



HAL
open science

Caractérisation de la voie Hedgehog dans la différenciation de l'épithélium des voies aériennes et altération dans la BPCO

Randa Belgacemi

► **To cite this version:**

Randa Belgacemi. Caractérisation de la voie Hedgehog dans la différenciation de l'épithélium des voies aériennes et altération dans la BPCO. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université de Reims Champagne-Ardenne, 2020. Français. NNT: . tel-03155908

HAL Id: tel-03155908

<https://hal.univ-reims.fr/tel-03155908v1>

Submitted on 2 Mar 2021

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.

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : *Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie*

Présentée et soutenue publiquement par

Randa BELGACEMI

Le 2 juillet 2020

CARACTERISATION DE LA VOIE HEDGEHOG DANS LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM DES VOIES AERIENNES ET ALTERATION DANS LA BPCO

Thèse dirigée par le **Professeur Gaëtan Deslée, Université de Reims Champagne-Ardenne**

JURY

M. Gaëtan DESLEE,	Professeur,	Université de Reims, France,	Directeur de thèse
M. Valérian DORMOY,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims, France,	Co-encadrant
Mme Nathalie SPASSKY,	Directeur de Recherche,	Ecole Normale Supérieure, Paris, France,	Rapporteur
Mme Denise AL ALAM,	Professeur,	Université de Californie du sud, Etats-Unis,	Rapporteur
Mme Marina PRETOLANI,	Directeur de Recherche,	Université Paris Diderot, France,	Examineur
M. Thierry MASSFELDER,	Directeur de Recherche,	Université de Strasbourg, France,	Examineur



À Sidou et Mima,

REMERCIEMENTS

Je commence ces remerciements par le Professeur Myriam Polette, directrice de l'unité Inserm UMR-S 1250, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire dès mon stage de master 2 et qui a m'a donné l'opportunité d'y poursuivre en thèse. Je la remercie pour ces précieux conseils et sa pédagogie tout au long de ces années.

Je remercie le Docteur Nathalie Spassky de l'Ecole Nationale Supérieure pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je tiens aussi à remercier le Professeur Denise Al Alam de l'Université de Californie du Sud d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour une mobilité doctorale mémorable. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance, merci également au Docteur Soula Danopoulos de m'avoir assistée et appris beaucoup de chose durant cette mobilité.

Un grand merci aussi au Docteurs Marina Pretolani de l'Université Paris Diderot et au Docteur Thierry Massfelder de l'Université de Strasbourg de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs, merci pour vos précieux conseils et vos recommandations qui m'ont permis de faire avancer mon travail.

Ce travail et ma thèse n'auraient jamais été possible sans mon directeur de thèse le Professeur Gaëtan Deslée, merci pour votre présence et votre implication dans ce projet de thèse.

Un remerciement très particulier à mon co-encadrant, le Docteur Valérian Dormoy sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, je n'aurais jamais assez de mots pour te dire merci. Je souhaite à tous les étudiants d'avoir la chance d'avoir un encadrant de thèse comme toi. Merci de m'avoir appris la rigueur du travail mais aussi le plaisir de la science, je n'oublierai jamais tes conseils, ta disponibilité, ta gentillesse et nos discussions à ne pas en finir. Merci pour tout ! J'espère avoir la chance de pouvoir continuer à collaborer avec toi dans de futurs projets et pouvoir t'envoyer mes textes d'anglais à corriger. Un grand merci au soutien incontestable de Lili et la bonne humeur de la princesse Mayloé !

Merci au Docteur Emilie Luzkca et à la future Docteur Elodie Serbine sans qui je n'aurais jamais tenu jusque-là ! Merci pour votre bonne humeur, merci pour être devenue plus que des collègues, des amies ! Merci de m'avoir épaulée, écoutée, conseillée, fait rire et parfois même fait manger ! Merci aux Nico de leur compréhension face à cette Randa très prenante, merci d'avoir fait de moi un membre de votre famille ! Merci au canapé d'Emilie et à la grande table d'Elodie ! Merci à notre nouvelle puce Théa de nous avoir égayée cette année 2020. Une pensée très particulière pour le Docteur Ahlem Boussenna qui me manque beaucoup et que j'ai eu la chance et l'honneur de côtoyer, tu resteras à jamais dans nos cœurs.

