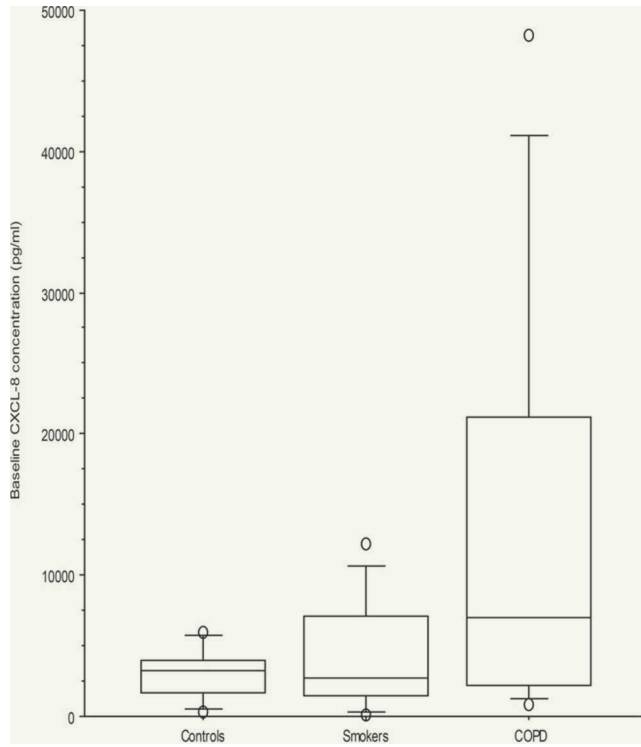
decreased CCSP release in COPD. We used rhCCSP at different doses that reproduced the range of in vivo BAL concentrations. Our results seemed unaffected by the dose. We carefully checked the baseline spontaneous CCSP release levels, and what we observed was not related to CSE.

Those findings fit previous data^{28,29} obtained using BAL^{30,31} or induced sputum analysis.^{11,32} They can be combined with the numerous studies showing neutrophilic infiltration in biopsy specimens, as IL-8 is a well-known, potent, neutrophil chemoattractant factor.

Our data support the persistence or “memory” of a pro-inflammatory phenotype at the epithelial level in COPD despite the different steps of the culturing process and the duration of the procedure to restore a fully differentiated bronchial epithelium. Those findings indicate that abnormal epithelium is a constant characteristic of the bronchi in COPD and may be a target for a real disease-modifying drug. Critical views on epigenetic transformation of the airway epithelium in COPD are required to better understand whether it can be reversed or not.³³⁻³⁶

Various microorganisms and active smoking are known proinflammatory triggers of the epithelium in COPD. Of note, none of the patients with COPD were still active smokers, and we performed biopsy procedures at a long distance from a potential infectious, related episode. The smokers included were quite heavy smokers (similar to COPD), so they were considered as not susceptible to COPD development. The cell cultures of the smoker group behaved more like control subjects than patients with COPD, which suggests that our findings are more related to the disease than the cigarette smoke only. Moreover, IL-8 release assessed in the apical lavage of ALI cultures at steady state was similar in smokers and control subjects. This was not the case for CCSP release, where a trend toward a decrease was also seen in smokers (the role of ongoing active smoking could not be properly addressed in our study). Potentially, most CCSP production may take place lower in the airways in vivo and the proximal assessment presently evaluated may not reflect the whole organ. Interestingly, we found no difference in messenger RNA expression between groups, suggesting posttranscriptional regulations, including the possibility of a nonsecreted form of the protein. The ability of rhCCSP supplementation to significantly reduced CSE-induced IL-8 release in patients with COPD led us to consider its use as a therapeutic agent.

A



B

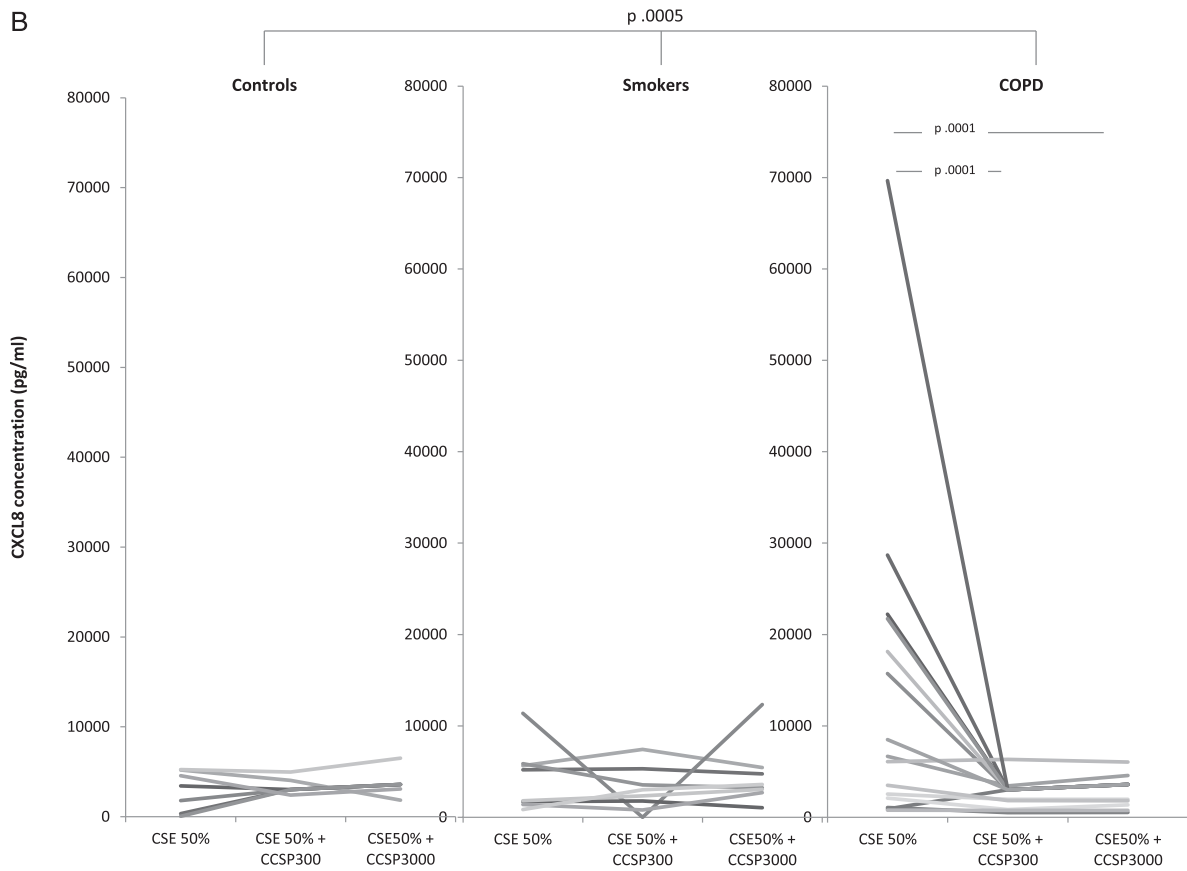


Figure 3 – A, Baseline IL-8 levels (P = .048). B, Effect of 24-h CCSP exogenous supplementation on CSE-induced IL-8 release in patients with COPD, smokers, and control subjects (mixed-effect model: overall P value in COPD = .0005; combined group and CCSP effect, P = .0001 for both CCSP concentrations of 300 and 3,000 ng/mL; no significant values in other groups and conditions). See Figure 1 and 2 legends for expansion of abbreviations.

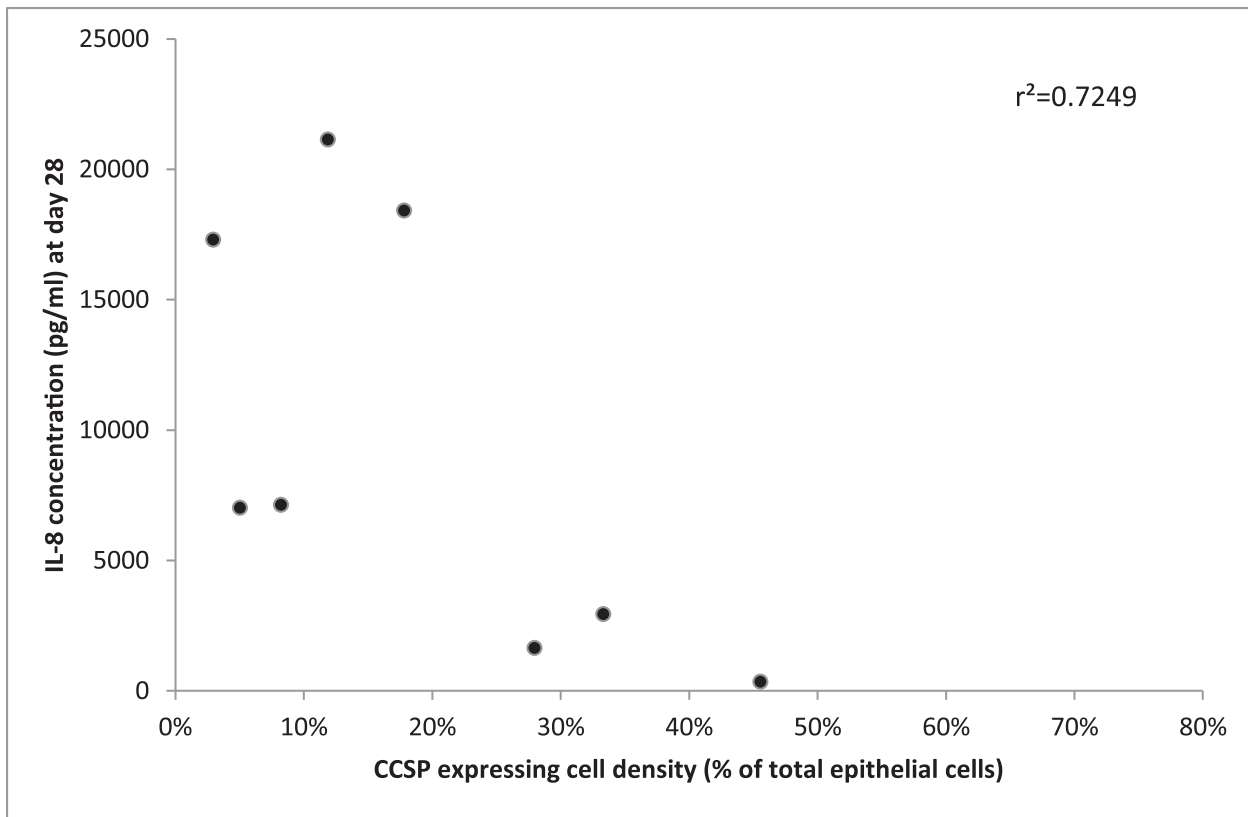


Figure 4 – Correlation between density of CCSP-expressing cells in the initial biopsy specimens and IL-8 levels in ALI culture at d 28 ($P = .0073$). See Figure 1 and 2 legends for expansion of abbreviations.

We observed a correlation between data obtained from the initial biopsy specimens and from the ALI culture. This also validates the consistency of our ex vivo model. This negative relationship between CCSP-expressing cells and IL-8 is a potential validation of their biologic link despite the absence of causative link. It also supports the hypothesis that a sustained imbalance between injury and repair is involved in COPD pathobiology, even at baseline, as this relationship is negative. A tight link between IL-8/neutrophils and CCSP has been already suggested in previous reports.^{6,8,11,14,18} The exponential shape of the relationship was not observed before. It suggests the existence of a still-unknown intermediate hub.

The absence of investigation of the mechanisms responsible for the defect in CCSP or for the inhibition of CSE-induced IL-8 release by rhCCSP use is a limitation of the present study. Regarding IL-8 inhibition, nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways are obvious candidate targets for rhCCSP, although the lack of sufficient samples and remaining material

precluded these investigations in the present study. Causes of decreased numbers of CCSP+ cells and CCSP epithelial release may involve susceptibility pathways worth understanding.

Whether CCSP acts directly or indirectly at the cell level, through an unknown cell receptor or by binding surrounding toxicants and then limiting their deleterious cell effects, is somewhat important, but the resulting less-pronounced inflammatory signal is potentially more important clinically. Recent evidence of nuclear factor- κ B and ERK1/2 downexpression under CCSP supplementation are providing meaningful insight into cell changes offered by CCSP, even though this does not really better address the question presently raised.³⁷

Overall, this study is an original contribution to a better understanding of COPD, with an emphasis on a defect in a physiologic host-defense process. These findings need confirmatory data but raise hope for a more mechanistic attempt, using exogenous CCSP, to interfere with the natural history of COPD.

Acknowledgments

Author contributions: A. B. had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. A. S. G. served as principal author. A. S. G. and I. V. contributed to the study concept; P. C. and A. B. contributed to the study design; A. S. G., D. G., A. P., L. K., P. C., and A. B. contributed to laboratory investigations; N. M. and A. B. contributed to data analysis and interpretation; A. S. G., D. G., A. P., N. M., I. V., and P. C. contributed to manuscript preparation; and L. K. and A. B. contributed to review of the manuscript.

Financial/nonfinancial disclosures: The authors have reported to *CHEST* the following conflicts of interest: Dr Chanez has provided consultancy services for Almirall SA, Boehringer Ingelheim GmbH, Centocor Biotech Inc, GlaxoSmithKline plc, Merck & Co Inc, AstraZeneca plc, Novartis AG, Teva Pharmaceutical Industries Inc, Chiesi Pharmaceuticals Inc, and Schering Plough Corp; has served on advisory boards for Almirall SA, Boehringer Ingelheim GmbH, Centocor Biotech Inc, GlaxoSmithKline plc, AstraZeneca plc, Novartis AG, Teva Pharmaceutical Industries Inc, Chiesi Pharmaceuticals Inc, Schering Plough Corp, and Merck & Co Inc; has received lecture fees from Almirall SA, Boehringer Ingelheim GmbH, Centocor Biotech Inc, GlaxoSmithKline plc, AstraZeneca plc, Novartis AG, Teva Pharmaceutical Industries Inc, Chiesi Pharmaceuticals Inc, Schering Plough Corp, and Merck & Co Inc; and has received industry-sponsored grants from Almirall SA, Boston Scientific Corp, Boehringer Ingelheim GmbH, Centocor Biotech Inc, GlaxoSmithKline plc, AstraZeneca plc, Novartis AG, Teva Pharmaceutical Industries Inc, Chiesi Pharmaceuticals Inc, Schering Plough Corp, and Merck & Co Inc. Dr Bourdin has served on advisory boards for Almirall SA, Boehringer Ingelheim GmbH, GlaxoSmithKline plc, AstraZeneca plc, and Novartis AG and has received lecture fees from Boehringer Ingelheim GmbH, GlaxoSmithKline plc, AstraZeneca plc, Novartis AG, and Chiesi Pharmaceuticals Inc. Drs Gamez, Gras, Petit, Molinari, and Vachier and Ms Knabe have reported to *CHEST* that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

Role of sponsors: The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or the preparation of the manuscript.

Other contributions: The authors would like to thank the Association pour l'Assistance Respiratoire à Domicile for their support.

References

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2645-2653.
2. Kim DK, Cho MH, Hersh CP, et al; ECLIPSE, ICGN, and COPDGene

- Investigators. Genome-wide association analysis of blood biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(12):1238-1247.
3. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, et al; ECLIPSE Investigators. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N Engl J Med*. 2011;365(13):1184-1192.
4. Winkermann A, Noack T. The Clara cell: a "Third Reich eponym"? *Eur Respir J*. 2010;36(4):722-727.
5. Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(8):718-725.
6. Hayashida S, Harrod KS, Whitsett JA. Regulation and function of CCSP during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(3):L452-L459.
7. Pilon AL. Rationale for the development of recombinant human CC10 as a therapeutic for inflammatory and fibrotic disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:280-299.
8. Singh G, Katyal SL. Clara cell proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:43-58.
9. Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*. 2003;171(2):1051-1060.
10. Perl AK, Riethmacher D, Whitsett JA. Conditional depletion of airway progenitor cells induces peribronchiolar fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):511-521.
11. Bourdin A, Kotsimbos T, Nguyen K, et al. Non-invasive assessment of small airway remodelling in smokers. *COPD*. 2010;7(2):102-110.
12. Bourdin A, Mifsud NA, Chanez B, Chanez P, Snell G, Kotsimbos TC. Clara cells and injury post lung transplantation: an evolving story. *Am J Transplant*. 2013;13(5):1370.
13. Bourdin A, Mifsud NA, Chanez B, et al. Donor Clara cell secretory protein polymorphism is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*. 2012;94(6):652-658.
14. Pilette C, Godding V, Kiss R, et al. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):185-194.
15. Shijubo N, Itoh Y, Shigehara K, et al. Association of Clara cell 10-kDa protein, spontaneous regression and sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2000;16(3):414-419.
16. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, et al. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):930-933.
17. Shiyu S, Zhiyu L, Mao Y, et al. Polydatin up-regulates Clara cell secretory protein

to suppress phospholipase A2 of lung induced by LPS in vivo and in vitro. *BMC Cell Biol*. 2011;12:31.

18. Katavolos P, Ackerley CA, Clark ME, Bienzle D. Clara cell secretory protein increases phagocytic and decreases oxidative activity of neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;139(1):1-9.
19. Gras D, Bourdin A, Vachier I, et al. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1259-1266e1.
20. Gras D, Chanez P, Vachier I, Petit A, Bourdin A. Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. *Pharmacol Ther*. 2013;140(3):290-305.
21. Warner SM, Hackett TL, Shaheen F, et al. Transcription factor p63 regulates key genes and wound repair in human airway epithelial basal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(6):978-988.
22. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):549-556.
23. Jeffery P, Holgate S, Wenzel S; Endobronchial Biopsy Workshop. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(6 pt 2):S1-S17.
24. Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(4):363-371.
25. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 pt 1):1585-1591.
26. Broeckaert F, Clippe A, Knoops B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:68-77.
27. Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(2):646-678.
28. Heijink IH, de Bruin HG, van den Berge M, et al. Role of aberrant WNT signaling in the airway epithelial response to cigarette smoke in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2013;68(8):709-716.
29. Starrett W, Blake DJ. Sulforaphane inhibits de novo synthesis of IL-8 and MCP-1 in human epithelial cells generated by cigarette smoke extract. *J Immunotoxicol*. 2011;8(2):150-158.
30. Cheng SL, Wang HC, Yu CJ, Yang PC. Increased expression of placenta growth factor in COPD. *Thorax*. 2008;63(6):500-506.
31. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005;60(4):293-300.

32. Vachier I, Vignola AM, Chiappara G, et al. Inflammatory features of nasal mucosa in smokers with and without COPD. *Thorax*. 2004;59(4):303-307.
33. Barnes PJ. Targeting the epigenome in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(8):693-696.
34. Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(7):543-559.
35. Wan ES, Qiu W, Baccarelli A, et al. Systemic steroid exposure is associated with differential methylation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(12):1248-1255.
36. Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(10):1295-1301.
37. Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzuki H, Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *Eur Respir J*. 2014;44(4):1002-1010.

3. Discussion de l'article 4

Nous retrouvons des cellules CCSP+ au niveau des voies aériennes proximales et celles-ci persistent lors de la culture en ALI de ces mêmes épithélia. Initialement, ce type cellulaire a été principalement décrit au niveau distal, mais plusieurs études ont depuis mis en évidence sa présence au niveau de l'arbre bronchique tout entier (34, 78).

La diminution de production de CCSP dans notre modèle *ex vivo* d'épithélium bronchique est cohérente avec les données de la littérature qui objectivent une diminution du taux de CCSP dans le LBA et dans les surnageants d'expectoration induite de patients BPCO (37, 77). Le déficit en cellules Club et le faible taux en CCSP des épithélia de BPCO suggèrent pour CCSP un rôle crucial comme marqueur des changements structuraux de l'épithélium.

La culture en ALI semble constituer un modèle *in vitro* fiable permettant de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques fins sous-tendant les maladies respiratoires chroniques. Nous avons déjà démontré que les cellules épithéliales bronchiques d'asthmatiques sévères étaient capables de garder leur phénotype après re-différenciation (205). Ces résultats nous ont mené à utiliser ce modèle dans la BPCO. Nous rapportons ici une production exagérée d'IL8 et une diminution de la production de CCSP par les épithélia *ex vivo* obtenus à partir de biopsies de patients BPCO. Ceci sous-tend l'hypothèse de la persistance d'un phénotype pro-inflammatoire au niveau épithélial dans la BPCO, malgré les différentes étapes et la durée de culture nécessaires pour obtenir un épithélium pseudostratifié complètement différencié.

Le tabagisme actif et l'infection par de multiples microorganismes sont des déclencheurs connus de l'inflammation au sens large dans la BPCO. Il est important de noter qu'aucun des patients n'était fumeur actif et l'acte technique pour récupérer les biopsies a été fait à distance de toute exacerbation d'origine infectieuse. De façon similaire aux BPCO, les fumeurs inclus avaient un nombre de paquets-année élevé ; ils ont donc été considérés comme faisant partie de la large proportion de fumeur n'étant pas susceptibles de développer la maladie. Les cultures cellulaires en ALI des biopsies de fumeurs s'apparentent d'un point de vue macroscopique à celles des sujets témoins, suggérant que les résultats obtenus sont liés à la maladie plutôt qu'au

statut tabagique seulement. De plus, la production d'IL8 à l'état de base dans les surnageants de culture en ALI était la même pour le groupe fumeur et le groupe témoin. Ce n'était pas le cas pour CCSP dont la concentration était moindre dans le groupe fumeur mais de façon non significative. Nous n'avons pas observé de différence dans l'expression de l'ARNm de CCSP ce qui laisse supposer des modifications post transcriptionnelles.

La capacité de CCSPrh à diminuer de façon significative la production d'IL8 induite par le CSE chez les patients atteints de BPCO nous mène à considérer l'usage thérapeutique potentiel de cette protéine.

Nous avons observé que le déficit en cellules CCSP+ sur les biopsies bronchiques initiales est inversement corrélé au taux d'IL8 sécrété par ces mêmes échantillons cultivés en ALI. Cela valide d'autant plus la robustesse de notre modèle *ex vivo* et constitue un argument pour leur lien biologique potentiel, même si aucune relation de cause à effet n'a été établie.

4. Conclusion de l'article 4

Cette étude contribue à une meilleure compréhension de la BPCO. Pour la première fois, une corrélation entre le déficit en cellules CCSP+ et une augmentation de la densité cellulaire épithéliale est observée au niveau des voies aériennes proximales chez le patient souffrant de BPCO. Dans notre modèle *ex vivo* d'épithélium bronchique cultivé en ALI, nous sommes parvenus à reproduire une diminution de production de CCSP qui contraste avec l'augmentation d'IL8, mimant ainsi le déséquilibre inflammation/anti-inflammation objectivé *in vivo*. Par ailleurs, nous avons démontré que la supplémentation en CCSP exogène des épithélia en ALI de patients BCPO préalablement stimulés par le CSE permet une diminution significative de la sécrétion d'IL8 au niveau apical. Enfin, la densité de cellules CCSP+ dans les biopsies bronchiques initiales se retrouve inversement corrélée au taux d'IL8 basal des épithélia bronchiques correspondants cultivés en ALI. Il reste maintenant nécessaire de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la supplémentation en CCSP exogène car celle-ci semble pouvoir interférer avec l'histoire naturelle de la maladie.

5. Résumé de l'article 5

CCSP joue donc un rôle important dans la régulation de l'inflammation, comme nous avons pu le voir précédemment (221), en réduisant la production d'IL8 stimulée par la fumée de cigarette dans des cellules épithéliales bronchiques humaines. Aussi, il a été démontré que CCSP pouvait avoir des propriétés intéressantes sur les neutrophiles, l'inflammation neutrophilique étant une des caractéristiques de la BPCO.

Nous pensons que le déficit en protéine CCSP des patients atteints de BPCO peut être impliqué dans l'inflammation neutrophilique. Nous avons voulu évaluer l'interaction entre CCSP et les neutrophiles dans notre modèle cellulaire bronchique humain de BPCO et nous avons cherché à déterminer par quels mécanismes CCSP agissait.

D'une part, nous avons récupéré les neutrophiles de sujets sains volontaires. D'autres part, nous avons stimulé avec du CSE les épithélia *ex vivo* de cellules bronchiques de BPCO et de fumeurs, traités ou non avec CCSP, PDTC (inhibiteur de la voie NF- κ B) ou AACOCF3 (inhibiteur de la voie PLA2). Nous avons aussi cultivé en ALI des cellules bronchiques provenant de sujets sains, afin de comparer à l'état de base le comportement des neutrophiles face aux surnageants des épithélia de BPCO, de fumeurs et de sujets sains. Le chimiotactisme des neutrophiles sains a été étudié dans des chambres de Dunn. Nous avons ainsi analysé les paramètres suivants : le XFMI correspondant au ratio de la distance parcourue par les neutrophiles sains en 30 min et la position finale des neutrophiles sur l'axe des X à la fin de l'acquisition (c'est à dire dans le sens du gradient de concentration provoqué par les substances chimioattractantes). Les neutrophiles ont été mis en présence des surnageants épithéliaux stimulés ou non, et aussi mis en présence des différentes molécules étudiées. Enfin, nous avons testé par co-immunoprécipitation la relation entre CCSP et IL8.

Nous avons montré que :

- 1) A l'état de base, les surnageants de cellules épithéliales bronchiques de BPCO induisent une chimioattraction exagérée des neutrophiles sains par rapport aux surnageants de sujets sains (Figure 1a et 1b).
- 2) Lorsque les neutrophiles sains sont mis en présence des surnageants épithéliaux traités avec CCSP, stimulés ou non par du CSE, le chimiotactisme des neutrophiles est ralenti (Figure 2a et 2b). Le même effet est observé avec le traitement des épithélia avec les inhibiteurs de la voie NF- κ B et PLA2 (Figure E1a et E1b).
- 3) Lorsque les neutrophiles sains sont mis en présence de CCSP directement, aucun changement n'est constaté. Par contre, le chimiotactisme des neutrophiles sains provoqué par l'IL8 ou le fMLP est inhibé par l'ajout de CCSP (Figure 3).
- 4) CCSP co-immunoprécipite avec l'IL8 (Figure 4b et 4c).

6. Article 5 : « How does CCSP counterbalance airway epithelial-driven neutrophilic chemotaxis due to cigarette smoke ? »

Pour soumission à l'*AJRCCM*

How does CCSP counterbalance airway epithelial-driven neutrophilic chemotaxis due to cigarette smoke?

Lucie Knabe^{1,2}, Aurélie Petit², Delphine Gras³, Nicolas Molinari⁵, Pascal Chanez^{3,4}, Isabelle Vachier², Jean-Philippe Berthet², Arnaud Bourdin^{1,2}.

1. PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214.
2. Department of respiratory diseases, CHRU Montpellier, France.
3. CNRS UMR 7333, INSERM U1067, Aix Marseille University, France.
4. AP-HM, Department of respiratory diseases, Aix Marseille University, France.
5. IMAG U5149, Department of Medical Information, CHRU Montpellier, France.

Correspondence:

Professor Arnaud Bourdin
Department of Respiratory Diseases
Hôpital Arnaud de Villeneuve
CHU Montpellier
371 Av. Doyen G. Giraud
34295 MONTPELLIER Cedex 5, France
Telephone: + 33 4 67 33 61 26
Fax: +33 4 67 63 36 45
E-mail: a-bourdin@chu-montpellier.fr

Author contributions: LK collected the clinical data, performed the experiments and statistical analyses, interpreted the data and wrote the manuscript. AP helped perform the experiments. NM provided statistical expertise and helped analyze the data. DG, PC, JDV, IV and JPB participated in the study design, interpreted the data, and provided critical edits of the

manuscript. JPB recruited patients. AB designed the study, recruited patients, collected the clinical data, performed statistical analyses, interpreted the data, and provided critical edits of the manuscript. All authors provided critical review of the manuscript and approved its submission.

Running Head: Does CCSP counterbalance neutrophil chemotaxis?

Descriptor number:

Word count: 3420

At a Glance Commentary:

Scientific Knowledge on the Subject:

Neutrophils recruitment is exaggerated in COPD airways where they can play a devastating role. Club cells are deficient in COPD airways whereas their specific related protein CCSP may interfere with neutrophil chemotaxis.

What This Study Adds to the Field:

COPD airway epithelium increased neutrophil chemotaxis when compared to healthy controls. Treating airway epithelium with exogenous CCSP prevented baseline and CSE-induced neutrophil chemotaxis through mechanisms not exclusively IL8-dependant.

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

Abstract

Rationale: Airway neutrophilia is a feature of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Club Cell Secretory Protein (CCSP) is an endogenous anti-inflammatory product involved in maintaining airway homeostasis and inhibiting neutrophilic chemotaxis and is deficient in COPD.

Objectives: To investigate whether exaggerated airway neutrophilia was driven by the CCSP-defective COPD airway epithelium and could be rescued by restoring physiological CCSP concentrations.

Methods: COPD and smokers air-liquid interface cultures were exposed to CSE and pretreated or not with CCSP. Neutrophils were purified from healthy adult volunteers by Percoll density gradient centrifugation. Candidate chemoattractants of neutrophils and epithelial supernatants were tested in Dunn chemotaxis chamber.

Measurements and Main Results: At steady state, ALI-reconstituted COPD airway epithelium in a clean environment promoted an exaggerated neutrophilic chemotaxis compared to smokers and controls. Two different CCSP pathways were demonstrated to be involved in airway neutrophilia as: 1/ treating the airway epithelium with exogenous CCSP prevented baseline and CSE-induced neutrophil chemotaxis in similar extents than PLA2 and NF- κ B inhibitors. 2/ CCSP directly inhibited neutrophil chemotaxis induced by fMLP and IL8. Moreover, CCSP co-immunoprecipitated with IL8.

Conclusions: This study confirms that CCSP prevents airway neutrophilia in humans by an epithelial paracrine effect and a direct neutralization of IL8.

Abstract word count: 200

Keywords: COPD, neutrophils, CSE, CCSP, CC10

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a growing cause of morbidity and mortality worldwide. Airway neutrophilia is associated with an accelerated decline in lung function (1, 2) and with the severity of peripheral airway dysfunction in COPD (3, 4). In addition, increased neutrophilic inflammation is characteristic in patients with severe disease (5) and with acute exacerbations (6).

Chemotaxis, a process whereby cells migrate toward a chemical concentration gradient, critically mediates neutrophil recruitment in tissues (7). Neutrophils express multiple chemoattractant receptors and can be sensitive to individual chemoattractant gradients or their combinations. Several chemoattractants for neutrophils are found at increased concentrations in bronchial secretions of COPD patients. The most abundant and studied are Interleukin (IL)8 and Leukotriene B4 (LTB4) (8, 9). These chemokines bind to neutrophil CXCR1/CXCR2 and BLT1 GPCR respectively to amplify recruitment of cells (10). *In vitro* studies often used f-Met-Leu-Phe (fMLP) as a model due to its highly potent chemoattractant ability which acts through the formyl peptide receptors (FPRs) (11).

Interestingly, the Club cell secretory protein (CCSP) produced by nonciliated Club cells is known to play immunoregulatory and anti-inflammatory roles (12-14) and was shown defective in COPD airways (14-16). Many biological properties of CCSP have been described *in silico* and *in vitro*. CCSP is an antiparallel homodimer covalently bound by two disulfide bonds such as the dimer encloses a large internal hydrophobic pocket. This pocket provides an adequate volume to accommodate small hydrophobic molecules such as progesterone (17), polychlorinated biphenyls (18), or retinol (19). Furthermore, CCSP inhibits activation of several pro-inflammatory signaling pathways. The protein is described to be a natural inhibitor of

phospholipase A2 (PLA2) (20-22) thereby suppressing the arachidonic acid cascade. Also, it is thought to suppress nuclear factor kappa B (NFκB) activation (23, 24). It has been demonstrated *in vitro* and in animal models that CCSP inhibits fMLP-induced neutrophil chemotaxis (25). Indeed, in horses that developed neutrophilic airway inflammation, neutrophils were positively stained by CCSP. Incubating blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluids of these animals with CCSP significantly reduced the respiratory oxidative burst and increased the phagocytic activity of neutrophils (26). Also, increased lung neutrophils was observed in CCSP^{-/-} mice exposed to cigarette smoke (15) rescued by exogenous CCSP supplementation. Finally, in humans, adding CCSP to air-liquid interface cultures of COPD airway epithelia decreased the epithelial release of IL8 (14, 27).

The exact mechanisms by which CCSP mediates its anti-inflammatory activities including whether or not it binds to a receptor have not been determined yet. To date, its paracrine signalization is unknown and still hypothetical.

Current therapies used in COPD have little impact on disease progression. Exaggerated neutrophil presence in the airways suggests that more specific inhibitors may have therapeutic potential in COPD.

Noteworthy, serum, sputum and BAL CCSP levels were reduced in COPD patients but also depended on smoking status (28, 29).

We hypothesized that CCSP defect in COPD patients is involved in airway neutrophilia. Our aim is to test whether CCSP interacts with airway neutrophilic influx in a human model of COPD and to determine by which mechanisms. At a glance, we aimed to test whether restoring physiological concentrations of CCSP by exogenous supplementation could reduce exaggerated neutrophilic chemotaxis.

Methods

Patients

Bronchial slices from control subjects (n=4) smokers (n=10) and COPD patients (n=13) were collected during surgery. Subjects were recruited at the Arnaud de Villeneuve hospital, Montpellier, France, under a study protocol approved by the ethics committee (AOI 2000, CPP 000901, DGS 2001/0075) of our institution, and all patients agreed to participate by reading and signing written informed consent forms.

In vitro study

Reagents and antibodies

Recombinant human (rh) CCSP and anti-CCSP antibody were purchased from Biovendor (Brno, Czech Republic). RhIL8 and N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) were purchased from Sigma-Aldrich. Arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃), Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) were purchased from Abcam. Anti-IL8 antibody was purchased from Santa Cruz. Anti-CXCR1 antibody was purchased from R&D system and CXCR2 inhibitor was purchased from Tocris.

Cell culture

Human primary bronchial epithelial cells (HBECs) were obtained from surgically removed bronchial slices and cultured under air-liquid interface conditions, adapted from Gras et al. and Gamez et al. (14, 30). Briefly, bronchial epithelial cells were mechanically dissociated and suspended in Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM). After seeding in multiwell plates coated with a solution of fibronectin and collagen, cells were expanded in a flask (0.75 cm²) and then plated (250,000 cells per well) on uncoated nucleopore membranes in a 1:1 mixture

of BEGM and Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) applied at the basal side only to establish the air-liquid interface. Cells were maintained in culture for 28 days to obtain a differentiated cell population with a pseudostratified mucociliary epithelium. All cell cultures were maintained at 37°C under 5% CO₂. PLA2 superfamily members expression were checked by RTqPCR using specific primers (Table 2). Cells were treated for 24 h with CCSP, PDTC and AACOCF3 concomitantly or not with cigarette smoke extract (CSE) and the supernatants were collected for neutrophil experiments.

Cigarette smoke extract

CSE was prepared as previously described (14). Briefly, the smoke of 3 commercial cigarettes (Marlboro®) was withdrawn into a Pasteur pipette and bubbled into 30 ml of PBS. CSE was adjusted at pH 7.4 and sterilized through a 0.22µm filter. We obtained a 100% stock solution of CSE diluted to 50% for the experiments.

Isolation of peripheral blood neutrophils

Neutrophils were isolated from the whole blood of 4 healthy control subjects using discontinuous Percoll gradient followed by hypotonic lysis of residual red blood cells (31). The neutrophils (95% pure and 95% viable by exclusion of trypan blue) were resuspended in RPMI 1640 medium containing 0.15% bovine serum albumin.

Chemotaxis assay and analysis

The chemotaxis assay was performed using a Dunn Chamber (32). Peripheral neutrophils were placed on a coverslip and incubated for 20 min at 37°C. The coverslip was placed inverted onto the Dunn chamber. This slide comprised a bridge separating the inner concentric circle from the outer concentric circle. The outer circle was filled with the chemoattractants. Thereby, the

neutrophil chemotaxis depending on the chemoattractant gradient was observed on the bridge. Neutrophils chemotaxis were studied with a negative control (PBS), a positive control (fMLP), and cell supernatants previously stimulated or not, or with drugs alone. One part of the bridge region was recorded at 1-min intervals for 30 min using a Zeiss inverted microscope equipped with a 20x objective. Chemotaxis was quantified by the XFMI value, which is the ratio of the distance traveled during the acquisition and the final position of the neutrophils on the x-axis in the direction of the chemoattractant gradient.

ImageJ software was used to track cells and analyze the chemotaxis. All analyzes were performed by a single analyst, blinded to the subject group.

ELISA cross-reactivity

CCSP and IL8 cross-reactivity was tested by adding human recombinant CCSP protein to IL8 standard curve: secreted interleukin-8 were quantified by ELISA using the IL-8 Eli-pair kit (Diaclone) according to manufacturer's protocol.

Co-immunoprecipitation

To detect whether there was a potential interaction between CCSP and IL8, immunoprecipitation and immunoblotting were performed using anti-Protein A Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Proteins were immunoprecipitated by mouse anti-human IL8 antibody and proteins without antibody as a negative control. For co-immunoprecipitation experiments, western blot was performed using both mouse anti-human IL8 (1:500) and rabbit anti-human CCSP antibody (1:500). A solution of rhCCSP/rhIL8 were used as positive controls for CCSP and IL8 expression.

Statistical analyzes

Clinical data were expressed as mean \pm SEM. COPD patients, smokers and control subjects were compared using Kruskal-Wallis tests for quantitative data and Fisher tests for qualitative data.

Chemotactic data were expressed as mean \pm SEM. Paired comparisons were made using Mann-Whitney tests.

Data were considered statistically significant at p-value <0.05 . All graphical data and statistical analyses were generated with GraphPAD Prism software (Version 6.0).

Results

Subject characteristics

Bronchial epithelial cells successfully grew at the air-liquid interface in sufficient quantity to test and compare all conditions from thirteen COPD patients, ten smokers and four healthy subjects. Characteristics of these patients are summarized in table 1. COPD and smokers differed only by their pulmonary function test results whereas cumulative smoking history and smoking status were mostly similar.

The four volunteer control subjects who provided blood for isolation of neutrophils dedicated to chemotactic studies (mean age 47 y, 75% female, never smokers, normal pulmonary

function test, confirmed as healthy by a respiratory specialist (AB)) were free of any infection and medication for 8 weeks at least at the time of sampling.

COPD airway epithelium attract neutrophils

Figure 1 (a) displays representative examples of healthy neutrophil migratory tracks induced by supernatants of ALI-reconstituted airway epithelium derived from a healthy control, a smoker and a patient with COPD. fMLP was confirmed as a positive control and PBS as a negative control ($p < 0.0001$) in the Dunn chemotaxis chamber (figure 1b). Increased neutrophil chemotaxis was induced by COPD supernatants compared to control supernatants ($p = 0.0012$). On the contrary, there was no significant difference between neutrophil chemotaxis stimulated by ALI supernatant of smokers and controls.

Treating the airway epithelium with CCSP prevents neutrophil chemotaxis at steady state and when exposed to CSE - Pharmacological mimicking of CCSP inhibition of neutrophil chemotaxis

At baseline, 24h of epithelial supplementation with CCSP in smokers decreased the neutrophil chemotaxis ($p = 0.0043$) whereas no effect was observed with CCSP-supplemented COPD epithelia. ALI-reconstituted airway epithelia from smokers and COPD exposed to cigarette smoke extract increased neutrophil chemotaxis in all conditions. When the airway epithelium was exposed to cigarette smoke, CCSP prevented neutrophil chemotaxis which returned to nearly baseline values both in smokers and COPD ($p < 0.0001$ and $p = 0.0035$ respectively). Smokers epithelia were much more responsive than COPD to CSE ($p = 0.33$ and $p = 0.07$ respectively). COPD ALI-supernatant increased the chemotaxis only when stimulated with CSE. These results were summarized in Figure 2a and b. RTqPCR revealed that only iPLA2 and cPLA2

were expressed in our airway epithelium without differences between groups (data not shown).

NF- κ B inhibition (mediated by 24h of epithelial incubation with PDTC) or PLA2 inhibition (mediated by AACOCF3) induced exactly the same results than exogenous CCSP supplementation (Figure E1a and b).

CCSP directly inhibited neutrophil chemotaxis induced by fMLP and IL8.

We tested whether chemokines could be modulated by a direct CCSP effect without any epithelial interplay. Neutrophils in presence of rhCCSP covered as much distance as those confronted to PBS (figure 3a). CCSP reduced neutrophils migration towards the gradient of fMLP ($p < 0.0001$ for the XFMI) but not for the gradient of IL8. No effect of CXCR1/2 inhibitors was observed (figure 3a). As XFMI is the ratio of the distance traveled during the acquisition and the final position of the neutrophils on the x-axis in the direction of the chemoattractant gradient, we analyzed these parameters. The final position of neutrophils in presence of CCSP was significantly delayed in the direction of the IL8 gradient ($p = 0.028$) in same extents than CXCR1/2 inhibitors (figure 3b) but traveled less distance ($p < 0.0001$) (Figure 3c).

Direct CCSP-IL8 interaction

Immunoprecipitation of rhCCSP and rhIL8 with anti-IL8 antibody followed by western blotting with IL8 and CCSP antibodies indicated that CCSP co-immunoprecipitated with IL8, suggesting that CCSP may interact with IL8 directly (Figure 4 (a-b)).

IL8 concentrations were recovered even when incubated for 1h with CCSP before the assay.

Discussion

Pharmacological management of COPD is probably the greatest challenge for the next ten years in respiratory medicine because it is entangled with complexities of management of cigarette smoke addiction. Reducing the exacerbation rate is a mandatory step in the development of new drugs while accelerated lung function decline is an inconstant feature currently unreachable. Paradigms changed during the last decade and COPD is mostly understood as a disease hallmarked by a progressive bronchiolar obstruction related to sub-epithelial fibrosis and mucus plugging (3). The role played by airway inflammation is unclear at steady state but the responsibility of neutrophilic bursts associated with exacerbation episodes are established culprits of irreversible “step-down shape” decline (33). The role played by the only “bronchiolar-specific” epithelial cell type, the Club cell, is emerging as a potential regulator of these pathogenic features of COPD (14, 34, 35). We and others could establish their role at the interface between structural alterations and inflammation that could be affected by the smoking status. In particular, serum CCSP levels are decreased in COPD and restoring normal values decreased CSE induced-IL8 and LPS induced-MUC5AC (14, 27). Indeed, while rhCCSP appears ready to be tested in humans, major gaps in the understanding of its mechanism of action should be filled. Herein, we could establish – but these are more confirmatory findings when considering our previous works (14) and existing literature (15, 35), that CCSP strongly inhibited this COPD-associated exaggerated airway neutrophilia at steady state and moreover when stimulated by cigarette smoke extract. Different approaches were used to assess the role of CCSP on neutrophils in animals. In an equine model, incubating neutrophils with rhCCSP significantly reduced their respiratory oxidative burst and increased their phagocytic activity (26). Furthermore, neutrophil counts were increased in the bronchoalveolar lavage of CCSP^{-/-} mice exposed to cigarette smoke for 6 months (15). These

data support the hypothesis that rhCCSP could play a therapeutic role in the regulation of the neutrophilic pattern of inflammation. In our model, we studied airway neutrophilia by a two steps procedure. We first reproduced COPD airway epithelium at the air liquid interface from patients perfectly characterized and by sampling their airways. This model offers advantages of keeping important features of the disease (30). The next step consisted in assessing neutrophil chemotaxis in dedicated Dunn Chambers using IL8 and fMLP as controls, and ALI-epithelium supernatants gathered from these COPD patients, smokers and controls. These chemotactic chambers offer important advantages in this model (e.g. compared to Boyden chamber) as they are unaffected by gravity. Sapey et al. firstly used this model to demonstrate that neutrophil chemotactic responses were different in COPD compared to healthy subjects (36). More innovative, we aimed to assess sites of action of CCSP. We supplemented ALI-airway epithelia with exogenous CCSP at physiological concentration for 24hrs, concomitant to cigarette smoke exposure, to explore whether CCSP could act in an epithelial paracrine fashion. Although these experiments successfully reduced the neutrophilic chemotaxis induced by the epithelium, in a similar range to NF-kB or PLA2 inhibitors, we failed to definitely demonstrate precisely the intracellular signaling pathway involved. Western blot analysis of changes in NF-kB p65 subunits concentrations induced by CCSP have been impossible to achieve because ALI-cultures obtained from patients provided material of satisfactory translational relevance but in limited quantity. NF-kB inhibition was suggested as a possible CCSP target by Laucho-Contreras (15) whereas Tokita (27) alternatively mentioned ERK1/2. CCSP is also known as a specific PLA2 inhibitor but this is highly controversial in the literature (15, 21). We could confirm that cPLA2 and iPLA2 were most important PLA2-superfamily members expressed in our ALI epithelia. The specific inhibition of these two enzymes

mimicked the anti-chemotactic effect provided by CCSP, but we acknowledge these are only parallel observations. This debate is then still open.