Je tiens aussi à féliciter et remercier le Docteur Jordan Da Silva, mon partenaire de salle western, toujours présent et à l'écoute, merci pour ces moments de danses et de chants dignes d'un télécrochet ! Je te souhaite le meilleur pour l'avenir et plus encore. Merci aussi au Docteur Deborah Neyrinck-Leglantier et au Docteur Amina Jouida pour leur aide et leur collaboration.

Alex, mon petit, Alex Abreder, merci pour tes attentions et ton humour, merci de ta présence dans ce laboratoire, merci de demander si je vais bien 10 fois dans la journée car tu t'inquiètes pour moi comme le faisait Olivier Bernardini pour qui j'ai une grande pensée et que je remercie également ! Merci à vous de nous permettre de travailler dans les meilleures conditions ! Merci de faire partie de mon petit cercle d'amis exceptionnels !

Un grand merci aussi à ma colocataire de bureau Zania Diabasana et à Antony Hoarau pour leur gentillesse, leur soutien durant mes coups de gueules et d'accepter mes gâteaux quand j'en propose ! Merci pour toutes nos discussions scientifiques qui m'ont permis d'avancer quand ça n'avancait plus ! Je souhaite aussi la bienvenue à Théophile Ponchel à qui je souhaite le meilleur pour sa thèse.

Un grand merci à tous les autres membres de l'unité Inserm U1250, merci aux Docteurs Christelle Coraux, Céline Charlier, Veronique Dalstein, Audrey Brisebarre, Arnaud Bonnet, Jean-Marie Tournier pour leurs conseils et leur aide au quotidien. Petit remerciement spécial au Docteur Béatrice Nawrocki-Raby sans qui je ne serais peut-être pas là aujourd'hui, merci d'avoir été une directrice de stage incontestable, merci pour tes conseils avisés et pour ton aide scientifique, merci de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi. Je remercie également les Docteurs Jérôme Cutrona et Antoine Joncquet pour leur aide précieuse en analyse d'image et notamment pour la création des macros et des plug-ins. Merci également au Docteur Julien Ancel pour son aide sur les analyses statistiques et pour ses nombreux conseils cliniques.

Un grand merci à Adeline Germain et à Nathalie Lalun pour leurs enseignements, leur aide, leur patience et leur gentillesse. Merci à Claire Kileztky et Annie Chavériat pour leur très grande patience, leur aide au quotidien et leur disponibilité, merci de nous faciliter tous les jours le travail !

J'ai une pensée particulière à chacun de mes étudiants stagiaires sans qui je n'aurai jamais autant avancé, Pauline, Cléopée, Julie, Julien, Geoffrey, Léa, Marianne, Ludmila et Camille. Un remerciement spécial pour Margot Vieubled, ma stagiaire d'amour qui est devenue une petite sœur, merci d'avoir été là et d'avoir fait de ces 4 mois de présence un véritable moment de joie ! Je remercie aussi le Docteur Béatrice Salman pour son soutien, sa présence et son écoute, merci d'être toujours présente !

Un grand merci à mes nanafettes et à leur soutien indéfectible, merci à Nadia Lounis, Océane Devaux, Elodie Monnerau, Stéphanie Vriet et à Farida Legroux, merci d'avoir été des mamans pour moi et d'avoir pris soin de moi !

Pour finir, je tiens à remercier sincèrement les personnes qui me sont chères. Merci à ma famille pour leur soutien. Sans vous, tout cela n'aurait pas été possible et je vous en serai éternellement reconnaissante. Vous avez une place particulière dans ma vie, sans vous je ne serais jamais arrivée là. Merci Mama, merci Papa, merci Asma pour m'avoir supportée et nourri toutes ces années sans jamais rechigner, merci à ma sœur Nani sans qui je ne pouvais me ressourcer, merci à mes frères et sœurs, mes tantes et à mes oncles, à chacun de mes cousins et cousines avec une spéciale dédicace à l'Alpha. Merci à toi Alison de m'avoir soutenue et écoutée, merci d'être une sœur pour moi. Je vous remercie infiniment pour votre soutien, vos encouragements et votre présence au quotidien. Merci du fond du cœur.

RÉSUMÉ

La voie Hedgehog (HH) est une voie de signalisation cruciale pour l'organogenèse et l'homéostasie. Etant donnée son implication dans la quiescence et la réparation pulmonaire ainsi que son altération dans des maladies respiratoires chroniques, nous avons exploré la présence et l'impact de la voie HH durant la différenciation de l'épithélium des voies aériennes et son incidence sur la genèse du remodelage épithélial caractéristique de la BPCO.