The striking CCSP property identified very early is the presence of a hydrophobic pocket devoted to bind to airway pollutants (18, 37). We then tested whether CCSP could also act through a direct binding to airway pollutants or to cytokines released in the airway lumen. Vasanthakumar et al. already demonstrated *in vitro* that CCSP inhibited chemotaxis of neutrophils in a fMLP gradient (25). Here, we could confirm these findings as CCSP limited fMLP-induced neutrophil chemotaxis. We hypothesized that CCSP could also trap IL8 and we could establish for the first time that CCSP directly binds to IL8. Whether these new CCSP-IL8 complexes are biologically active or not is difficult to address. Cross-reactivity ELISA assays revealed no interferences but sites of epitope recognitions might be independent of biological activities. IL8- and fMLP-induced neutrophilic chemotaxis were inhibited by CCSP but in different ways. While CCSP significantly reduced all subtle parameters assessing chemotaxis induced by fMLP, it seemed that CCSP-IL8 kept a small but residual chemotactic property. Dose-effect assays will possibly address this issue and it is still unclear whether this direct CCSP-IL8 binding is definitely biologically inhibitory. Interestingly, blocking CXCR1/2 reproduced this inhibition. Although CCSP mechanism of action was suspectedly vehiculated by FPR2 and our results are not in contradiction with that, CXCR1 or 2 likely represents another credible target. As LTB4 is another neutrophil chemoattractant found increased in bronchial secretions of COPD patients (8, 9), we assessed its secretion in our ALI epithelia but no signal was recorded.

Cigarette smoke components may also have been trapped by CCSP and we aimed to secure the fact that our recorded paracrine epithelial effect was ascertained independently of

cigarette smoke exposure. Two arguments supported this hypothesis: CCSP supplementation of smokers ALI epithelium really reduced airway neutrophilia irrespective of the presence of smoke, and CCSP alone unaffected neutrophilic mobility.

This large study was long to conduct mostly because of ALI cultures. Surprisingly, the ALI reproduced epithelium of COPD patients involved in the study were not high IL8 producers, as compared to our previous experiences (14) and the literature (27). Heterogeneity of COPD phenotypes may explain this observation. Unfortunately, we could not address whether active smoking status contributes to this heterogeneity. Here we suggest that treatment by exogenous CCSP supplementation could reduce exaggerated neutrophilic chemotaxis. This therapeutic strategy might be suitable to neutrophilic COPD patients or COPD patients still actively smoking or during exacerbation. Blocking circulating neutrophils need to be monitored as a compartmentalization effect may occur.

In conclusion, this study confirms that CCSP prevents airway neutrophilia in humans by an epithelial paracrine effect and a direct neutralization of IL8. A therapeutic strategy that aimed at limiting airway neutrophilia may address the potential infection risks. At the difference of CXCR1/2 blockade that could induced systemic neutropenia, rhCCSP may be more accurate and would lead to a tight regulation.

Acknowledgments: The authors are grateful to Valérie Scheuermann for her technical assistance.

Conflict of Interest:

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

Figure Legend

Figure 1: (a) Representative examples of healthy neutrophil migratory tracks induced by supernatants of ALI-reconstituted airway epithelium derived from a healthy control, a smoker and a patient with COPD. The large red arrow at the right side of each picture represents the chemoattractant signal (30 minutes of phase time-lapse recordings). (b) The XFMI of healthy neutrophils in gradient of fMLP and epithelial supernatants. COPD supernatants attracted neutrophils.

Figure 2: (a) The XFMI of healthy neutrophils in gradient of smokers ALI supernatants supplemented with CCSP and CSE with or without CCSP. CCSP inhibited neutrophil chemotaxis at baseline and when exposed to CSE. (b) The XFMI of healthy neutrophils in gradient of COPD ALI supernatants supplemented with CCSP and CSE with or without CCSP. CCSP inhibited neutrophil chemotaxis only when exposed to CSE.

Figure 3: (a) The XFMI of healthy neutrophils in gradient of fMLP with or without CCSP and of IL8 with or without CCSP and CXCR1/1 inhibitors. CCSP inhibited the chemotaxis of neutrophils stimulated by fMLP, but no difference was observed on IL8-induced neutrophil chemotaxis. (b) The X endpoints of healthy neutrophils in gradient of fMLP with or without CCSP and of IL8 with or without CCSP and CXCR1/1 inhibitors. CCSP inhibited the movement of the neutrophils in the direction of the gradient induced by fMLP, as well as IL8, in same extents than CXCR1/2 inhibitors. (c) The distance traveled by healthy neutrophils in gradient of fMLP with or without CCSP and of IL8 with or without CCSP and CXCR1/1 inhibitors. CCSP inhibited the movement of the neutrophils induced by fMLP and IL8.

Figure 4: (a) ELISA cross reactivity test between IL8 and CCSP. They do not seemed to interact. (b) Western Blot of IL8 immunoprecipitation detected with CCSP antibodies. Lane 1:

negative control. Lane 2: positive controls (rhIL8+rhCCSP). Lane 3: rhIL8 immunoprecipitated detected with CCSP antibodies. *In vitro*, CCSP interacted with IL8. (c) Graph of CCSP immunostaining intensity of the IL8 immunoprecipitation.

Table 1. Subject baseline characteristics.

	Healthy controls	Smokers	COPD	p- value
n	4	10	13	NA
Age, years (mean±SEM)	48±9.9	59±4.7	61±2.0	0.405
Gender [n(%male)]	2 (50)	7 (70)	8 (62)	0.774
Smoking history, pack years (mean±SEM)	0.75±0.7	34±5.6	46±6.6	0.005
Smoking status [n(%weaned>1 year)]	4 (100)	5 (50)	7 (54)	0.196
FEV1, % th (mean±SEM)	87.8±3.7	109±5.3	50.8±7.2	<0.0001
FEV1/FVC (mean±SEM)	82.3±4.3	82.0±3.0	53.4±5.8	0.0015

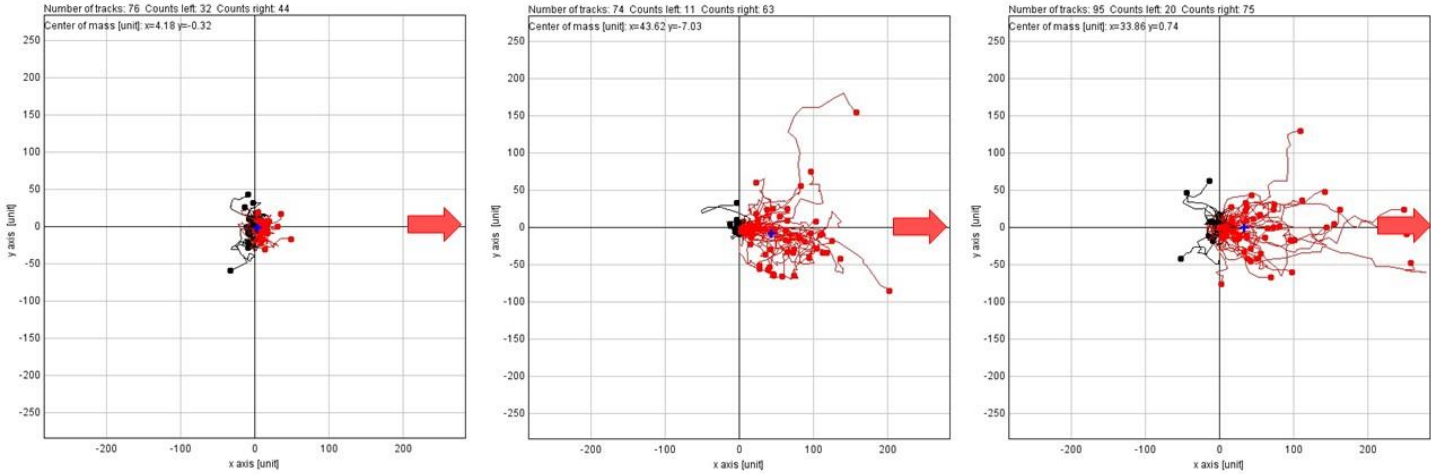
Definition of abbreviations: FEV1, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity

Table 2. List of mRNA primers

mRNA	Forward	Reverse
iPLA2	GCAATGCTCGGTGCAACA	ACACCCCTTCTGAGAGAACTTCA
PLA2IIA	AAGGAAGCCGCACTCAGTTA	TTGCACAGGTGATTCTGCTC
cPLA2	GAAGTTTGCTCATGCCAGACCT	TTCATAGAGCGCCTTCATCACACC
PLA2X	CCATCGCCTATATGAAATATGG	TAGGAACTGGGGGTAGAAGAG
PLA2V	GACCGGAAGCTCGTCTACTG	TCTCAGGAACCAGGCAGAGT

Figure 1

(a)



Control supernatants

Smoker supernatants

COPD supernatants

(b)

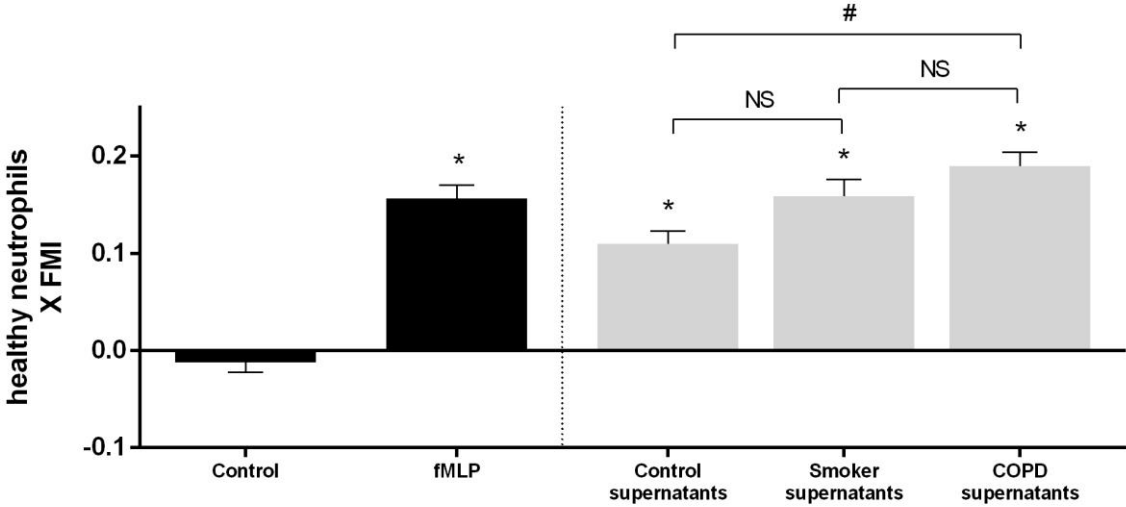
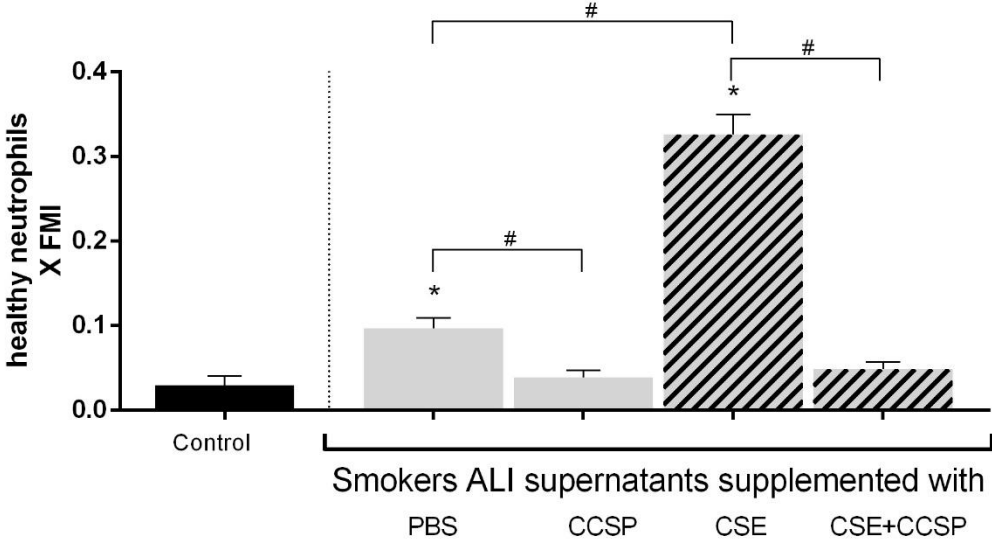


Figure 2

a)



b)

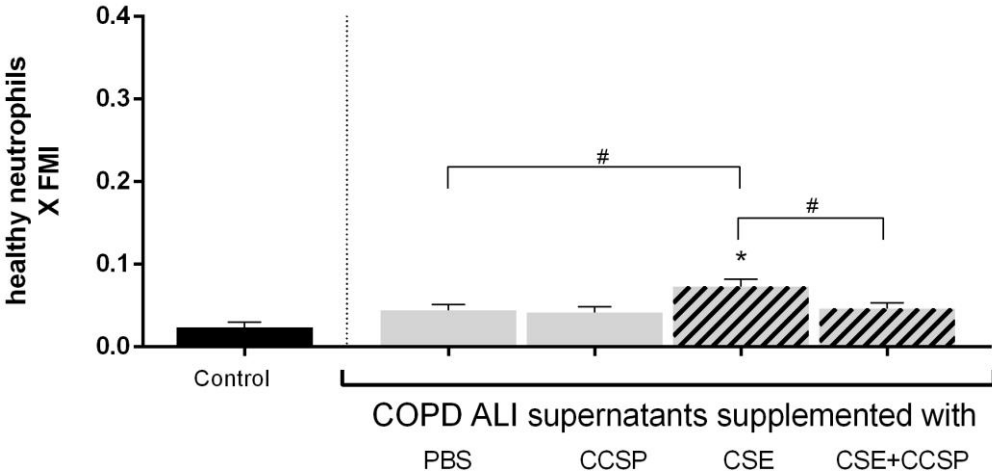
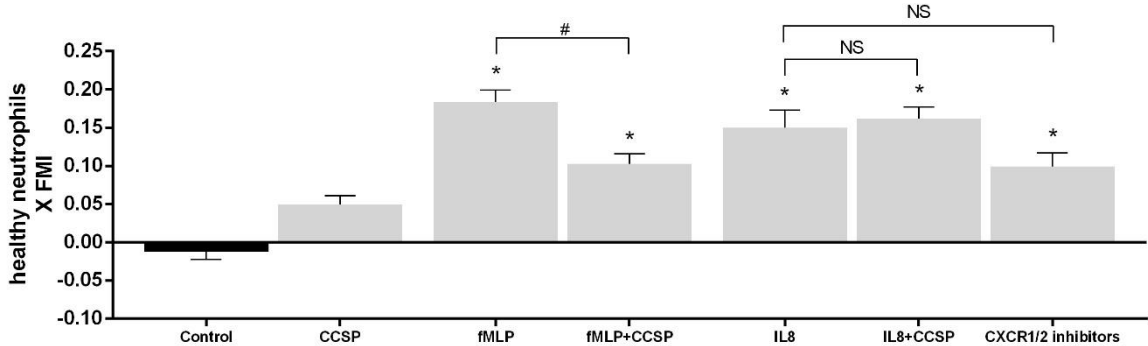
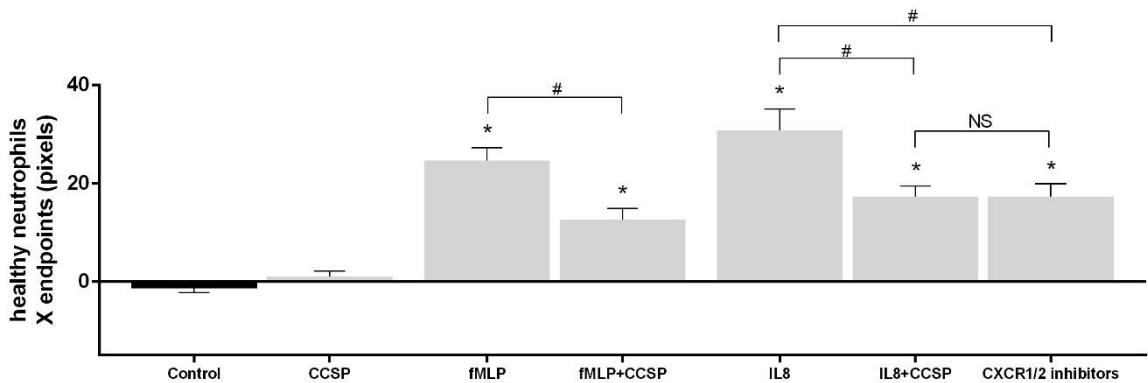


Figure 3

(a)



(b)



(c)

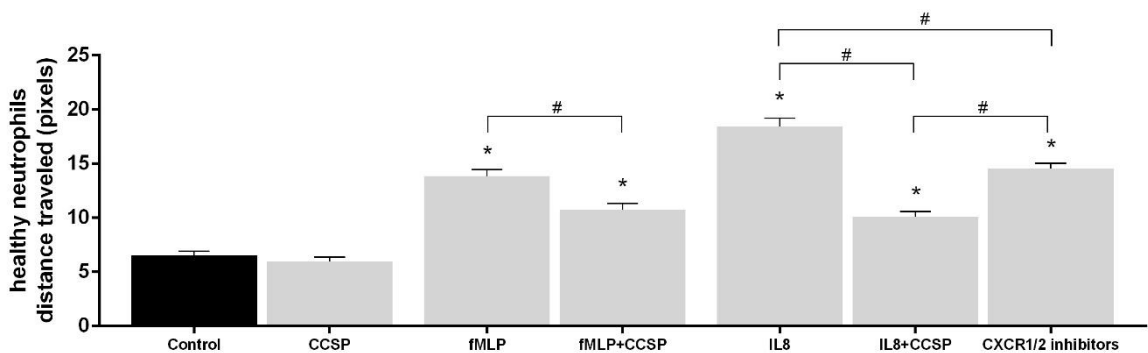
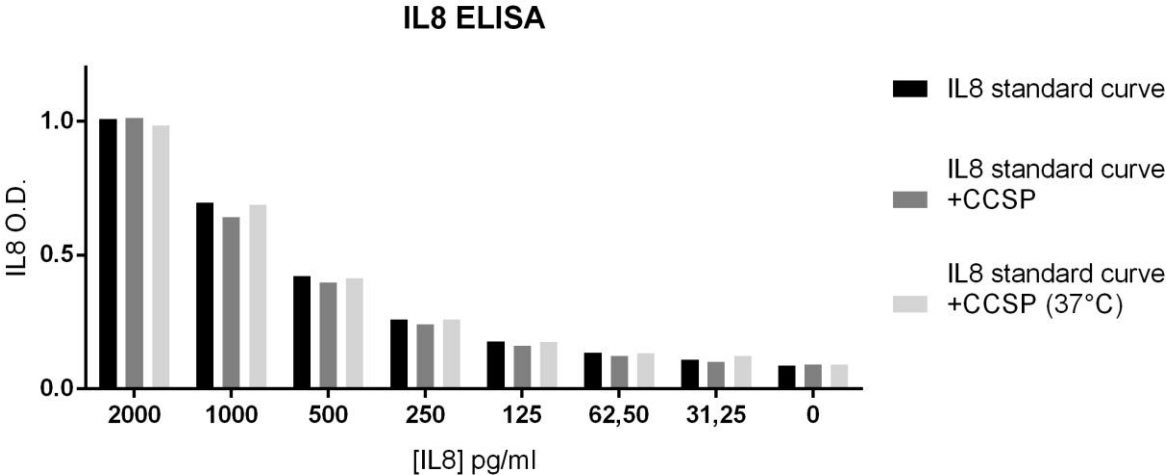
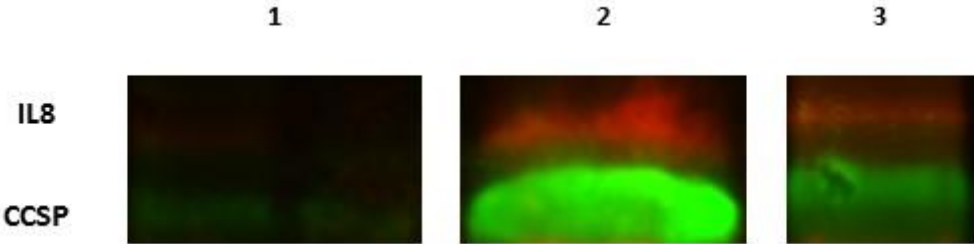


Figure 4

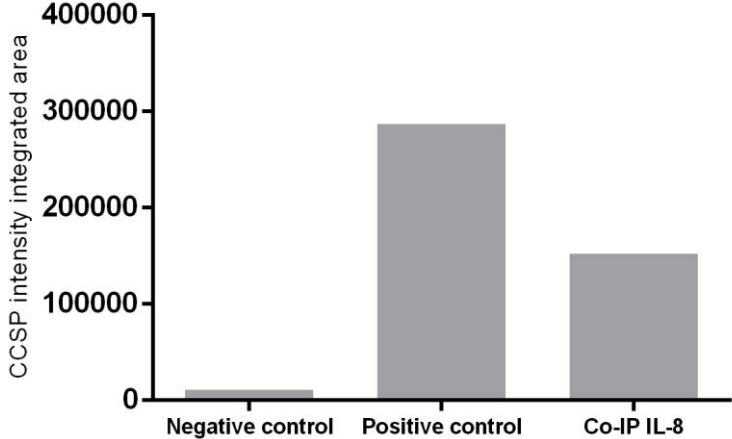
(a)



(b)



(c)



References

1. Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996;51:267-71.
2. Donaldson GC, Seemungal TAR, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TMA, Hurst JR, Maccallum PK, Wedzicha JA. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005;128:1995-2004.
3. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2004;350:2645-53.
4. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, Djukanovic R. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004;59:837-42.
5. Pilette C, Colinet B, Kiss R, André S, Kaltner H, Gabius H, Delos M, Vaerman J, Decramer M, Sibille Y. Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *The European respiratory journal* 2007;29:914-22.
6. Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *The European respiratory journal* 2001;17:1112-9.
7. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet (London, England)* 1997;349:490-5.
8. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest* 2003;123:1240-7.
9. Profita M, Di Giorgi R, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy* 2005;60:1361-9.
10. Mócsai A, Walzog B, Lowell CA. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovascular research* 2015;107:373-85.
11. Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology* 2006;534:1-11.
12. Wang S, Rosenberger CL, Bao Y, Stark JM, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2003;171:1051-60.
13. Pilon AL. Rationale for the development of recombinant human CC10 as a therapeutic for inflammatory and fibrotic disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:280-99.
14. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, Chanez P, Bourdin A. Supplementing defect in Club Cell Secretory Protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* 2014;doi:10.1378/chest.14-1174.

15. Laucho-Contreras ME, Polverino F, Gupta K, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, Divo M, Ashfaq N, Petersen H, Stripp B, Pilon AL, Tesfaigzi Y, Celli BR, Owen CA. Protective role for club cell secretory protein-16 (CC16) in the development of COPD. *The European respiratory journal* 2015;45:1544-56.
16. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, de Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001;163:185-94.
17. Dunkel R, Vriend G, Beato M, Suske G. Progesterone binding to uteroglobin: two alternative orientations of the ligand. *Protein engineering* 1995;8:71-9.
18. Stripp BR, Lund J, Mango GW, Doyen KC, Johnston C, Hultenby K, Nord M, Whitsett JA. Clara cell secretory protein: a determinant of PCB bioaccumulation in mammals. *The American journal of physiology* 1996;271:L656-64.
19. de Haro MSL, Martínez MP, García C, Nieto A. Binding of retinoids to uteroglobin. *FEBS letters* 1994;349:249-51.
20. Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, Mukherjee AB. Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:20343-51.
21. Yoshikawa S, Miyahara T, Reynolds SD, Stripp BR, Anghelescu M, Eyal FG, Parker JC. Clara cell secretory protein and phospholipase A2 activity modulate acute ventilator-induced lung injury in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2005;98:1264-71.
22. Wang P, Li Y, Shao Q, Zhou W, Wang K. Targeting human secretory phospholipase A2 with designed peptide inhibitors for inflammatory therapy. *Journal of drug targeting* 2014;1-7. doi:10.3109/1061186X.2014.959019.
23. Long X, Hu S, Wang N, Zhen H, Cui Y, Liu Z. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF- κ B Activity in Airway Epithelial Cells. In: Ryffel B, translator. *PLoS ONE* 2012;7:e35960.
24. Yoon JM, Lim J, Yoo C, Lee C, Bang Y, Han SK, Shim Y, Kim YW. Adenovirus-uteroglobin suppresses COX-2 expression via inhibition of NF-kappaB activity in lung cancer cells. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2005;48:201-9.
25. Vasanthakumar G, Manjunath R, Mukherjee AB, Warabi H, Schiffmann E. Inhibition of phagocyte chemotaxis by uteroglobin, an inhibitor of blastocyst rejection. *Biochemical pharmacology* 1988;37:389-94.
26. Katavolos P, Ackerley CA, Clark ME, Bienzle D. Clara cell secretory protein increases phagocytic and decreases oxidative activity of neutrophils. *Veterinary immunology and immunopathology* 2011;139:1-9.
27. Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzaki H, Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *The European respiratory journal* 2014;44:1002-10.
28. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Miller BE, Coxson HO, Tal-Singer R. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 2008;63:1058-1063.

29. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Shibuya Y, Morita Y, Hirasawa M, Okutani R, Kawai T, Abe S. Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *The European respiratory journal* 1997;10:1108-14.
30. Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012;129:1259-1266.e1.
31. Roberts RL, Gallin JI. Rapid method for isolation of normal human peripheral blood eosinophils on discontinuous Percoll gradients and comparison with neutrophils. *Blood* 1985;65:433-40.
32. Chaubey S, Ridley AJ, Wells CM. Using the Dunn chemotaxis chamber to analyze primary cell migration in real time. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2011;769:41-51.
33. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002;121:151S-155S.
34. Laicho-Contreras ME, Polverino F, Tesfaigzi Y, Celli BR, Owen CA. Club Cell Protein 16 (CC16) Augmentation: A Potential Disease-modifying Approach for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Expert opinion on therapeutic targets* 2016;doi:10.1517/14728222.2016.1139084.
35. Knabe L, Fort A, Chanez P, Bourdin A. Club cells and CC16: another “smoking gun?” (With potential bullets against COPD). *The European respiratory journal* 2015;45:1519-20.
36. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, Insall RH, Stockley RA. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011;183:1176-86.
37. Mukherjee AB, Zhang Z, Chilton BS. Uteroglobulin: A Steroid-Inducible Immunomodulatory Protein That Founded the Superfamily. *Endocrine Reviews* 2007;28:707-725.

How does CCSP counterbalance airway epithelial-driven neutrophilic chemotaxis due to cigarette smoke?

Lucie Knabe^{1,2}, Aurélie Petit², Delphine Gras³, Nicolas Molinari⁵, Pascal Chanez^{3,4}, Isabelle Vachier², Jean-Philippe Berthet², Arnaud Bourdin^{1,2}.

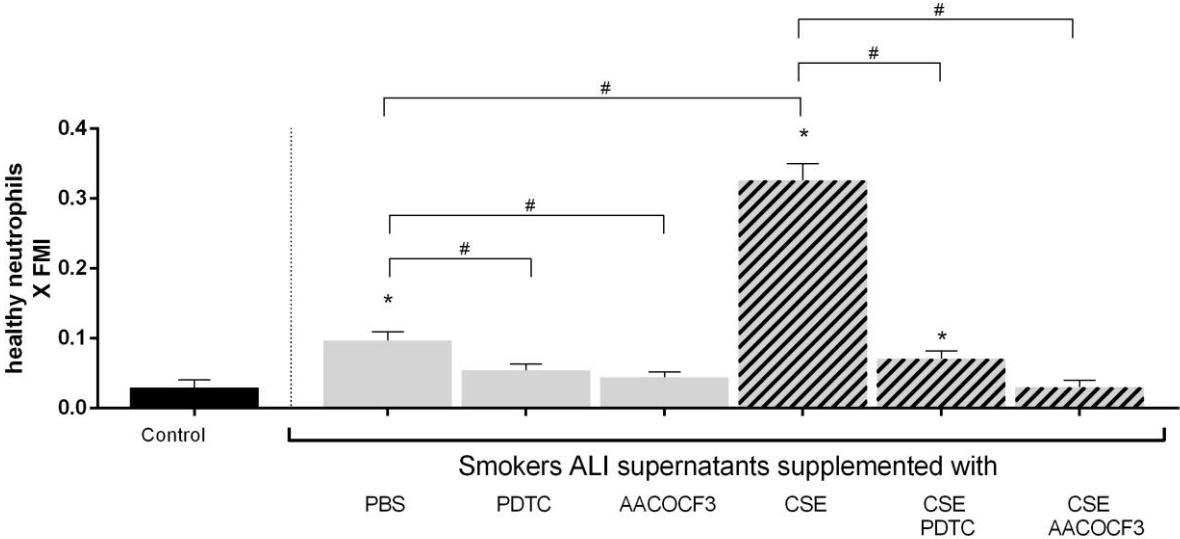
1. PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214.
2. Department of respiratory diseases, CHRU Montpellier, France.
3. CNRS UMR 7333, INSERM U1067, Aix Marseille University, France.
4. AP-HM, Department of respiratory diseases, Aix Marseille University, France.
5. IMAG U5149, Department of Medical Information, CHRU Montpellier, France.

Figure Legend

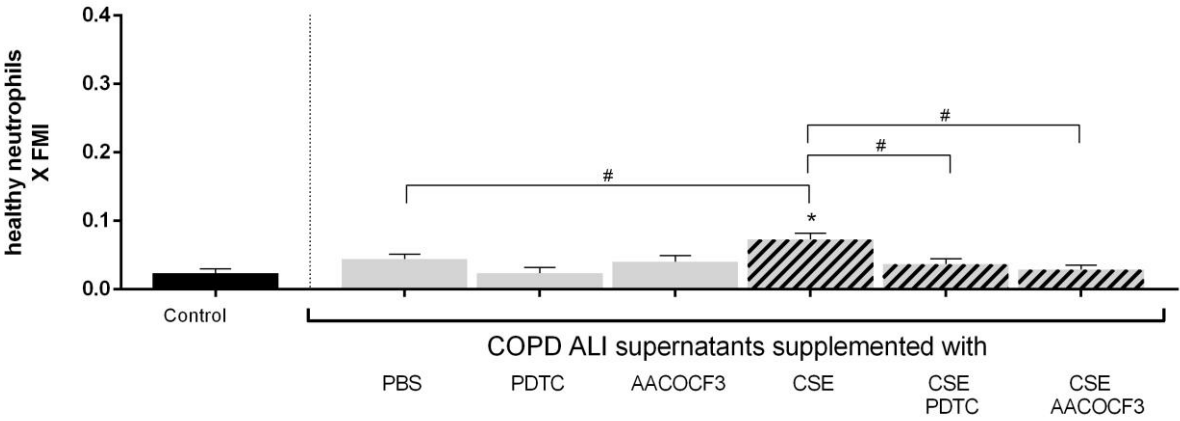
Figure E1. (a) The XFMI of healthy neutrophils in gradient of smokers ALI supernatants supplemented with PDTC or AACOCF3 in presence or absence of CSE. PDTC and AACOCF3 inhibited neutrophil chemotaxis at baseline and when exposed to CSE. (b) The XFMI of healthy neutrophils in gradient of COPD ALI supernatants supplemented with PDTC or AACOCF3 in presence or absence of CSE. PDTC and AACOCF3 inhibited neutrophil chemotaxis only when exposed to CSE.

Figure E1

(a)



(b)



7. Discussion de l'article 5

Dans notre étude, nous confirmons que CCSP inhibe le chimiotactisme des neutrophiles induit par le fMLP. Vasanthakumar et al. avaient déjà fait cette démonstration *in vitro*. Aussi, ils avaient constaté qu'il n'y avait pas de compétition entre le fMLP et CCSP pour le récepteur FPR2 de fMLP présent sur les neutrophiles mais que CCSP semblait internaliser plutôt le fMLP, empêchant ainsi la substance chimioattractante de se fixer sur son récepteur au niveau des neutrophiles. D'autres études ont voulu établir une relation entre CCSP et le récepteur FPR2 sur le principe de l'inhibition du chimiotactisme des neutrophiles par la présence de CCSP (222) mais certains montrent au niveau des cellules dendritiques que CCSP ne semble pas agir sur le récepteur FPR2 (223). Cependant, Ray et al. démontrent que CCSP se lie avec une grande affinité au récepteur FPR2 et suggèrent que la protéine est un antagoniste de ce récepteur (191). Les études étant quelques peu controversées, le récepteur de la protéine CCSP reste inconnu. Notre étude ne nous permet pas de conclure quant à la liaison physique potentielle de CCSP sur le FPR2 ni CCSP à fMLP, mais nous reproduisons l'inhibition du chimiotactisme des neutrophiles induit par le fMLP, dans un système différent de ce qui a été utilisé auparavant. En effet, nous avons utilisé des chambres de Dunn, nous permettant de nous affranchir de la gravité. Les neutrophiles sont attirés par un gradient de concentration créé sur l'axe des x. Or, dans les chambres de Boyden, système fréquemment utilisé pour étudier le chimiotactisme, le gradient de concentration est dans l'axe des y. Nous avons également constaté que CCSP inhibait le chimiotactisme des neutrophiles induit par l'IL8. Nous pouvons formuler l'hypothèse que CCSP serait en compétition avec la cytokine pour la fixation sur les récepteurs à l'IL8 au niveau de la surface des neutrophiles, mais notre étude ici ne nous permet pas de conclure. De plus, CCSP inhibe de façon plus importante le déplacement des neutrophiles par rapport aux inhibiteurs CXCR1/2 testés. Enfin, nous démontrons que CCSP co-immunoprécipite avec l'IL8 nous permettant d'introduire l'idée que la protéine CCSP interagirait directement avec l'IL8. Il préviendrait ainsi son effet pro-inflammatoire en l'empêchant de se lier à ses récepteurs spécifiques au niveau des neutrophiles. Ceci est un argument supplémentaire pour affirmer que la protéine CCSP a bien un rôle anti-inflammatoire.

8. Conclusion de l'article 5

Pour la première fois, des échantillons provenant d'épithélia de patients BPCO ont été le support pour l'étude du chimiotactisme de neutrophiles sains et l'effet de CCSP sur ces derniers ont été étudiés dans le contexte de la pathologie. Il s'avère que les épithélia de BPCO produisent des substances chimioattractantes. Aussi, l'effet de CCSP sur l'inhibition du chimiotactisme des neutrophiles a été confirmé. L'effet peut être médié via l'épithélium potentiellement par l'interaction avec la voie NF- κ B ou la voie PLA2 ; ou l'action inhibitrice de CCSP peut s'effectuer directement sur le neutrophiles, soit par fixation sur les récepteurs des substances chimioattractantes présents à la surface des neutrophiles soit par interactions avec ces substances chimioattractantes, les empêchant ainsi de se fixer sur leur récepteur. Nous avons d'ailleurs démontré *in vitro* une liaison entre CCSP et l'IL8.

Nous suggérons qu'une restauration des taux endogènes de la protéine CCSP chez les patients souffrant de BPCO pourrait aider à gérer l'inflammation neutrophilique exagérée retrouvée chez ces patients.

9. Résumé de l'article 6

Finalement, dans ce dernier article, nous avons voulu déterminer à l'échelle de la protéine la signature épithéliale du tabac et du traitement par CCSP vis-à-vis de notre modèle inflammatoire (c'est-à-dire l'épithélium bronchique stimulé par le CSE).

Pour cela, nous avons exposé à différentes concentrations de CSE pendant 24h des NCI-H292, cellules épithéliales bronchiques cancéreuses. Ensuite, nous avons traité les cellules exposées au CSE avec la protéine CCSP. Nous avons dosé la cytokine pro-inflammatoire IL8 et la protéine reflet de l'hypersécrétion bronchique de mucus MUC5AC dans les surnageants épithéliaux par Dot Blot en utilisant des anticorps primaires anti-IL8 et anti-MUC5AC, puis des anticorps secondaires fluorescents. Les surnageants cellulaires de ces conditions réalisées en triplicata ont été analysés par la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS). Enfin, l'analyse des résultats statistiques a été effectuée par le logiciel Ingenuity afin d'identifier des réseaux de protéines d'intérêt en fonction des différentes conditions.

Nous avons montré que :

- 1) En présence de CSE, les cellules épithéliales sécrètent de façon dose-dépendante de l'IL8 et du MUC5AC (Figure 1a et 1b).
- 2) La signature épithéliale spécifique du CSE est composée de 2 protéines sur-exprimées et de 32 protéines sous-exprimées (Figure 6).
- 3) La signature épithéliale spécifique de CCSP est composée de 105 protéines sur-exprimées et de 8 protéines sous-exprimées (Figure 6).
- 4) Selon l'analyse en réseaux des protéines affectées par le CSE, les protéines de la matrice extracellulaire ainsi que celles impliquées dans la machinerie du protéasome sont sous-exprimées (Figure 3).
- 5) A l'inverse, dans la condition CSE traitée par la protéine CCSP, les réseaux indiquent que la plupart de ces mêmes protéines se retrouvent restaurées (Figure 4a et 4b).

10. Article 6 : « Proteomic signature of CCSP treatment in CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells. »

Article en cours de préparation, pour soumission *Respirology*

Proteomic signature of CCSP treatment in CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells

Lucie Knabe^{1,2}, Said Assou³, Aurélie Fort-Petit², Nicolas Molinari⁴, Isabelle Vachier²,
Arnaud Bourdin^{1,2}

¹PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214.

²Department of Respiratory Diseases, Montpellier University Hospital, Montpellier, France.

³University of Montpellier, UFR de Médecine ; INSERM U1183; Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy, CHU Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, France.

⁴IMAG U5149, Department of Medical Information, Montpellier University Hospital Montpellier, France.

Corresponding author: Professor Arnaud Bourdin, Department of Respiratory Diseases. Hôpital Arnaud de Villeneuve CHU Montpellier - France.

Mail : a-bourdin@chu-montpellier.fr. Fax: +33 4 67 63 36 45.

Running title: Proteomic signature of CCSP in bronchial cells

Keywords: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Club Cell Secretory Protein, Proteomics, bronchial epithelial cells supernatants, inflammation.

Abstract (252 words)

Background and objective: CCSP is an endogenous pneumoprotein with suspected paracrine effects potentially involved in maintaining airway homeostasis. We aimed at assessing overall CCSP-induced paracrine effects in a NCI-H292 model of CSE-mediated injury.

Methods: NCI-H292 were exposed to CSE for 24hrs at different concentration with or without human recombinant CCSP at a concentration likely similar to the airway lumen. Proteomic profiles of these different conditions were acquired by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Protein expression profiles were compared and integrated into an Ingenuity Pathways Analysis to identify differentially affected networks.

Results: NCI-H292 showed consistency for assessing CSE-mediated injury as CSE-induced dose-dependent releases of IL8 and MUC5AC. A concentration of CSE at 50% was selected for subsequent assays because of significant IL-8 induction without excess of mortality. LC MS/MS identified an epithelial CSE signature with 2 and 32 proteins significantly up and downregulated respectively. A specific CCSP signature could also be identified with up and downregulation of 105 and 8 proteins. The specific CSE signature was reversed by CCSP mostly through the restoration of decreased proteasome protein members (PSMA6, PSMB4, PSMB6) and compounds of the extracellular matrix (tubulin family members TUBB3, TUBB4A, keratins such as Krt19, Krt3, Krt7 and others and laminins LAMB3, LAMA3 and LAMA5) essential for cell maintenance.

Conclusions: Unbiased exhaustive analysis of protein profile changes associated with CSE exposure in one hand and hypothetical CCSP-related protection of airway epithelial cells on the other hand identifies unexpected cellular pathways of cell susceptibility to CSE prevented by epithelial paracrine effects of CCSP.

Introduction

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a worldwide public health problem featured by high morbidity and mortality. It is promoted by environmental exposure, with smoking being the primary risk factor.

Club Cell Secretory Protein (CCSP, CC10, international nomenclature SCGB1A1) is one of the most abundant protein secreted by the respiratory epithelium (making up to 5% of the total protein recovered from a bronchoalveolar lavage). It is secreted by non-ciliated epithelial club cells, mainly bronchiolar club cells. CCSP may play a protective role against pulmonary inflammatory response. Serum CCSP level has been shown to be a predictive biomarker of accelerated lung function decline in the ECLIPSE study but also to predict lung function and development of COPD across the lifespan. Noteworthy, serum CCSP levels were reduced in COPD patients and moreover correlated to smoking status.

Proteomic approaches have been used to describe the proteomic profile in many chronic lung diseases, such as cystic fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), sarcoidosis, asthma, and others (1-4). Proteomics was recently introduced for studies in COPD; BAL, serum/plasma, sputum and lung tissue from COPD patients have been subjected to proteomic analysis in an attempt to identify disease biomarkers (5, 6). The regulation profile of the CSE-stimulated bronchial epithelium secretome in response to CCSP treatment may yield vital evidence to understand the signaling pathway of this protein.

Methods

Human bronchial epithelial cell culture

NCI-H292 cells, a cell line from a human pulmonary mucoepidermoid carcinoma, were purchased from American Type Culture Collection. The cells were cultured in a twelve-well

plate with 6×10^4 cells per well and were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 5% antibiotics, incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. When the cells reached 60% confluence, they were washed with PBS and were serum-starved in presence or absence of cigarette smoke extract (CSE) and CCSP. After a 24h exposure, cell supernatants were collected.

Cigarette smoke extract

CSE was prepared as described previously (7). Briefly, smoke of 2 commercial cigarettes (Marlboro®) was withdrawn into a Pasteur pipette and bubbled for 6 min each cigarette into 30 ml of RPMI 1640 containing 5% antibiotics. CSE was standardized by adjusting pH 7.4 and sterilized through a 0.22µm filter. Various dilutions of this 100% stock solution of CSE were prepared to determine the CSE concentration to be used in the subsequent experiments.

LC-MS/MS acquisition, relative quantification of proteins and data analysis

20 µg of proteins from the supernatants of the NCI-H292 cells were migrated in SDS-PAGE and stained in Coomassie blue. All peptides were analyzed by a LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an EASY-Spray nanoelectrospray ion source (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) and coupled to an Easy nano-LC Proxeon 1000 system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Label-free quantification was performed on raw data with Progenesis-LC software 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K.). After chromatogram alignment, normalization of peptide abundances, and features statistical analyses, peptide identifications were performed with an in house Mascot search server (Matrix Science, Boston, MA; version 2.4.2). MS/MS data were searched against the SwissProt database with the taxonomy *Homo sapiens*. Peptides with an ion score less than 15 were rejected for identification and quantification. A resolution conflict for identification of peptides was performed manually. Quantified proteins with normalized abundance variations with an anova p-value under 0.05 were considered. For proteomic data analysis, a first selection was based on

the protein score detection (present in at least 2 samples of each group). Then, we compared the protein expression profiles of CSE, CCSP and CSE-CCSP to CTR respectively with a 2-fold change cut-off. The Ingenuity Pathways Analysis (IPA) system (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) was used to identify networks related to the proteins that were differentially expressed between samples. Box-and-whisker plots depicted the comparisons of the expression levels of candidate proteins carried out using SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) software.