Nous avons mis en évidence une corrélation entre l'expression des acteurs de la voie HH et la différenciation *in vitro* ainsi qu'une sécrétion du ligand principal de la voie, Sonic Hedgehog (Shh), par les cellules basales. *In vitro*, l'inhibition de la voie induit un remodelage caractéristique de la BPCO dont une réduction des cellules ciliées. Une altération de la signalisation HH chez les patients BPCO a été observée, particulièrement concernant l'expression et la localisation du facteur de transcription Gli2. Enfin, par une étude translationnelle, nous avons démontré la possibilité d'évaluer l'expression de la voie HH en routine clinique. Les données recueillies ont confirmé l'altération de la voie HH chez les patients BPCO en lien avec l'expression transcriptomique et protéomique de Gli2 associée à une baisse de la sécrétion du ligand Shh.

Cette étude montre l'importance de la voie HH dans la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et identifie pour la première fois une altération de cette voie chez les patients BPCO. La compréhension des mécanismes moléculaires associés à la pathogenèse en lien avec la voie HH ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette pathologie sans traitement.

Mots clés : Voie Hedgehog, Plasticité épithéliale, Poumon, Bronchopneumopathie Chronique Obstructive, Différenciation.

ABSTRACT

Hedgehog (HH) pathway is crucial for organogenesis and homeostasis. Since HH signaling is involved in pulmonary quiescence and repair, and altered in chronic lung diseases, we investigated HH signalling during airway epithelial cell differentiation and its incidence on Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)-associated remodeling.

In vitro we demonstrated a correlation between HH pathway actors expression and differentiation. We identified basal cells as the source of the main ligand, Sonic Hedgehog (Shh). Preventing the ligand-induced HH activation led to the establishment of a remodeled epithelium with reduced cilliogenesis. We also observed HH signalling alteration in COPD patients, especially a loss of Gli2 transcription factor expression and localization. Finally, we revealed the possibility to evaluate HH expression in clinical routine. Our collected data confirm HH pathway alteration in COPD patients in correlation with Gli2 transcriptomic and proteomic expression associated with a decrease of Shh ligand secretion.

This study highlights the importance of the HH pathway in airway epithelial cell differentiation and identifies for the first time an alteration of this pathway in COPD patient. Understanding the molecular mechanisms associated with HH pathway in pathogenesis would open the way to new therapeutic strategies in this disease lacking available treatments.

Key words: Hedgehog Pathway, Epithelial Cell Plasticity, Lung, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Differentiation.

Table des matières

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	12
ABRÉVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX	18
INTRODUCTION	19
Chapitre I : Le poumon	20
1. Généralités sur l'appareil respiratoire	21
1.1. Caractéristiques générales du poumon	22
1.2. Poumon et développement	22
1.2.1. Généralités.....	22
1.2.2. Les stades du développement pulmonaire.....	22
1.2.2.1. <i>Le stade embryonnaire</i>	23
1.2.2.2. <i>Le stade pseudoglandulaire</i>	23
1.2.2.3. <i>Le stade caniculaire</i>	24
1.2.2.4. <i>Le stade sacculaire</i>	24
1.2.2.5. <i>Le stade alvéolaire</i>	25
1.3. Voies de signalisation et développement pulmonaire	25
2. Aspect tissulaire et cellulaire	27
2.1. Généralités.....	27
2.2. Histologie des épithéliums pulmonaires	27
2.2.1. Les cellules basales	29
2.2.2. Les cellules intermédiaires	30
2.2.3. Les cellules multiciliées	31
2.2.4. Les cellules mucosécrétrices	32

2.2.5. Les cellules neuroendocrines.....	33
2.2.6. Les pneumocytes	33
2.2.7. Les ionocytes.....	34
2.3. Histologie du stroma pulmonaire	34
3. Fonction de l'appareil respiratoire	35
3.1. Barrière physique	35
3.2. Clairance mucociliaire.....	37
3.3. Conduction de l'air et respiration.....	39
Chapitre II : La bronchopneumopathie chronique obstructive	41
1. Définition.....	42
2. Epidémiologie	42
3. Symptômes, diagnostic et classification.....	44
3.1. Symptômes	44
3.2. Diagnostic.....	44
3.2.1. Par spirométrie (EFR)	44
3.2.2. Par radiographie	46
3.3. Classifications	46
3.3.1 GOLD (<i>Global Initiative for chronic obstructive Lung Disease</i>) : sévérité de l'obstruction bronchique (VEMS/CVF).....	46
3.3.2 Sévérité clinique et dyspnée.....	47
3.4. Exacerbations	48
4. Traitements	49
4.1. Etiologie	49
4.1.1. Prévention et sevrage du tabagisme	49
4.1.2. Expositions professionnelles et pollution.....	50
4.2. Médicaments	50
4.2.1. Bronchodilatateurs	50