Measurement of Interleukin (IL)-8 and Mucin (MUC)5AC concentrations

Determinations of the relative values of IL-8 and MUC5AC in supernatants were assessed by Dot Blot assay. 10 μ l of cell supernatants were spotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with blocking odyssey buffer (Licor, France) for 1h at room temperature. They were incubated with primary antibodies (1:1000 IL-8; 1:1000 MUC5AC) for 2h and then with secondary fluorescent antibodies for 45min. Positive signals were detected using odyssey imager. The intensities of the spots were measured with Dot Blot analyzer, an Image J software.

RNA isolation and RTqPCR

Total RNA was isolated using All prepDNA/RNA/protein Mini kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's protocol. 0.4 μ g of RNA was reverse transcribed with verso cDNA synthesis kit (Thermofischer scientific, United States) in a final volume of 20 μ l. cDNA were amplified using a Lightcycler DNA master SYBR green (Roche applied science, United States). Primers are listed on Table 1 (supplementary data). The comparative Ct method for relative quantification of gene expression was used ($2^{\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct$ represents the difference in threshold cycle between the target and control gene). Data were normalized to GAPDH mRNA levels.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Paired comparisons were made using One-Way ANOVA tests.

Data were considered statistically significant at p-value<0.05. All graphical data and statistical analyses were generated with GraphPAD Prism software (Version 6.0).

Results

NCI-H292 is a reliable model of inflammation

We showed that CSE induced IL8 in a dose dependent manner, significantly from 50% of CSE (p-value=0.021) (Figure 1a). The same effect is observed on MUC5AC secretion, with significance from 80% of CSE (p-value = 0.001) (Figure 1b).

With IL8 and MUC5AC upregulated, a pro-inflammatory cytokine and a protein reflecting the bronchial hypersecretion respectively, NCI-H292 seems to be a reliable model for studying CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells.

Proteins expression profiles of CCSP-treatment in CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells

In order to gain insight into the molecular basis of tobacco impact on bronchial epithelial cells, we compared the proteome profile of CSE samples to control. The analysis of the proteome data revealed a characteristic CSE-molecular signature (Table 1). The expression patterns of the proteins that best represent this signature are illustrated in the box-plots (Figure 2). In the CSE samples, under-expression was observed for cell-adhesion proteins such as nidogen-2 (NID2), fibronectin (FN1), numerous keratins (KRT19, KRT3, KRT7, KRT4, KRT8, KRT15,

KRT6A, KRT5, KRT13, KRT71, KRT6B, KRT16, KRT17), laminins (LAMB3, LAMA3, LAMA5), tubulins (TUBB3, TUBB4A) and proteasome subunits (PSMA6, PSMB4, PSMB6) suggesting destruction of extra-cellular matrix and deregulation in proteins involved in proteasome machinery after CSE injury (Figure 3). We then compared the proteome profile of the bronchial epithelial cells treated by CCSP (CCSP-CSE) to CSE samples. Our analysis revealed on over-expression of tubulins (TUBB3, TUBB4A, TUBB4B), keratins (KRT3, KRT7, KRT4, KRT8, KRT6A), laminin (LAMA3) and that a highly proportion of up-regulated proteins were involved in the protein proteasome canonical pathway such as (PSMA6, PSMB4, PSMB6), suggesting a restoration by CCSP of extra-cellular matrix and proteasome machinery in CSE-induced inflammation in bronchial epithelial cells (Figure 4). The proteins that best represent CSE-molecular and CCSP treatment signature were confirmed by RT-qPCR (Figure 5).

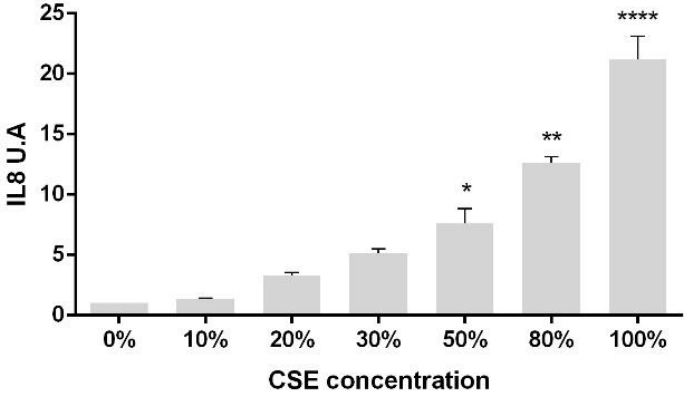
Specific proteome program after CCSP treatment

In an effort to examine which proteins were specific to CCSP treatment, we further investigated differences and similarities in the protein expression patterns of CSE, CCSP and CSE-CCSP samples compared to control. The proteins that were found to be up or down-regulated in CSE condition were compared to those in CCSP and CSE-CCSP using Venn diagrams (Figure 6). We found that 32 proteins were exclusively down-regulated in CSE condition, although only eight proteins were commonly down-regulated between CCSP vs control and CCSP-CSE vs control, indicating possible protection of bronchial epithelial cells by the CCSP treatment. On the other hand, we showed that 105 proteins exclusively up-regulated after CCSP treatment. Among them, proteins related to cytoskeleton, such as (KRT18, ACTN1...) were observed. Conversely, the treatment of cells by CCSP after CSE injury up-regulates exclusively only two proteins, suggesting that the impact of CCSP on the cytoskeleton was thwarted by the tobacco

aggression. Only four proteins were common to both the CSE and CCSP signatures (ACTB, HSP90AB1, HNRNPA2B1, ACTC1) and two proteins were common to both CSE and CSE-CCSP profiles (ALCAM, PTK7). On the other hand, CCSP and CSE-CCSP shared a set of 20 proteins, among which, the key protein, uteroglobin (SCGB1A1) that is produced by club cells and Cofilin-1 (CFL1). Finally, two proteins are exclusively up-regulated in CSE (AFP and ALB) and in CSE-CCSP (HGFR, SRGN) respectively.

Figure 1

a)



b)

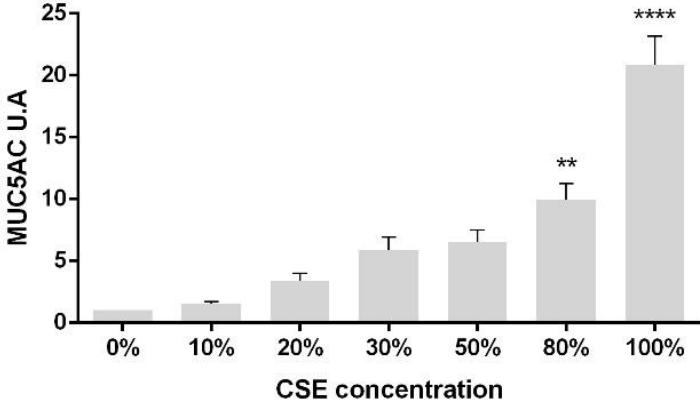


Figure 2

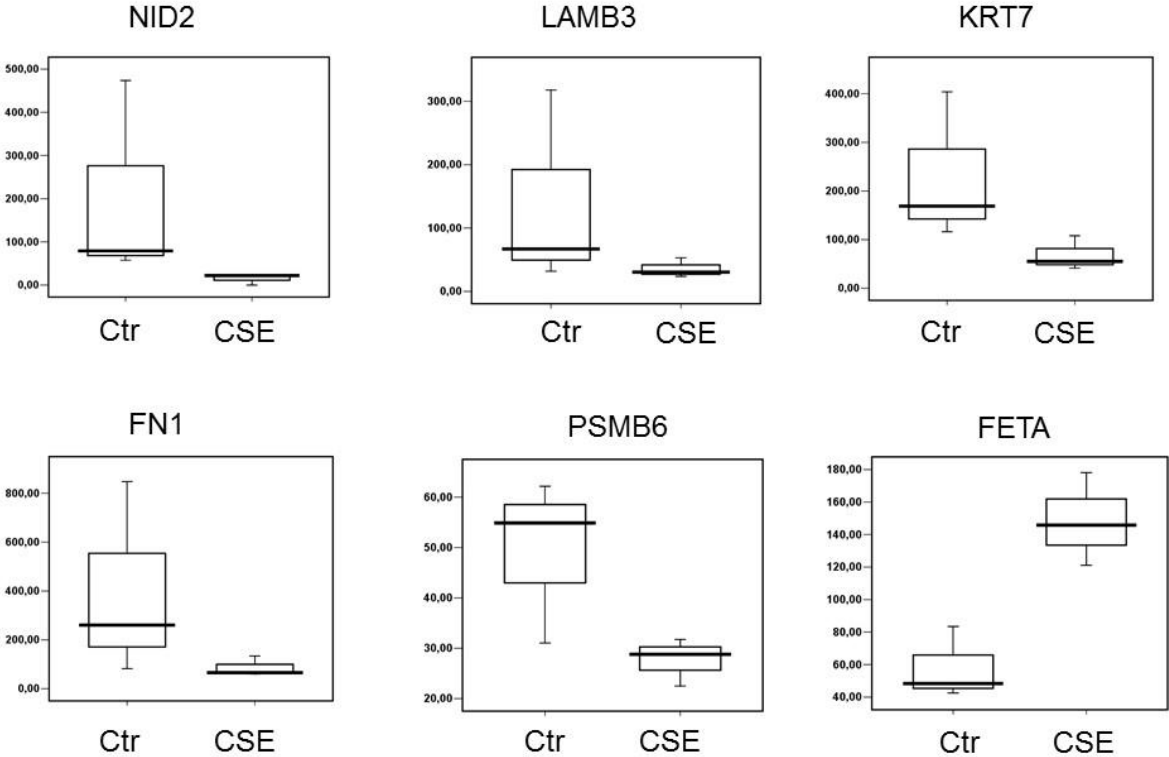


Figure 3

Réseau CSE vs CTR

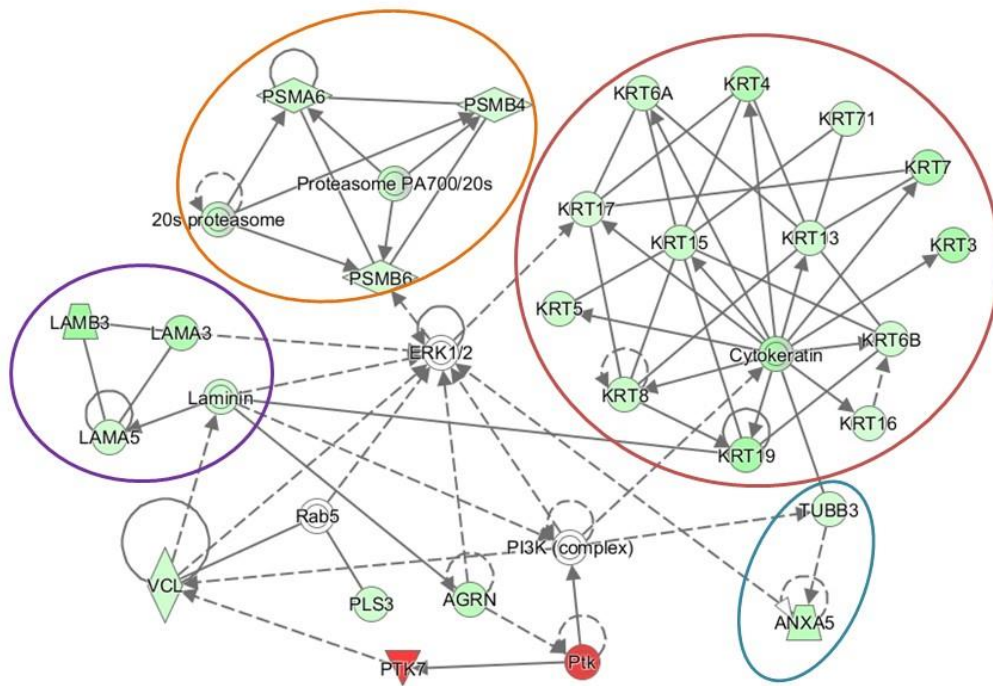


Figure 5

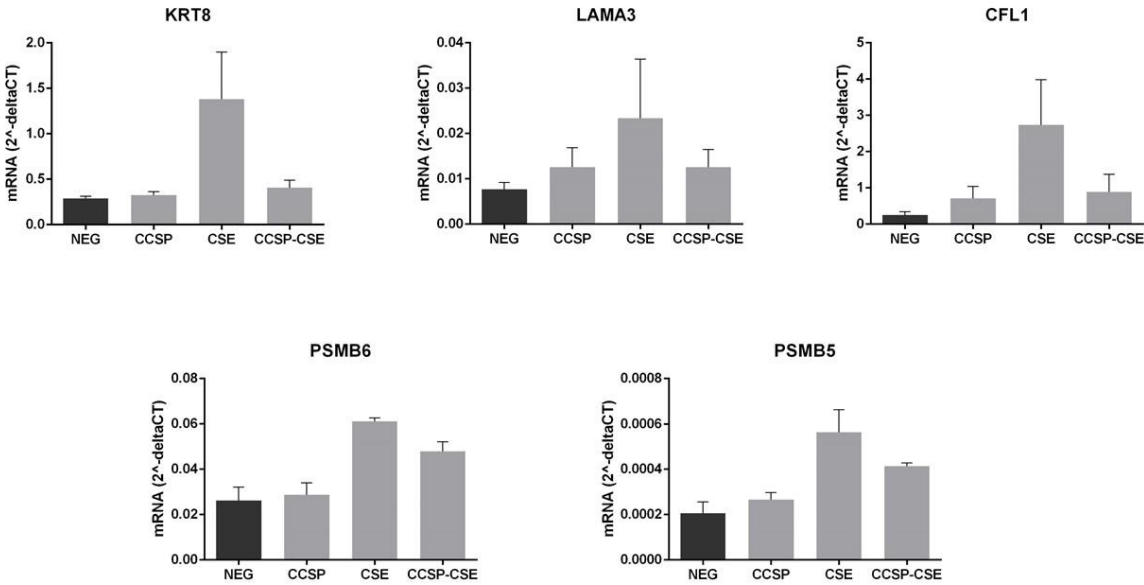
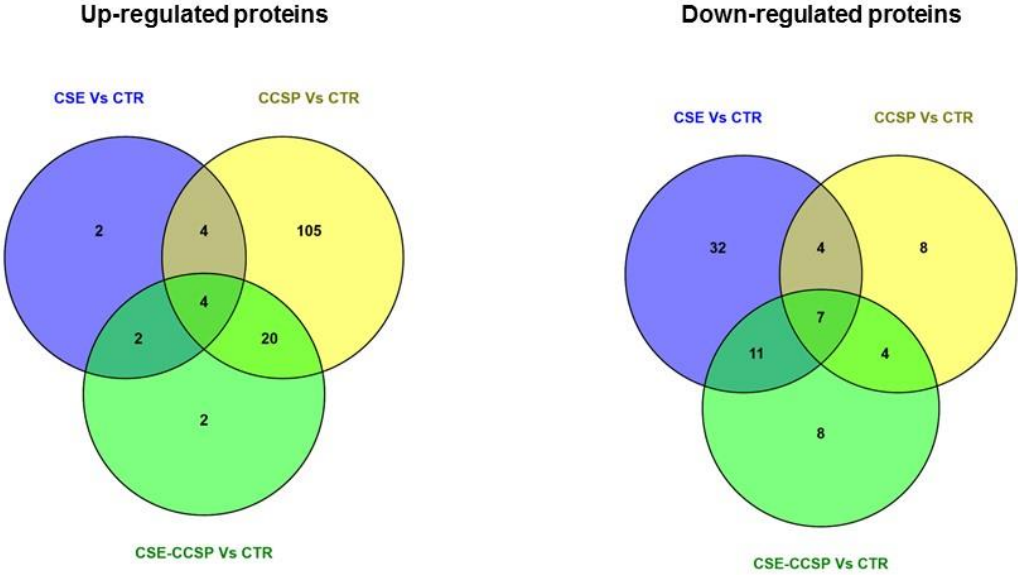


Figure 6



References

1. Plymoth A, Löfdahl C, Ekberg-Jansson A, Dahlbäck M, Lindberg H, Fehniger TE, Marko-Varga G. Human bronchoalveolar lavage: biofluid analysis with special emphasis on sample preparation. *Proteomics* 2003;3:962-72.
2. Plymoth A, Löfdahl C, Ekberg-Jansson A, Dahlbäck M, Broberg P, Foster M, Fehniger TE, Marko-Varga G. Protein expression patterns associated with progression of chronic obstructive pulmonary disease in bronchoalveolar lavage of smokers. *Clinical chemistry* 2007;53:636-44.
3. Plymoth A, Yang Z, Löfdahl C, Ekberg-Jansson A, Dahlbäck M, Fehniger TE, Marko-Varga G, Hancock WS. Rapid proteome analysis of bronchoalveolar lavage samples of lifelong smokers and never-smokers by micro-scale liquid chromatography and mass spectrometry. *Clinical chemistry* 2006;52:671-9.
4. Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S. Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;38:541-50.
5. Kinnula VL, Ishikawa N, Bergmann U, Ohlmeier S. Proteomic approaches for studying human parenchymal lung diseases. *Expert review of proteomics* 2009;6:619-29.
6. Casado B, Iadarola P, Luisetti M, Kussmann M. Proteomics-based diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease: the hunt for new markers. *Expert review of proteomics* 2008;5:693-704.
7. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, Chanez P, Bourdin A. Supplementing defect in Club Cell Secretory Protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* 2014;doi:10.1378/chest.14-1174.

Supplementary tables

Table 1. List of mRNA primers

mRNA	Forward	Reverse
KRT8	GATCGCCACCTACAGGAAGCT	ACTCATGTTCTGCATCCCAGACT
LAMA3	AGATGAGGCACATGGAGACC	TTCTTTTGCGCTTTGTGTTG
PSMB5	ACTTCCCTTACGCAACATGG	ATGGTGCCTAGCAGGTATGG
PSMB6	CAGAACAACCACTGGGTCCT	CCCGGTATCGGTAACACATC
CFL1	AAGTCTTCAACGCCAGAGGA	GCATAGCGGCAGTCCTTATC
GAPDH	CCATCTTCCAGGAGCGAG	CTTGAGGCTGTTGTCATACT

32 proteins Downregulated exclusively in "CSE Vs CTR":

Nidogen-2 -NID2
 Amyloid beta A4 protein -APP
 Amyloid-like protein 2 -APLP2
 Keratin, type II cytoskeletal 7 -KRT7
 Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor -LSR
 Retinoic acid-induced protein 3 -GPRC5A
 Malate dehydrogenase, mitochondril -MDH2
 Prostaglandin F2 receptor negative reagentor -PTGFRN
 Keratin, type II cytoskeletal 8 -KRT8
 Proteasome subunit alpha type-6 -PSMA6
 Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein]
 Annexin A3 -ANXA3
 Protein disulfide-isomerase A4 -PDIA4
 Histone H1.2 -HIST1H1C
 Phosphoglycerate mutase 1 -PGAM1
 Vinculin -VCL
 Plastin-3 -PLS3
 Histone H1.4 -HIST1H1E
 Proteasome subunit beta type-4 -PSMB4
 Aspartate aminotransferase, mitochondrial -GOT2
 Proteasome subunit beta type-6 -PSMB6
 Tubulin beta-3 chain -TUBB3
 L-lactate dehydrogenase B chain -LDHB
 Transketolase -TKT
 Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 -PEBP1
 Collagen alpha-1(III) chain -COL3A1
 Protocadherin-1 -PCDH1
 Serglycin -SRGN
 Tubulin beta-4A chain -TUBB4A
 Heat shock 70 kDa protein 4 -HSPA4
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A -PPIA
 Keratin, type I cytoskeletal 17 -KRT17

8 proteins Downregulated exclusively in "CCSP Vs CTR":

Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal -KRT2
Keratin, type I cytoskeletal 9 -KRT9
Junction plakoglobin -JUP
Keratin, type II cytoskeletal 1b -KRT77
Histone H2A.Z -H2AFZ
Keratin, type II cytoskeletal 78 -KRT78
Keratin, type II cytoskeletal 80 -KRT80
Keratin, type II cytoskeletal 1 -KRT1

8 proteins Downregulated exclusively in "CSE-CCSP Vs CTR":

Dystroglycan -DAG1
Plasma alpha-L-fucosidase -FUCA2
Cathepsin L1 -CTSL1
Alpha-2-macroglobulin -A2M
Insulin-like growth factor-binding protein 7 -IGFBP7
Laminin subunit gamma-1 -LAMC1
Plasminogen activator inhibitor 1 -SERPINE1
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 -PLOD3

7 common proteins Downregulated in "CSE Vs CTR", "CCSP Vs CTR" and "CSE-CCSP Vs CTR":

Keratin, type I cytoskeletal 19 -KRT19
Keratin, type II cytoskeletal 4 -KRT4
Keratin, type I cytoskeletal 15 -KRT15
Keratin, type II cytoskeletal 5 -KRT5
Keratin, type I cytoskeletal 13 -KRT13
Keratin, type II cytoskeletal 6B -KRT6B
Keratin, type I cytoskeletal 16 -KRT16

11 common proteins Downregulated in "CSE Vs CTR" and "CSE-CCSP Vs CTR":

Fibronectin -FN1- [FINC]
Complement C3 -C3 - [CO3]
Filamin-B -FLNB - [FLNB]
Laminin subunit beta-3 -LAMB3 - [LAMB3]
Laminin subunit alpha-3 -LAMA3 - [LAMA3]
Galectin-3-binding protein -LGALS3BP - [LG3BP]
Agrin -AGRN PE=1 SV=5 - [AGRIN]
Annexin A5 -ANXA5 - [ANXA5]
Phosphoglycerate kinase 1 -PGK1- [PGK1]
Annexin A2 -ANXA2 - [ANXA2]
Cadherin-13 -CDH13 - [CAD13]

4 common proteins Downregulated in "CSE Vs CTR" and "CCSP Vs CTR":

Keratin, type II cytoskeletal 3 -KRT3- [K2C3]
Keratin, type II cytoskeletal 6A -KRT6A- [K2C6A]
Laminin subunit alpha-5 -LAMA5 PE=1 SV=8 - [LAMA5]
Keratin, type II cytoskeletal 71 -KRT71- [K2C71]

4 common elements Downregulated in "CCSP Vs CTR" and "CSE-CCSP Vs CTR":

Keratin, type I cytoskeletal 27 -KRT27 - [K1C27]
Keratin, type I cytoskeletal 10 -KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10]
Keratin, type I cytoskeletal 14 -KRT14- [K1C14]
Keratin, type I cytoskeletal 24 -KRT24 - [K1C24]

2 proteins Upregulated included exclusively in "CSE Vs CTR":

Alpha-fetoprotein -AFP - [FETA]
Serum albumin -ALB - [ALBU]

2 proteins Upregulated included exclusively in "CSE-CCSP Vs CTR":

Hepatocyte growth factor receptor -MET- [MET]
Serglycin -SRGN- [SRGN]

4 common proteins Upregulated in "CSE Vs CTR", "CCSP Vs CTR" and "CSE-CCSP Vs CTR":

Actin, cytoplasmic 1 -ACTB - [ACTB]
Heat shock protein HSP 90-beta -HSP90AB1- [HS90B]
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 -HNRNPA2B1 - [ROA2]
Actin, alpha cardiac muscle 1 -ACTC1 - [ACTC]

105 proteins Upregulated included exclusively in "CCSP Vs CTR":

Keratin, type I cytoskeletal 18 -KRT18 - [K1C18]

60 kDa heat shock protein, mitochondrial -HSPD1 - [CH60]

Nucleoside diphosphate kinase A -NME1 - [NDKA]

Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial -C1QBP - [C1QBP]

Radixin -RDX - [RADI]

Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate -MARCKS- [MARCS]

Protein disulfide-isomerase -P4HB- [PDIA1]

Moesin -MSN- [MOES]

Glutathione S-transferase P -GSTP1 - [GSTP1]

Cofilin-2 -CFL2 - [COF2]

Profilin-1 -PFN1 - [PROF1]

Plastin-3 -PLS3- [PLST]

Protein disulfide-isomerase A3 -PDIA3- [PDIA3]

Protein disulfide-isomerase A6 -PDIA6 - [PDIA6]

Plectin -PLEC- [PLEC]

Alpha-enolase -ENO1 - [ENOA]

Endoplasmin -HSP90B1 - [ENPL]

Calnexin -CANX - [CALX]

Transgelin -TAGLN- [TAGL]

Tropomyosin alpha-1 chain -TPM1 - [TPM1]

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 -HNRNPA1 PE=1 SV=5 - [ROA1]

Filamin-A -FLNA- [FLNA]

Nucleophosmin -NPM1 - [NPM]

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase -GAPDH- [G3P]

Laminin subunit gamma-2 -LAMC2 - [LAMC2]

Keratin, type II cytoskeletal 8 -KRT8 PE=1 SV=7 - [K2C8]

Laminin subunit beta-3 -LAMB3 - [LAMB3]

Transaldolase -TALDO1 - [TALDO]

Insulin-like growth factor-binding protein 7 -IGFBP7 - [IBP7]

14-3-3 protein gamma -YWHAG - [1433G]

14-3-3 protein eta -YWHAH- [1433F]

Glucosidase 2 subunit beta -PRKCSH - [GLU2B]

Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 -TGM2 - [TGM2]

Glucose-6-phosphate isomerase -GPI- [G6PI]

Keratin, type I cytoskeletal 23 -KRT23 - [K1C23]

Laminin subunit gamma-1 -LAMC1- [LAMC1]

Keratin, type II cuticular Hb6 -KRT86 - [KRT86]

Proteasome subunit alpha type-5 -PSMA5- [PSA5]

Insulin-like growth factor-binding protein 6 -IGFBP6 - [IBP6]

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A -PPIA - [PPIA]

Tubulin beta-4A chain -TUBB4A - [TBB4A]

DNA damage-binding protein 1 -DDB1 - [DDB1]

Nuclease-sensitive element-binding protein 1 -YBX1- [YBOX1]

Agrin -AGRIN PE=1 SV=5 - [AGRIN]

Peroxiredoxin-2 -PRDX2 PE=1 SV=5 - [PRDX2]

Annexin A3 -ANXA3- [ANXA3]

WD repeat-containing protein 1 -WDR1- [WDR1]

Importin subunit beta-1 -KPNB1 - [IMB1]

Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic -TARS- [SYTC]

14-3-3 protein beta/alpha -YWHAB- [1433B]

Lupus La protein -SSB - [LA]
Filamin-B -FLNB - [FLNB]
Tropomyosin alpha-3 chain -TPM3 - [TPM3]
10 kDa heat shock protein, mitochondrial -HSPE1 - [CH10]
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 -PKM- [KPYM]

L-lactate dehydrogenase B chain -LDHB - [LDHB]

Transketolase -TKT- [TKT]
Fibulin-1 -FBLN1- [FBLN1]
Adenosylhomocysteinase -AHCY- [SAHH]

Protein disulfide-isomerase A4 -PDIA4 - [PDIA4]

14-3-3 protein sigma -SFN - [1433S]

Phosphoglycerate kinase 1 -PGK1- [PGK1]

Alpha-actinin-1 -ACTN1 - [ACTN1]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K -HNRNPK - [HNRPK]
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic -GOT1- [AATC]
Fructose-bisphosphate aldolase A -ALDOA - [ALDOA]

Malate dehydrogenase, mitochondrial -MDH2- [MDHM]
Puromycin-sensitive aminopeptidase -NPEPPS - [PSA]

Elongation factor 1-alpha 1 -EEF1A1 - [EF1A1]
Serine/arginine-rich splicing factor 2 -SRSF2- [SRSF2]

Eukaryotic initiation factor 4A-I -EIF4A1 - [IF4A1]

Brain acid soluble protein 1 -BASP1 - [BASP1]

Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 -PEBP1- [PEBP1]
Calmodulin -CALM1 - [CALM]
Nidogen-2 -NID2- [NID2]

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B -PPIB - [PPIB]
Ribonuclease inhibitor -RNH1 - [RINI]

Sulfhydryl oxidase 1 -QSOX1- [QSOX1]
Prelamin-A/C -LMNA - [LMNA]
CD109 antigen -CD109 - [CD109]
14-3-3 protein zeta/delta -YWHAZ - [1433Z]
Tubulin alpha-4A chain -TUBA4A - [TBA4A]
Tubulin alpha-1C chain -TUBA1C - [TBA1C]
14-3-3 protein theta -YWHAQ - [1433T]
Protein S100-A6 -S100A6 - [S10A6]
Triosephosphate isomerase -TPI1- [TPIS]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B -HNRNPAB - [ROAA]
Phosphoglycerate mutase 1 -PGAM1 - [PGAM1]
Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor -LSR- [LSR]
Thrombospondin-1 -THBS1 - [TSP1]
Protocadherin-1 -PCDH1 - [PCDH1]

Rab GDP dissociation inhibitor beta -GDI2 - [GDIB]
14-3-3 protein epsilon -YWHAE - [1433E]
Peroxiredoxin-1 -PRDX1 - [PRDX1]

Macrophage migration inhibitory factor -MIF- [MIF]
Tubulin beta-3 chain -TUBB3 - [TBB3]
Proteasome subunit alpha type-3 -PSMA3 - [PSA3]
Keratin, type I cytoskeletal 17 -KRT17 - [K1C17]
Keratin, type II cytoskeletal 7 -KRT7 PE=1 SV=5 - [K2C7]
Proteasome subunit beta type-6 -PSMB6- [PSB6]
Annexin A2 -ANXA2 - [ANXA2]
Tyrosine-protein kinase receptor UFO -AXL- [UFO]
Calsyntenin-1 -CLSTN1 - [CSTN1]
Transitional endoplasmic reticulum ATPase -VCP- [TERA]
Follistatin-related protein 1 -FSTL1 - [FSTL1]

11. Discussion de l'article 6

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés d'obtenir un modèle inflammatoire d'épithélium bronchique. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation dose-dépendante de la sécrétion d'IL8 et de MUC5AC en réponse à la stimulation par du CSE. Ces protéines étant respectivement représentatives de l'inflammation et de l'hypersécrétion bronchique de mucus, nous avons considéré notre modèle d'inflammation induite par le tabac fiable.

L'approche protéomique est une méthode non biaisée par une hypothèse de départ, dénuée d'*a priori* sur les résultats engendrés. Nous avons ainsi pu déterminer la signature spécifique des cellules épithéliales agressées par le tabac ou autrement dit leur sécrétome. Dans les épithélia stimulés par le tabac, les protéines de la matrice extracellulaire (protéines de la famille des kératines, laminines, tubulines etc...) sont sous-exprimées tout comme les protéines de la machinerie du protéasome. La supplémentation en CCSP exogène de ces mêmes épithélia (agressés par le tabac) entraîne une hyperproduction de ces protéines suggérant ainsi un contre-effet « réparateur » de CCSP tendant à restaurer *ad integrum* le sécrétome de l'épithélium bronchique. Les protéines régulées ici, de façon significative selon les conditions, sont des protéines de structure cellulaire ou encore étant normalement présentes dans le cytosol cellulaire (en ce qui concerne les protéines de la machinerie du protéasome). Nous pouvons formuler l'hypothèse que l'agression provoquée par le tabac est telle que les cellules perdent toute cohésion et structure, soit par une toxicité directe, soit par régulation de l'expression protéique. La supplémentation en CCSP tend à restaurer ces anomalies. Le modèle NCI-H292 est un modèle cellulaire difficile à maîtriser, non pas du point de vue technique, car les cellules prolifèrent facilement et rapidement, mais du point de vue de sa propension à fournir des résultats extrapolables à la physiologie humaine. Déterminer la signification exacte des signatures protéomiques mises en évidence ici nécessite des expériences complémentaires.

12. Conclusion de l'article 6

Notre travail nous permet de déterminer la signature protéomique des cellules épithéliales bronchiques agressées par le tabac et met également en évidence la signature du traitement par la protéine CCSP de mêmes épithélia. De façon intéressante, il s'agit principalement de protéines de la matrice extracellulaire et de la machinerie du protéasome.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail était décliné en 3 objectifs :

- le premier était de comprendre la régulation endogène du gène *CCSP*,
- le second était de caractériser les cellules Club dans notre modèle *ex vivo* d'épithélium bronchique,
- et le dernier était d'étudier les effets de la supplémentation exogène en protéine *CCSP* sur l'épithélium bronchique.

Dans la BPCO, la cellule Club et sa protéine spécifique *CCSP* ont fait l'objet de quelques études physiopathologiques importantes. Un déficit en cellules Club a été plusieurs fois observé dans la BPCO. Ce déficit serait à l'origine de concentrations moindres en protéine *CCSP* dans les voies aériennes et dans le sang.

Dans la première partie de notre travail, nous avons focalisé notre attention sur le polymorphisme G38A, affectant le promoteur du gène codant pour la protéine *CCSP*. Son implication maintenant bien documentée semble indiscutable dans de nombreuses pathologies respiratoires chroniques (asthme, syndrome de bronchiolite oblitérante...). Cependant peu d'analyse GWAS ont identifié ce gène du chromosome 11 comme responsable d'une susceptibilité accrue à développer la BPCO. Les résultats que nous avons obtenus indiquent clairement que ce polymorphisme est impliqué dans la régulation des taux de protéine *CCSP* sérique, où elle est mille fois moins abondante que dans les voies aériennes. Nous avons ainsi démontré la présence d'une interaction gène-environnement dans la BPCO, ce qui est intéressant en terme diagnostique : déterminer le génotype de *CCSP* des individus fumeurs pourrait permettre d'identifier une population à risque de développer la maladie.

Il a été démontré que les souris invalidées pour le gène *CCSP* sont plus susceptibles de développer une pathologie pulmonaire lorsqu'elles sont agressées par la fumée de cigarette, semblable d'un point de vue histopathologique à la BPCO décrite chez l'homme. La restauration de taux sériques normaux de cette protéine chez ces souris déficientes semble conférer une « protection » vis-à-vis de la fumée de cigarette.

Beaucoup d'observations ayant déjà été faites chez l'animal, nous avons porté notre intérêt sur l'étude des cellules Club et de la protéine *CCSP* chez l'homme. L'étude que nous avons menée dans une deuxième partie vise à une meilleure compréhension du

rôle des cellules Club de l'épithélium bronchique humain. Nous avons reproduit un modèle d'étude de cellules épithéliales bronchiques de sujets sains et de patients BPCO, au plus proche des conditions physiologiques. Au cours de ces cultures en ALI, les cellules exprimant CCSP semblent relativement plus fréquentes qu'*in vivo*, ce d'autant que ces cultures sont issues de cellules épithéliales prélevées à un niveau proximal de l'arbre aérien au cours d'une endoscopie. Ces cellules ne sont pas présentes de manière significative au cours de la phase de prolifération mais sont de plus en plus représentées au cours de la phase de différenciation qui débute à partir de la mise en ALI. Les cellules exprimant CCSP semblent dans ce modèle issues de cellules épithéliales bronchiques, capables de proliférer puis de se différencier.

Par la suite, il serait intéressant de caractériser les cellules CCSP+ en enrichissant ces populations grâce à des marqueurs de surface complémentaires spécifiques de certaines fonctions. A ce stade, les phénotypes opposés (cytoplasmique vs sécrété) décrits ne sont pas associés à des fonctions différentielles. Nous pourrions modifier le phénotype épithélial naturellement obtenu au cours d'une différenciation en ALI par le biais d'anticorps neutralisant la voie de signalisation Notch ou une autre cible (à l'image du ciblage spécifique de Cyp2f2 par le naphtalène chez la souris). Associé à l'utilisation d'imagerie confocale, d'immunoTEM ou de FACS trieur, nous pourrions avancer dans cette caractérisation. Enfin, l'analyse transcriptomique de ces cellules CCSP+ pourrait permettre d'identifier leur hétérogénéité.

Après avoir saisi tout l'intérêt de ces cellules en contexte physiologique et pathologique, nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de la protéine CCSP. Plusieurs études rapportent de manière relativement consistante un rôle immuno-modulateur fin, plutôt anti-inflammatoire, en ciblant la PLA2 ou encore comme NF- κ B. Dans la littérature, il est décrit un effet paracrine au sein des voies aériennes mais, mis à part des arguments indirects pour une signalisation médiée par le FPR, il n'est pas connu de récepteur à cette molécule. Dans la dernière partie de notre étude, nous avons prouvé que la supplémentation en CCSP exogène des épithélia en ALI à partir de patients BCPO, préalablement stimulés par le CSE, permet une diminution significative de la production d'IL8 au niveau apical. Nous avons émis l'hypothèse que CCSP puisse interférer avec l'histoire naturelle de la maladie. Ensuite, nous avons essayé de comprendre les mécanismes mis en jeu par la supplémentation en CCSP des épithélia bronchiques. L'effet de CCSP sur l'inhibition du chimiotactisme des

neutrophiles peut être médié via l'épithélium, potentiellement par l'interaction avec la voie NF- κ B ou la voie PLA2. Nous proposons également que l'action inhibitrice de CCSP puisse s'effectuer directement sur les neutrophiles, soit par fixation sur les récepteurs des substances chimioattractantes présents à la surface des neutrophiles (CXCR1/2 ou FRP2 par exemple) soit par interactions directes avec ces substances chimioattractantes (IL8 ou fMLP respectivement), les empêchant ainsi de se fixer sur leur récepteur. Nous suggérons qu'une restauration des taux endogènes de la protéine CCSP chez les patients souffrant de BPCO pourrait aider à réguler l'inflammation neutrophilique exagérée retrouvée chez ces patients.

In vivo, deux essais thérapeutiques en cours sont potentiellement intéressants. L'un teste l'efficacité de CCSP chez des prématurés ayant développé un syndrome de détresse respiratoire. L'autre sera mené par notre équipe, grâce à une collaboration avec Therabron et le Dr Aprile Pilon aux USA. Nous cherchons à déterminer cette fois-ci l'influence d'une supplémentation *in vivo* avec différents isoformes de CCSP sur des modèles épithéliaux, ainsi que sur des neutrophiles issus de patients BPCO et sujets témoins. L'optique d'une utilisation thérapeutique de CCSP est donc tout à fait plausible.

Au total, il existe des arguments cliniques, biologiques, animaux, cellulaires, biochimiques, suffisamment pertinents pour émettre l'hypothèse que la protéine CCSP est une molécule anti-inflammatoire endogène naturelle dont le déficit clinique et/ou fonctionnel, déterminé ou acquis soit potentiellement préjudiciable pour l'avenir respiratoire de patients à l'exposome défavorable.

Editorial : « Club cells and CC16: another “smoking gun”? (With potential bullets against COPD) »



Club cells and CC16: another “smoking gun”? (With potential bullets against COPD)

Lucie Knabe¹, Aurélie Fort², Pascal Chanez³ and Arnaud Bourdin^{1,2}

Affiliations: ¹U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, Montpellier University, Montpellier, France. ²Dept of Respiratory Diseases, CHRU Montpellier, Montpellier, France. ³Dept of Respiratory Diseases APHM, INSERM CNRS U 1067, UMR7333, Aix-Marseille University, Marseille, France.

Correspondence: Arnaud Bourdin, Dept of Respiratory Diseases, 371 Av Doyen Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France. E-mail: a-bourdin@chu-montpellier.fr



@ERSpublications

Greater susceptibility of knockout CC16 mice to cigarette smoking gives insight regarding a potential player in COPD <http://ow.ly/KhCMA>

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) remains a challenge for clinicians and scientists, as no currently available treatment can significantly change the natural history of the disease. Accelerated lung function decline and recurrent episodes of exacerbations are thought to play critical roles in precipitating patients towards comorbid conditions, long-term oxygen supplementation dependency, and finally death. Currently, the underlying paradigm counterbalances alveolar wall destruction with peribronchiolar fibrosis, the latter being hypothesised to precede the former [1]. Although small airways are now largely recognised as the critical zone of disease initiation and progression [2], very few histological and biological properties specific to this compartment in humans have been highlighted to explain this phenomenon.

Club cells, identified during the 19th century, are one of these targets and thorough efforts have aimed at identifying them as another “smoking gun” candidate [3]. CC16, a 15.8-kDa protein, is secreted by these nonciliated bronchiolar cells and is supposed to have anti-inflammatory properties. Confusing roles in airway homeostasis maintenance have been attributed both to the protein and to the cell [4], since these cells are commonly identified by the protein. CC16 could act through the direct binding of inhaled toxicants within its hydrophobic pocket for example, while the club cell may detoxify inhaled noxious agents through the expression of naphthalene-targeted CYP2F2 cytochrome [5] and play a role of accessory resident stem cell [6].

Serum CC16 level has been shown as a potential biomarker of accelerated lung function decline in a very large cohort [7]. CC16 polymorphism and local deficiency on the one hand, and a decreased number of club cells on the other hand, were reported as features of COPD [8, 9], as confirmed by LAUCHO-CONTRERAS *et al.* [10] in the current issue of the *European Respiratory Journal*. In previous studies, exogenous CC16 showed pharmacological properties that could decrease excess airway inflammation and mucus production in *ex vivo* models [11–13]. However, CC16 has not demonstrated physiological properties, as shown in a prior report on CC16-deficient mice, which were not more susceptible to changes induced by cigarette smoke [14].

The paper by LAUCHO-CONTRERAS *et al.* [10] has reported novel and important observations of knockout CC16 mice exposed to 6 months of smoking. They not only observed an increased susceptibility of the knockout animals to emphysema and peribronchiolar fibrosis, but also unravelled potential mechanisms of action of CC16 involved in COPD development. These knockout mice exposed to cigarette smoke exhibited exaggerated airway inflammation, increased alveolar septal and bronchial cell apoptosis and goblet cell metaplasia. Conversely, increased nuclear factor- κ B levels of activation were recorded. These findings support the hypothesis of McDONOUGH *et al.* [1], which states that bronchiolar obstruction may

Received: Jan 21 2015 | Accepted after revision: Feb 18 2015

Conflict of interest: None declared.

Copyright ©ERS 2015

precede emphysema. Importantly, these animals could be rescued from the harmfulness of cigarette exposure by overexpressing CC16 through inhaled transfected adenovirus, and this represents a therapeutic perspective.

These promising observations deserve important comments. First, the exact mechanism of action of CC16 is in fact not firmly established here, since *ex vivo* air–liquid interface cultures of the airway epithelium of knockout mice did not behave differently from the wildtype-derived cells, and demonstrated no exaggerated apoptosis. CC16 may act through a direct intercellular paracrine action [15] or direct inhaled toxicant neutralisation [5], but unfortunately, this was not investigated in the present study. Phospholipase A2 had been considered a possible target for CC16 but this was not confirmed. The identification of a receptor for CC16 would represent the next step to better understand this hypothesis. Since CYP2F2 disappeared with CC16 knockout in the present study, this raised the question of whether interfering with the protein also interfered with the cell, and subsequently, the question of whether protein or cell was the most important player in the field [16].

Secondly, exposure to cigarette smoke required high levels to reach these findings, in contrast with a previous attempt using the same animals [14]. Indeed, this does not at all predict the extent to which CC16 is important in regard to COPD susceptibility. Furthermore, knowledge about human and rodent airway epithelia is not perfectly corroborating, since cells expressing CC16 are predominant throughout the rodent airway tree [17].

Recently, CC16-expressing cells from the bone marrow were shown to participate in airway epithelial regeneration [16]. With regard to the human therapeutic perspective, it is of great importance to identify the optimal timing of initiation and especially whether it should occur before or after smoking cessation. This debate reaches beyond biology but the answer is a prerequisite for best ethical decision making when considering cigarette smoking as an addiction.

Last but not least, this study does not really improve understanding of why CC16 polymorphisms would be important in increasing COPD susceptibility as identified by large genome-wide association study initiatives. It provides an important insight regarding a potential key player in the injury/repair imbalance elicited at the epithelial surface. However, the dynamic regulation of CC16 expression and release is not allowed by such a model, for example during an exacerbation, and this is potentially important in the futuristic therapeutic perspective of exogenous supplementation in humans.

References

- McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, *et al.* Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 1567–1575.
- Burgel PR, Bourdin A, Chanez P, *et al.* Update on the roles of distal airways in COPD. *Eur Respir Rev* 2011; 20: 7–22.
- Crystal RG. Airway basal cells. The “smoking gun” of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 1355–1362.
- Bernard A. Club cell protein and chronic obstructive pulmonary disease progression: the unrealized potential of a peripheral lung biomarker. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 614–615.
- Stripp BR, Lund J, Mango GW, *et al.* Clara cell secretory protein: a determinant of PCB bioaccumulation in mammals. *Am J Physiol* 1996; 271: L656–L664.
- Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 2002; 161: 173–182.
- Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, *et al.* Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N Engl J Med* 2011; 365: 1184–1192.
- Kim DK, Cho MH, Hersh CP, *et al.* Genome-wide association analysis of blood biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 1238–1247.
- Bourdin A, Kotsimbos T, Nguyen K, *et al.* Non-invasive assessment of small airway remodelling in smokers. *COPD* 2010; 7: 102–110.
- Lacho-Contreras ME, Polverino F, Gupta K, *et al.* Protective role for club cell secretory protein-16 (CC16) in the development of COPD. *Eur Respir J* 2015; 45: 1544–1556.
- Gamez AS, Gras D, Petit A, *et al.* Supplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* 2014 [In press DOI: 10.1378/chest.14-1174].
- Tokita E, Tanabe T, Asano K, *et al.* Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *Eur Respir J* 2014; 44: 1002–1010.
- Hiemstra PS, Bourdin A. Club cells, CC10 and self-control at the epithelial surface. *Eur Respir J* 2014; 44: 831–832.
- Park HY, Churg A, Wright JL, *et al.* Club cell protein 16 and disease progression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 1413–1419.
- Reynolds SD, Reynolds PR, Snyder JC, *et al.* CCSP regulates cross talk between secretory cells and both ciliated cells and macrophages of the conducting airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L114–L123.
- Bustos ML, Mura M, Hwang D, *et al.* Depletion of bone marrow CCSP-expressing cells delays airway regeneration. *Mol Ther* 2015; 23: 561–569.
- Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1585–1591.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)* 2012;380:2095-128.
2. Roche N, Perez T, Neukirch F, Carré P, Terrioux P, Pouchain D, Ostinelli J, Suret C, Meleze S, Huchon G. [The gap between the high impact and low awareness of COPD in the population]. *Revue des Maladies Respiratoires* 2009;26:521-9.
3. Briscoe WA, Nash ES. The slow space in Chronic Obstructive Pulmonary Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1965;121:706-22.
4. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *British medical journal* 1977;1:1645-8.
5. Lange P, Celli B, Agustí A, Jensen GB, Divo M, Faner R, Guerra S, Marott JL, Fern, Martinez FD, Martinez OD, Martinez-Cambor P, Meek P, Owen CA, Petersen H, Pinto-Plata V, Schnohr P, Sood A, Soriano JB, Tesfaigzi Y, Vestbo J. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England journal of medicine* 2015;373:111-22.
6. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007;176:532-55.
7. Omori H, Nakashima R, Otsuka N, Mishima Y, Tomiguchi S, Narimatsu A, Nonami Y, Mihara S, Koyama W, Marubayashi T, Morimoto Y. Emphysema detected by lung cancer screening with low-dose spiral CT: prevalence, and correlation with smoking habits and pulmonary function in Japanese male subjects. *Respirology (Carlton, Vic.)* 2006;11:205-10.
8. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, de Oca MM, Mendez RA, Plata VP, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity

index in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2004;350:1005-12.

9.Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001;163:1256-76.

10.Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet (London, England)* 2009;374:733-43.

11.Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 2006;61:935-9.

12.Cigarette smoking and health. American Thoracic Society. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;153:861-5.

13.Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tobacco control* 2003;12:424-30.

14.Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews. Drug discovery* 2013;12:543-59.

15.Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Updated 2010. *goldcopd.org* at <http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLDReport_April112011.pdf>.

16.Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Fern, Martinez FJ, Martinez OJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2013;187:347-65.

17.Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, Martin J, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 1994;77:1011-4.

18.Rhodin JA. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *The American review of respiratory disease* 1966;93:Suppl:1-15.

19. Watson JH, Brinkman GL. Electron microscopy of the epithelial cells of normal and bronchitic human bronchus. *The American review of respiratory disease* 1964;90:851-66.
20. Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. *The American review of respiratory disease* 1977;116:705-77.
21. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, R SH, Randell SH, ell, Hogan BLM. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:12771-5.
22. Hackett T, Shaheen F, Johnson A, Wadsworth S, Pechkovsky DV, Jacoby DB, Kicic A, Stick SM, Knight DA. Characterization of side population cells from human airway epithelium. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008;26:2576-85.
23. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM. The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 2009;4:525-534.
24. Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Br, Law BM, Law OM, Vinarsky V, Cho JL, Breton S, Sahay A, Medoff BD, Rajagopal J. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature* 2013;503:218-23.
25. Shebani E, Shahana S, Janson C, Roomans GM. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue & cell* 2005;37:145-52.
26. Hajj R, Baranek T, Le Naour R, Lesimple P, Puchelle E, Coraux C. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007;25:139-48.
27. Randell SH. Airway Epithelial Stem Cells and the Pathophysiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006;3:718-725.
28. Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, Zheng H, Ogórek B, Rondon-Clavo C, Ferreira-Martins J, Matsuda A, Arranto C, Goichberg P, Giordano G, Haley KJ, Bardelli S, Rayatzadeh H, Liu X, Quaini F, Liao R, Leri A, Perrella MA,

Loscalzo J, Anversa P. Evidence for human lung stem cells. *The New England journal of medicine* 2011;364:1795-806.

29. Turner J, Roger J, Fitau J, Combe D, Giddings J, van Heeke G, Jones CE. Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011;44:276-84.

30. Linnoila RI. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2006;86:425-44.

31. Gosney JR, Sissons MC, Allibone RO. Neuroendocrine cell populations in normal human lungs: a quantitative study. *Thorax* 1988;43:878-82.

32. Boers JE, Brok den JL, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FB. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;154:758-63.

33. Stevens TP, McBride JT, Peake JL, Pinkerton KE, Stripp BR. Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury. *The American journal of physiology* 1997;272:L486-93.

34. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;159:1585-91.

35. Singh G, Katyal SL. Clara cell proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:43-58.

36. Singh G, Singh J, Katyal SL, Brown WE, Kramps JA, Paradis IL, Dauber JH, Macpherson TA, Squeglia N. Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1988;36:73-80.

37. Broeckaert F, Clippe A, Knoops B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:68-77.

38. Stripp BR, Reynolds SD. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008;5:328-33.

- 39.Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364:709-21.
- 40.Puchelle E, Zahm J, Tournier J, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006;3:726-33.
- 41.Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996;51:267-71.
- 42.Saetta M, Turato G, Corbino L, Ruggieri MP, Pieno M, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. Mechanisms of damage in COPD. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo* 1997;52:586-8.
- 43.Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *The New England journal of medicine* 1968;278:1355-60.
- 44.Postma DS, Boezen HM. Rationale for the Dutch hypothesis. Allergy and airway hyperresponsiveness as genetic factors and their interaction with environment in the development of asthma and COPD. *Chest* 2004;126:96S-104S; discussion 159S-161S.
- 45.Anthonisen NR. The British hypothesis revisited. *The European respiratory journal* 2004;23:657-8.
- 46.Shah V, Sridhar S, Beane J, Brody JS, Spira A. SIEGE: Smoking Induced Epithelial Gene Expression Database. *Nucleic acids research* 2005;33:D573-9.
- 48.Cumming C. The correlation of structure and function in chronic obstructive lung disease. *Journal of clinical pathology* 1971;24:483.
- 49.Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;160:S21-5.

50. Gelb AF, Gobel PH, Fairshter R, Zamel N. Predominant site of airway resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 1981;79:273-6.
51. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2004;350:2645-53.
52. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, Finkbeiner W, Jones K, Broaddus VC, Sheppard D, Barzcak A, Xiao Y, Erle DJ, Nishimura SL. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:3551-62.
53. Caramori G, Di Gregorio C, Carlstedt I, Casolari P, Guzzinati I, Adcock IM, Barnes PJ, Ciaccia A, Cavallesco G, Chung KF, Papi A. Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 2004;45:477-84.
54. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998;157:822-6.
55. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;160:711-7.
56. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *The Journal of Pathology* 2000;190:619-26.
57. Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, Nishimura M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004;31:405-12.
58. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, Zuin R, Sinigaglia F, Fabbri LM. Increased

expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002;165:1404-9.

59.Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Umeda A. Increased expression of inflammatory mediators in small-airway epithelium from tobacco smokers. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2000;278:L906-13.

60.Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K. Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal* 2005;25:640-6.

61.O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, Djukanovic R. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004;59:837-42.

62.Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;153:530-4.

63.Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1993;92:537-48.

64.Koyama S, Rennard SI, Leikauf GD, Shoji S, Essen von S, Claassen L, Robbins RA. Endotoxin stimulates bronchial epithelial cells to release chemotactic factors for neutrophils. A potential mechanism for neutrophil recruitment, cytotoxicity, and inhibition of proliferation in bronchial inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1991;147:4293-301.

65.Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. *Annual review of physiology* 1992;54:303-29.

66. Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *The American journal of physiology* 1994;266:L278-86.
67. Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, Kay AB. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 1992;77:330-7.
68. Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1992;89:1001-9.
69. Traves SL, Culpitt SV, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 2002;57:590-5.
70. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, Nishimura M. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* 2002;57:405-11.
71. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of leukocyte biology* 1994;56:559-64.
72. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological reviews* 2004;56:515-48.
73. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest* 2003;123:1240-7.
74. Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;160:893-8.

75. Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, Agustí AG. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001;56:432-7.
76. Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *The New England journal of medicine* 1987;317:687-94.
77. Bourdin A, Kotsimbos T, Nguyen K, Vachier I, Mainprice B, Farce M, Paganin F, Marty-Ané C, Vernhet H, Godard P, Chanez P. Non-Invasive Assessment of Small Airway Remodelling in Smokers. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2010;7:102-110.
78. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, de Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001;163:185-94.
79. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Shibuya Y, Morita Y, Hirasawa M, Okutani R, Kawai T, Abe S. Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *The European respiratory journal* 1997;10:1108-14.
80. Braido F, Riccio AM, Guerra L, Gamalero C, Zolezzi A, Tarantini F, de Giovanni B, Folli C, Descalzi D, Canonica GW. Clara cell 16 protein in COPD sputum: A marker of small airways damage? *Respiratory Medicine* 2007;101:2119-2124.
81. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Miller BE, Coxson HO, Tal-Singer R. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 2008;63:1058-1063.
82. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Crim C, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Rennard SI. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *The New England journal of medicine* 2011;365:1184-92.
83. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, Spangenberg A, Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Lavi I, Tarès L, Carsin A, Dobaño C, Barreiro E, Zock J, Martínez-Moratalla J, Urrutia I, Sunyer J, Keidel D, Imboden M, Probst-Hensch N, Hallberg J, Melén E,

- Wickman M, Bousquet J, Belgrave DCM, Simpson A, Custovic A, Antó JM, Martinez FD. Relation between circulating CC16 concentrations, lung function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective study. *The Lancet. Respiratory medicine* 2015;3:613-20.
- 84.Clara M. Zur Histobiologie des Bronchalepithels [On the histobiology of the bronchial epithelium.]. *Z mikrosk anat Forsch* 1937;
- 85.Clara M. Beitrage zur Histotopochemie des Vitamin C im Nervensystem des Menschen [Contributions to the histotopochemistry of vitamin C in the human nervous system.]. *Z mikrosk anat Forsch* 1942;
- 86.Andrew W, Burns MR. Leucocytes in the tracheal epithelium of the mouse. *Journal of morphology* 1947;81:317-41.
- 87.Policard A, Collet A, Giltaire-Ralyte L. Observations microélectroniques sur l'infrastructure des cellules bronchiolaires [Electron microscopic observations on the ultrastructure of bronchiolar cells.]. *Les bronches* 1955;
- 88.Winkelmann A, Noack T. The Clara cell: a "Third Reich eponym"? *The European respiratory journal* 2010;36:722-7.
- 89.Federal International Committee on Anatomical Terminology (FICAT):Terminologia Histologica. *Arquivos brasileiros de oftalmologia* 2008;59+123-58.
- 90.Hayek H. Zur Histophysiologie der Epithelzellen der Bronchuli und Alveolen.[On the histophysiology of the epithelial cells of bronchioli and alveoli.]. *Verh Anat Ges* 1951;
- 91.Montes M, Adler RH, Brennan JC. Bronchiolar apocrine tumor. *The American review of respiratory disease* 1966;93:946-50.
- 92.Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:2724-30.
- 93.Rawlins EL. Lung epithelial progenitor cells: lessons from development. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008;5:675-81.
- 94.Reynolds SD, Zemke AC, Giangreco A, Brockway BL, Teisanu RM, Drake JA, Mariani T, Di P PY, Taketo MM, Stripp BR. Conditional stabilization of beta-catenin expands the pool of lung stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008;26:1337-46.

95. Morimoto M, Liu Z, Cheng H, Winters N, Bader D, Kopan R. Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *Journal of cell science* 2010;123:213-24.
96. Lafkas D, Shelton A, Chiu C, de Boenig GL, Chen Y, Stawicki SS, Siltanen C, Reichelt M, Zhou M, Wu X, Eastham-Anderson J, Moore H, Roose-Girma M, Chinn Y, Hang JQ, Warming S, Egen J, Lee WP, Austin C, Wu Y, Pay J, Payandeh J, eh, Lowe JB, Siebel CW. Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature* 2015;528:127-31.
97. West JAA, Williams KJ, Toskala E, Nishio SJ, Fleschner CA, Forman HJ, Buckpitt AR, Plopper CG. Induction of tolerance to naphthalene in Clara cells is dependent on a stable phenotypic adaptation favoring maintenance of the glutathione pool. *The American journal of pathology* 2002;160:1115-27.
98. Amazonia.transcriptome.eu<<http://amazonia.transcriptome.eu/expression.php?geneId=Hs.558318gt>.
99. Nhamburo PT, Kimura S, McBride OW, Kozak CA, Gelboin HV, Gonzalez FJ. The human CYP2F gene subfamily: identification of a cDNA encoding a new cytochrome P450, cDNA-directed expression, and chromosome mapping. *Biochemistry* 1990;29:5491-9.
100. Singh G, Katyal SL. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1997;17:141-3.
101. Weller BL, Crapo JD, Slot J, Posthuma G, Plopper CG, Pinkerton KE. Site- and cell-specific alteration of lung copper/zinc and manganese superoxide dismutases by chronic ozone exposure. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1997;17:552-60.
102. Cruzan G, Bus J, Banton M, Gingell R, Carlson G. Mouse specific lung tumors from CYP2F2-mediated cytotoxic metabolism: an endpoint/toxic response where data from multiple chemicals converge to support a mode of action. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 2009;55:205-18.

- 103.Li L, Jia K, Hartog M, Wang Y, van Winkle L, Ding X. Role of human CYP2A13 and CYP2F1 in naphthalene bioactivation and toxicity in the lung and nasal mucosa of a CYP2A13/2F1-humanized Mouse (LB636). *FASEB J* 2014;
- 104.Barth PJ, James H, Fanny C, Soraya U, Ryan W, Mark EW. Proliferation and number of Clara cell 10-kDa protein (CC10)-reactive epithelial cells and basal cells in normal, hyperplastic and metaplastic bronchial mucosa. *Virchows Archiv* 2000;437:648-655.
- 105.Perl AT, Riethmacher D, Whitsett JA. Conditional depletion of airway progenitor cells induces peribronchiolar fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011;183:511-21.
- 106.Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM. The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 2009;4:525-534.
- 107.Stripp BR. Hierarchical organization of lung progenitor cells: is there an adult lung tissue stem cell? *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008;5:695-8.
- 108.Evans MJ, Johnson LV, Stephens RJ, Freeman G. Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO₂ or O₃. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1976;35:246-57.
- 109.Gras D, Chanez P, Vachier I, Petit A, Bourdin A. Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. *Pharmacology & therapeutics* 2013;140:290-305.
- 110.Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2001;24:671-81.
- 111.Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121:823-35.
- 112.Ling T, Kuo M, Li C, Yu AL, Huang Y, Wu T, Lin Y, Chen S, Yu J. Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to

SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:9530-5.

113.Londhe VA, Maisonet TM, Lopez B, Jeng J, Li C, Minoo P. A subset of epithelial cells with CCSP promoter activity participates in alveolar development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011;44:804-12.

114.Wong AP, Arm, Keating A, Keating, Lu W, Duchesneau P, Wang X, Sacher A, Hu J, Waddell TK. Identification of a bone marrow-derived epithelial-like population capable of repopulating injured mouse airway epithelium. *The Journal of clinical investigation* 2009;119:336-48.

115.Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *The American journal of pathology* 2000;156:269-78.

116.Stripp BR, Maxson K, Mera R, Singh G. Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *The American journal of physiology* 1995;269:L791-9.

117.van Winkle LS, Buckpitt AR, Nishio SJ, Isaac JM, Plopper CG. Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *The American journal of physiology* 1995;269:L800-18.

118.Guha A, Vasconcelos M, Cai Y, Yoneda M, Hinds A, Qian J, Li G, Dickel L, Johnson JE, Kimura S, Guo J, McMahon J, McMahon AP, Cardoso WV. Neuroepithelial body microenvironment is a niche for a distinct subset of Clara-like precursors in the developing airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:12592-7.

119.Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *The American journal of pathology* 2002;161:173-82.

120.Nolen-Walston RD, Kim CF, Mazan MR, Ingenito EP, Gruntman AM, Tsai L, Boston R, Woolfenden AE, Jacks T, Hoffman AM. Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2008;294:L1158-65.

121. Yang Y, Iwanaga K, Raso MG, Wislez M, Hanna AE, Wieder ED, Molldrem JJ, Wistuba II, Powis G, Demayo FJ, Kim CF, Kurie JM. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates bronchioalveolar stem cell expansion in mouse models of oncogenic K-ras-induced lung cancer. *PLoS ONE* 2008;3:e2220.
122. Teisanu RM, Lagasse E, Whitesides JF, Stripp BR. Prospective isolation of bronchiolar stem cells based upon immunophenotypic and autofluorescence characteristics. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009;27:612-22.
123. Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, Stripp BR. Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:9286-91.
124. Bustos ML, Mura M, Hwang D, Ludkovski O, Wong AP, Arm, Keating A, Keating, Waddell TK. Depletion of Bone Marrow CCSP-Expressing Cells Delays Airway Regeneration. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2014;doi:10.1038/mt.2014.223.
125. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N, Singh G. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:348-54.
126. Krishnan RS, Daniel JC Jr. "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science (New York, N.Y.)* 1967;158:490-2.
127. Beier HM. Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochimica et biophysica acta* 1968;160:289-91.
128. Singh G, Katyal SL, Gottron SA. Antigenic, molecular and functional heterogeneity of Clara cell secretory proteins in the rat. *Biochimica et biophysica acta* 1985;829:156-63.
129. Umland TC, Swaminathan S, Furey W, Singh G, Pletcher J, Sax M. Refined structure of rat Clara cell 17 kDa protein at 3.0 Å resolution. *Journal of molecular biology* 1992;224:441-8.
130. Bernard A, Dumont X, Roels H, Lauwerys R, Dierynck I, de Ley M, Stroobant V, de Hoffmann E. The molecular mass and concentrations of protein 1 or Clara cell

protein in biological fluids: a reappraisal. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1993;223:189-91.

131.Peri A, Cowan BD, Bhartiya D, Miele L, Nieman LK, Nwaeze IO, Mukherjee AB. Expression of Clara cell 10-kD gene in the human endometrium and its relationship to ovarian menstrual cycle. *DNA and cell biology* 1994;13:495-503.

132.Peri A, Cordella-Miele E, Miele L, Mukherjee AB. Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10-kD protein, a phospholipase A2-inhibitory protein. *The Journal of clinical investigation* 1993;92:2099-109.

133.Rauch M, Loosfelt H, Philibert D, Milgrom E. Mechanism of action of an antiprogestosterone, RU486, in the rabbit endometrium. Effects of RU486 on the progesterone receptor and on the expression of the uteroglobin gene. *European journal of biochemistry / FEBS* 1985;148:213-8.

134.Shijubo N, Kawabata I, Sato N, Itoh Y. Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/ uteroglobin (secretoglobin 1A1). *Current pharmaceutical design* 2003;9:1139-49.

135.Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;159:646-78.

136.Hermans C, Aly O, Nyberg BI, Peterson C, Bernard A. Determinants of Clara cell protein (CC16) concentration in serum: a reassessment with two different immunoassays. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1998;272:101-10.

137.Bernard A, March FX, Marchandise FX, Depelchin S, Lauwerys R, Sibille Y. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *The European respiratory journal* 1992;5:1231-8.

138.Burmeister R, Boe IM, Nykjaer A, Jacobsen C, Moestrup SK, Verroust P, Christensen EI, Lund J, Willnow TE. A two-receptor pathway for catabolism of Clara cell secretory protein in the kidney. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:13295-301.

- 139.Helleday R, Segerstedt B, Forsberg B, Mudway I, Nordberg G, Bernard A, Blomberg A. Exploring the time dependence of serum clara cell protein as a biomarker of pulmonary injury in humans. *Chest* 2006;130:672-5.
- 140.Buehner M, Beato M. Crystallization and preliminary crystallographic data of rabbit uteroglobin. *Journal of molecular biology* 1978;120:337-41.
- 141.Ponstingl H, Nieto A, Beato M. Amino acid sequence of progesterone-induced rabbit uteroglobin. *Biochemistry* 1978;17:3908-12.
- 142.Popp RA, Foresman KR, Wise LD, Daniel JC Jr. Amino acid sequence of a progesterone-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978;75:5516-9.
- 143.Callebaut I, Poupon A, Bally R, Demaret JP, Housset D, Delettré J, Hossenlopp P, Moron JP. The uteroglobin fold. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:90-112.
- 144.Pattabiraman N, Matthews JH, Ward KB, Mantile-Selvaggi G, Miele L, Mukherjee AB. Crystal structure analysis of recombinant human uteroglobin and molecular modeling of ligand binding. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:113-27.
- 145.Beato M. Binding of steroids to uteroglobin. *Journal of steroid biochemistry* 1976;7:327-34.
- 146.Dunkel R, Vriend G, Beato M, Suske G. Progesterone binding to uteroglobin: two alternative orientations of the ligand. *Protein engineering* 1995;8:71-9.
- 147.Gillner M, Lund J, Cambillau C, Alex M, Alexandersson M, ersson, Hurtig U, Bergman A, Klasson-Wehler E, Gustafsson JA. The binding of methylsulfonyl-polychloro-biphenyls to uteroglobin. *Journal of steroid biochemistry* 1988;31:27-33.
- 148.Stripp BR, Lund J, Mango GW, Doyen KC, Johnston C, Hultenby K, Nord M, Whitsett JA. Clara cell secretory protein: a determinant of PCB bioaccumulation in mammals. *The American journal of physiology* 1996;271:L656-64.
- 149.de Haro MSL, Martínez MP, García C, Nieto A. Binding of retinoids to uteroglobin. *FEBS letters* 1994;349:249-51.

- 150.Mandal AK. Uteroglobin Represses Allergen-induced Inflammatory Response by Blocking PGD2 Receptor-mediated Functions. *Journal of Experimental Medicine* 2004;199:1317-1330.
- 151.Mandal AK, Ray R, Zhang Z, Chowdhury B, Pattabiraman N, Mukherjee AB. Uteroglobin inhibits prostaglandin F2alpha receptor-mediated expression of genes critical for the production of pro-inflammatory lipid mediators. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:32897-904.
- 152.Arnemann J, Heins B, Beato M. Purification and properties of rabbit uterus preuteroglobin mRNA. *Nucleic acids research* 1977;4:4023-36.
- 153.Chandra T, ra, Bullock DW, Woo SL. Hormonally regulated mammalian gene expression: steady-state level and nucleotide sequence of rabbit uteroglobin mRNA. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)* 1981;1:19-26.
- 154.Snead R, Day L, Ch T, Chandra T, ra, Mace M Jr, Bullock DW, Woo SL. Mosaic structure and mRNA precursors of uteroglobin, a hormone-regulated mammalian gene. *The Journal of biological chemistry* 1981;256:11911-6.
- 155.Wolf M, Klug J, Hackenberg R, Gessler M, Grzeschik KH, Beato M, Suske G. Human CC10, the homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning, chromosomal localization and expression in endometrial cell lines. *Human molecular genetics* 1992;1:371-8.
- 156.Hay JG, Danel C, Chu CS, Crystal RG. Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease. *The American journal of physiology* 1995;268:L565-75.
- 157.Zhang Z, Zimonjic DB, Popescu NC, Wang N, Gerhard DS, Stone EM, Arbour NC, de Vries HG, Scheffer H, Gerritsen J, Colle'e JM, Kate ten LP, Mukherjee AB. Human uteroglobin gene: structure, subchromosomal localization, and polymorphism. *DNA and cell biology* 1997;16:73-83.
- 158.Stripp BR, Huffman JA, Bohinski RJ. Structure and regulation of the murine Clara cell secretory protein gene. *Genomics* 1994;20:27-35.
- 159.Cassel TN, Berg T, Suske G, Nord M. Synergistic transactivation of the differentiation-dependent lung gene Clara cell secretory protein (secretoglobin 1a1) by

the basic region leucine zipper factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and the homeodomain factor Nkx2.1/thyroid transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:36970-7.

160.Nord M, Cassel TN, Braun H, Suske G. Regulation of the Clara cell secretory protein/uteroglobin promoter in lung. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:154-65.

161.Cassel TN, Suske G, Nord M. C/EBP alpha and TTF-1 synergistically transactivate the Clara cell secretory protein gene. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:300-2.

162.Giannopoulos G. A specific glucocorticoid binding macromolecule of rabbit uterine cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1973;54:600-6.

163.Lombardero M, Nieto A. Glucocorticoid and developmental regulation of uteroglobin synthesis in rabbit lung. *The Biochemical journal* 1981;200:487-94.

164.Bingle CD, Hackett BP, Moxley M, Longmore W, Gitlin JD. Role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha and hepatocyte nuclear factor-3 beta in Clara cell secretory protein gene expression in the bronchiolar epithelium. *The Biochemical journal* 1995;308 (Pt 1):197-202.

165.Srisodsai A, Kurotani R, Chiba Y, Sheikh F, Young HA, Donnelly RP, Kimura S. Interleukin-10 induces uteroglobin-related protein (UGRP) 1 gene expression in lung epithelial cells through homeodomain transcription factor T/EBP/NKX2.1. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:54358-68.

166.Buro-Auriemma LJ, Salit J, Hackett NR, Walters MS, Strulovici-Barel Y, Staudt MR, Fuller J, Mahmoud M, Stevenson CS, Hilton H, Ho MWY, Crystal RG. Cigarette smoking induces small airway epithelial epigenetic changes with corresponding modulation of gene expression. *Human molecular genetics* 2013;22:4726-38.

167.Ku M, Sun H, Lu K, Sheu J, Lee H, Yang S, Lue K. The CC16 A38G polymorphism is associated with the development of asthma in children with allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2011;41:794-800.

- 168.Menegatti E, Nardacchione A, Alpa M, Agnes C, Rossi D, Chiara M, Modena V, Sena LM, Roccatello D. Polymorphism of the uteroglobin gene in systemic lupus erythematosus and IgA nephropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2002;82:543-6.
- 169.Ohchi T, Shijubo N, Kawabata I, Ichimiya S, Inomata S, Yamaguchi A, Umemori Y, Itoh Y, Abe S, Hiraga Y, Sato N. Polymorphism of Clara cell 10-kD protein gene of sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;169:180-6.
- 170.Frerking I, Sengler C, Günther A, Walmrath H, Stevens P, Witt H, Landt O, Pison U, Nickel R. Evaluation of the -26G>A CC16 polymorphism in acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 2005;33:2404-6.
- 171.Bourdin A, Mifsud NA, Chanez B, McLean C, Chanez P, Snell G, Kotsimbos TC. Donor Clara Cell Secretory Protein Polymorphism is a Risk Factor for Bronchiolitis Obliterans Syndrome After Lung Transplantation. *Transplantation Journal* 2012;94:652-658.
- 172.Kim DK, Cho MH, Hersh CP, Lomas DA, Miller BE, Kong X, Bakke P, Gulsvik A, Agustí A, Wouters E, Celli B, Coxson H, Vestbo J, MacNee W, Yates JC, Rennard S, Litonjua A, Qiu W, Beaty TH, Crapo JD, Riley JH, Tal-Singer R, Silverman EK. Genome-wide association analysis of blood biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012;186:1238-47.
- 173.Petersen H, Leng S, Belinsky SA, Miller BE, Tal-Singer R, Owen CA, Celli B, Tesfaigzi Y. Low plasma CC16 levels in smokers are associated with a higher risk for chronic bronchitis. *The European respiratory journal* 2015;46:1501-3.
- 174.Stripp BR, Reynolds SD, Boe I, Lund J, Power JHT, Coppens JT, Wong V, Reynolds PR, Plopper CG. Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2002;27:170-8.
- 175.Zhang Z, Kundu GC, Yuan CJ, Ward JM, Lee EJ, DeMayo F, Westphal H, Mukherjee AB. Severe fibronectin-deposit renal glomerular disease in mice lacking uteroglobin. *Science (New York, N.Y.)* 1997;276:1408-12.

176. Johnston CJ, Mango GW, Finkelstein JN, Stripp BR. Altered pulmonary response to hyperoxia in Clara cell secretory protein deficient mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1997;17:147-55.
177. Johnston CJ, Finkelstein JN, Oberdörster G, Reynolds SD, Stripp BR. Clara cell secretory protein-deficient mice differ from wild-type mice in inflammatory chemokine expression to oxygen and ozone, but not to endotoxin. *Experimental lung research* 1999;25:7-21.
178. Mango GW, Johnston CJ, Reynolds SD, Finkelstein JN, Plopper CG, Stripp BR. Clara cell secretory protein deficiency increases oxidant stress response in conducting airways. *The American journal of physiology* 1998;275:L348-56.
179. Wang S, Rosenberger CL, Bao Y, Stark JM, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2003;171:1051-60.
180. Harrod KS, Mounday AD, Stripp BR, Whitsett JA. Clara cell secretory protein decreases lung inflammation after acute virus infection. *The American journal of physiology* 1998;275:L924-30.
181. Hayashida S, Harrod KS, Whitsett JA. Regulation and function of CCSP during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2000;279:L452-9.
182. Yoshikawa S, Miyahara T, Reynolds SD, Stripp BR, Anghelescu M, Eyal FG, Parker JC. Clara cell secretory protein and phospholipase A2 activity modulate acute ventilator-induced lung injury in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2005;98:1264-71.
183. Pilon AL. Rationale for the development of recombinant human CC10 as a therapeutic for inflammatory and fibrotic disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;923:280-99.
184. Park HY, Churg A, Wright JL, Li Y, Tam S, Man SFP, Tashkin D, Wise RA, Connett JE, Sin DD. Club cell protein 16 and disease progression in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2013;188:1413-9.

- 185.Laicho-Contreras ME, Polverino F, Gupta K, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, Divo M, Ashfaq N, Petersen H, Stripp B, Pilon AL, Tesfaigzi Y, Celli BR, Owen CA. Protective role for club cell secretory protein-16 (CC16) in the development of COPD. *The European respiratory journal* 2015;45:1544-56.
- 186.Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzaki H, Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *The European respiratory journal* 2014;44:1002-10.
- 187.Vasanthakumar G, Manjunath R, Mukherjee AB, Warabi H, Schiffmann E. Inhibition of phagocyte chemotaxis by uteroglobin, an inhibitor of blastocyst rejection. *Biochemical pharmacology* 1988;37:389-94.
- 188.Katavolos P, Ackerley CA, Clark ME, Bienzle D. Clara cell secretory protein increases phagocytic and decreases oxidative activity of neutrophils. *Veterinary immunology and immunopathology* 2011;139:1-9.
- 189.Geerts L, Jorens PG, Willems J, de Ley M, Slegers H. Natural inhibitors of neutrophil function in acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 2001;29:1920-4.
- 190.Le Yingying, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in immunology* 2002;23:541-8.
- 191.Ray R, Zhang Z, Lee Y, Gao J, Mukherjee AB. Uteroglobin suppresses allergen-induced TH2 differentiation by down-regulating the expression of serum amyloid A and SOCS-3 genes. *FEBS letters* 2006;580:6022-6.
- 192.Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee AB. Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. *Endocrine Reviews* 1987;8:474-90.
- 193.Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, Mukherjee AB. Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:20343-51.
- 194.Andersson O, Nordlund-Möller L, Barnes HJ, Lund J. Heterologous expression of human uteroglobin/polychlorinated biphenyl-binding protein. Determination of ligand

binding parameters and mechanism of phospholipase A2 inhibition in vitro. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:19081-7.

195.Umland TC, Swaminathan S, Singh G, Warty V, Furey W, Pletcher J, Sax M. Structure of a human Clara cell phospholipid-binding protein-ligand complex at 1.9 Å resolution. *Nature structural biology* 1994;1:538-45.

196.Long X, Hu S, Wang N, Zhen H, Cui Y, Liu Z. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF-κB Activity in Airway Epithelial Cells. In: Ryffel B, translator. *PLoS ONE* 2012;7:e35960.

197.Yoon JM, Lim J, Yoo C, Lee C, Bang Y, Han SK, Shim Y, Kim YW. Adenovirus-uteroglobin suppresses COX-2 expression via inhibition of NF-kappaB activity in lung cancer cells. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2005;48:201-9.

198.Sandall TE, all. The later effects of gas poisoning. *The Lancet* 1922;

199.JL H, WC K. Permanent pulmonary effects of gas in warfare. *American Review of Tuberculosis* 1922;

200.Razavi S, Ghanei M, Salamati P, Safiabadi M. Long-term effects of mustard gas on respiratory system of Iranian veterans after Iraq-Iran war: a review. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi / Chinese Medical Association* 2013;16:163-8.

201.Akhavan A, Ajalloueyan M, Ghanei M, Moharamzad Y. Late laryngeal findings in sulfur mustard poisoning. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 2009;47:142-4.

202.Siganaki M, Koutsopoulos AV, Neofytou E, Vlachaki E, Psarrou M, Soultzis N, Pentilas N, Schiza S, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Deregulation of apoptosis mediators' p53 and bcl2 in lung tissue of COPD patients. *Respiratory Research* 2010;11:46.

203.Tiwari N, Marudamuthu AS, Tsukasaki Y, Ikebe M, Fu J, Shetty S. p53- and PAI-1-mediated induction of C-X-C chemokines and CXCR2: Importance in Pulmonary Inflammation due to Cigarette Smoke exposure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2016;ajplung.00290.2015.doi:10.1152/ajplung.00290.2015.

204.Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EFM, Wedzicha

JA. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2010;363:1128-38.

205.Gras D, Bourdin A, Vachier I, de Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012;129:1259-1266.e1.

206.Wyatt I, Soames AR, Clay MF, Smith LL. The accumulation and localisation of putrescine, spermidine, spermine and paraquat in the rat lung. In vitro and in vivo studies. *Biochemical pharmacology* 1988;37:1909-18.

207.Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature immunology* 2015;16:27-35.

208.Davies DE. Epithelial barrier function and immunity in asthma. *Annals of the American Thoracic Society* 2014;11 Suppl 5:S244-51.

209.Stokes AB, Kieninger E, Schögler A, Kopf BS, Casaulta C, Geiser T, Regamey N, Alves MP. Comparison of three different brushing techniques to isolate and culture primary nasal epithelial cells from human subjects. *Experimental lung research* 2014;40:327-32.

210.Prytherch Z, Job C, Marshall H, Oreffo V, Foster M, Bérubé K. Tissue-Specific stem cell differentiation in an in vitro airway model. *Macromolecular bioscience* 2011;11:1467-77.

211.Ramirez RD, Sheridan S, Girard L, Sato M, Kim Y, Pollack J, Peyton M, Zou Y, Kurie JM, Dimaio JM, Milchgrub S, Smith AL, Souza RF, Gilbey L, Zhang X, G K, Gandia K, ia, Vaughan MB, Wright WE, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD. Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer research* 2004;64:9027-34.

212.Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 1988;24:420-8.

213.Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *The American journal of physiology* 1992;262:L713-24.

214. Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Ben Forbes. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharmaceutical research* 2006;23:1482-90.
215. Ben Forbes, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2005;60:193-205.
216. Wu R, Sato GH, Whitcutt MJ. Developing differentiated epithelial cell cultures: airway epithelial cells. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 1986;6:580-90.
217. Fulcher ML, Gabriel S, Burns KA, Yankaskas JR, R SH, Randell SH, ell. Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods in molecular medicine* 2005;107:183-206.
218. Aufderheide M, Förster C, Beschay M, Branscheid D, Emura M. A new computer-controlled air-liquid interface cultivation system for the generation of differentiated cell cultures of the airway epithelium. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 2016;68:77-87.
219. Ross AJ, Dailey LA, Brighton LE, Devlin RB. Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007;37:169-85.
220. Shijubo N, Itoh Y, Shigehara K, Yamaguchi T, Itoh K, Shibuya Y, Takahashi R, Ohchi T, Ohmichi M, Hiraga Y, Abe S. Association of Clara cell 10-kDa protein, spontaneous regression and sarcoidosis. *The European respiratory journal* 2000;16:414-9.
221. Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, Chanez P, Bourdin A. Supplementing defect in Club Cell Secretory Protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* 2014;doi:10.1378/chest.14-1174.
222. Johansson S, Andersson K, Wennergren G, Wennerås C, Rudin A. CC16 inhibits the migration of eosinophils towards the formyl peptide fMLF but not towards PGD₂. *Inflammation* 2009;32:65-9.

223.Liu Y, Yu H, Wang N, Zhang Y, Huang S, Cui Y, Liu Z. Clara cell 10-kDa protein inhibits T(H)17 responses through modulating dendritic cells in the setting of allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013;131:387-94.e1-12.

Titre : « Rôle des cellules Club et de CCSP dans la BPCO »

Mots clés : Cellules Club, CCSP (CC10, SCGB1A1), BPCO

La protéine CCSP (« Club Cell Secretory Protein »), produite par les cellules Club au niveau de l'épithélium respiratoire, se retrouve déficiente chez les patients atteints de Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). Le but de ce travail était de comprendre la régulation et les différents rôles de la protéine CCSP afin d'en évaluer son potentiel intérêt thérapeutique.

Nous avons dans un premier temps observé les effets du polymorphisme connu de CCSP au niveau de sa région promotrice, la mutation G38A, sur la transcription même du gène. Nous avons constaté *in vivo* dans une étude clinique prospective sur 1 an comprenant 66 patients souffrant de BPCO, et confirmé *in vitro* dans un modèle de cellules BEAS-2B transfectées, que la fumée de cigarette était un répresseur de la transcription de CCSP et que ce phénomène était amplifié par la présence de la mutation G38A. De plus, *in vitro*, certains facteurs de transcription tels que p53 et Nkx2.1, ainsi que les lipopolysaccharides, affectaient l'efficacité du promoteur de CCSP.

Ensuite, nous avons caractérisé les cellules qui sécrètent cette protéine dans un modèle *ex vivo* de culture en interface air-liquide de cellules primaires épithéliales bronchiques. Nous avons observé par microscopie électronique à balayage des cellules en dôme, forme caractéristique des cellules Club, et par microscopie électronique à transmission des cellules contenant des granules de sécrétion contenant la protéine CCSP. Nous avons constaté par immunofluorescence que les cellules marquées CCSP+ étaient également MUC5AC+ (marqueur de cellules à mucus), P63+ (marqueur de cellules basales) ou encore KI-67+ (marqueur de prolifération). Nous suggérons donc que les cellules Club sont des cellules progénitrices, permettant ainsi la régénération de l'épithélium bronchique.

Par ailleurs, nous avons évalué l'implication de la protéine CCSP dans le recrutement des neutrophiles, cellules inflammatoires prépondérantes dans la BPCO. Une étude pharmacologique a d'abord permis d'évaluer les effets de CCSP sur des neutrophiles de sujets témoins. Le déplacement des neutrophiles, stimulé par l'IL8 ou le fMLP (tous deux puissants agents chemoattractants), était inhibé par CCSP. Puis, par une étude *in vitro*, nous avons déterminé la modulation du sécrétome de l'épithélium bronchique par CCSP. Lorsque les sécrétions d'épithélia reconstitués *ex vivo* à partir de biopsies de fumeur et de BPCO étaient mis en présence de neutrophiles, un chimiotactisme exagéré des neutrophiles étaient constaté. Lorsque les épithélia étaient traités avec la protéine CCSP, à l'état de base ou stimulés par de la fumée de cigarette, ce chimiotactisme exagéré était alors diminué.

Enfin, dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à la régulation de la protéine, dans un modèle de culture cellulaire NCI-H292, lignée de cellules bronchiques cultivées en monocouche. Nous avons supplémenté ces cellules en CCSP exogène afin d'analyser les variations du profil protéomique des sécrétions engendrées (méthode LC-MS/MS). De façon générale, il s'avérait que la supplémentation en CCSP permettrait une restauration de la « machinerie » du protéasome avec une augmentation des protéines de la famille des tubulines.

Ce travail de thèse a démontré que la protéine CCSP était un acteur potentiel de la physiopathologie de la BPCO. L'étude de sa régulation a montré que la synthèse de CCSP était effectivement diminuée dans la BPCO. Ainsi, une supplémentation en CCSP pourrait être une piste thérapeutique.

Title: « Club cells and CCSP in COPD »

Keywords: Club cells, CCSP (CC10, SCGB1A1), COPD

A defective in Club Cell Secretory Protein (CCSP) produced by nonciliated Club cells was observed in COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) airways. Our aim was to understand CCSP biological mechanisms of action and its dysregulation in COPD and whether it might be a therapeutic axis in COPD.

First, the influence of the CCSP G38A polymorphism on CCSP transcription levels and its regulatory mechanisms were analyzed. Our *in vivo* study conducted in a 1 year prospective cohort consisting of 66 COPD patients confirmed that circulating CCSP levels were associated with smoking. Moreover, the CCSP G38A polymorphism and the smoking status significantly repressed CCSP serum levels. Our *in vitro* study conducted in BEAS-2B transfected cells supported those findings as CSE repressed the CCSP transcription of the A carrying transfected cells more intensely than the wild type cells. Noteworthy, LPS, Nkx2.1 and p53 transcription factors also modulated the CCSP promoter efficiency *in vitro*.

Furthermore, CCSP producing cells were characterized in an air-liquid interface (ALI) culture model of bronchial epithelial cells. Transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and confocal microscopy confirmed the pseudostratified organization of the reconstituted epithelium. Evidences of full differentiation were identified and labeled with MUC5AC (goblet cells), tubulinIV (ciliated cells), P63 (basal cells) and CCSP (club cells). Moreover, the *ex vivo* reconstituted COPD epithelium released higher levels of IL8 and MUC5AC. Ki-67 and collocalizing antibodies with CCSP argued for an accessory stem cell and a transitory differentiating roles for CCSP+ cells.

Then, we aimed to investigate whether exaggerated airway neutrophilia was driven by the CCSP-defective COPD airway epithelium. CCSP action on healthy neutrophil chemotaxis was evaluated in a pharmacological study demonstrating that CCSP directly inhibited neutrophil chemotaxis induced by fMLP and IL8. Then, in an *in vitro* study, ALI-reconstituted COPD airway epithelium in a clean environment promoted an exaggerated neutrophilic chemotaxis compared to smokers and controls at steady state. Treating the airway epithelium with exogenous CCSP prevented baseline and CSE-induced neutrophil chemotaxis.

Finally, CCSP regulation was studied in NCI-H292 cells, a human pulmonary cell line. The cells were supplemented with CCSP. Proteomic profile (LC-MS/MS method) of the bronchial epithelium in response to CCSP treatment demonstrated that the proteasome machinery and the tubulin family members were upregulated.

This work supported the potential implication of CCSP in the pathophysiology of COPD. CCSP was confirmatively defective in COPD patients, therefore, restoring physiological concentrations of CCSP by exogenous supplementation may be a therapeutic perspective.