4.2.2. Corticostéroïdes.....	51
4.2.3. Combinaison LABA/LAMA/CSI	52
4.2.4. Antibiothérapies	52
4.3. Traitements non médicamenteux.....	52
4.3.1. Chirurgies	53
4.3.1.1. <i>Chirurgies conventionnelles de la BPCO</i>	53
4.3.1.2. <i>Méthodes novatrices</i>	54
4.3.2. Oxygénothérapie	54
4.3.3. Exercices physiques et éducation thérapeutique	54
5. Facteurs de risques et physiopathologie	55
5.1. Facteurs de risques	55
5.1.1. <i>In utero</i>	55
5.1.2. Génétique	55
5.1.3. Tabagisme	56
5.1.4. Pollutions.....	58
5.1.5. Socio-économique.....	59
5.2. Physiopathologie de la BPCO	59
5.2.1. Inflammation chronique	60
5.2.1.1. <i>Cellules épithéliales et inflammation</i>	61
5.2.1.2. <i>Système immunitaire et inflammation</i>	61
5.2.2. Stress-oxydatif.....	62
5.2.3. Remodelage de l'épithélium.....	63
Chapitre III : La voie Hedgehog	65
1. Généralités	66
2. Acteurs de la voie Hedgehog et signalisation	66
2.1. Les ligands : synthèse, sécrétion et diffusion du morphogène	67

2.2.	Réception du signal	69
2.2.1.	Les récepteurs activateurs	69
2.2.1.1.	<i>Récepteur Patched-1</i>	69
2.2.1.2.	<i>Récepteur Smoothened</i>	69
2.2.2.	Les corécepteurs inhibiteurs	70
2.3.	Transduction du signal	71
2.4.	Cibles et effecteurs de la voie HH.....	72
3.	Voie Hedgehog et développement	72
3.1.	Organogenèse et morphogenèse	73
3.2.	Développement pulmonaire	73
4.	Homéostasie chez l'adulte	75
4.1.	Généralités.....	75
4.2.	Quiescence et réparation pulmonaire	75
5.	Pathologies associées à la voie Hedgehog	76
5.1.	Maladies congénitales	76
5.2.	Atteintes chez l'adulte	76
5.2.1.	Voie HH et oncogenèse.....	77
5.2.1.1.	<i>Les différents types de cancers</i>	77
5.2.1.2.	<i>Les inhibiteurs de la voie HH</i>	78
5.2.2.	Pathologies pulmonaires	78
5.2.2.1.	<i>Fibrose pulmonaire et asthme</i>	78
5.2.2.2.	<i>BPCO</i>	79
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	80
	MATERIELS ET METHODES	82
	1. Caractéristiques des patients et recrutement	83

1.1. Caractérisation clinique	83
1.2. Caractérisation scanographique.....	84
2. Echantillons biologiques	84
2.1. Fibroscopies bronchiques (Brossages et biopsies)	84
2.2. Lavages broncho-alvéolaires (LBA)	85
2.3. Polypes nasaux	85
2.4. Tissus pulmonaires	86
3. Culture cellulaire primaire	86
3.1. Différenciation de l'épithélium	86
3.2. Traitement des cellules et inhibitions de la voie Hedgehog.....	87
3.3. Culture des fibroscopies	88
4. Résistance transépithéliale	88
5. Immunoprécipitation	88
6. Analyses transcriptomiques	88
6.1. RT-qPCR.....	88
6.1.1. Extraction des ARNs.....	88
6.1.2 Transcription inverse.....	89
6.1.3. Polymérisation en chaine quantitative.....	89
6.1.4. Analyses des données.....	90
7. Analyses protéomiques	91
7.1. Western-blot.....	91
7.2. Extraction protéique fractionnée	92
7.3. ELISA et étude du ligand Shh.....	93
8. Immunofluorescence et analyse par microscopie	93
8.1. Marquage des coupes en paraffine	93
8.2. Marquage des coupes à froid et des <i>cytopins</i>	94
8.3. Immunomarquage des membranes d'inserts	94

8.4. Analyses par microscopie.....	95
8.4.1. Analyse des coupes FFPE et des coupes à froid	95
8.4.2. Analyse des cellules <i>cytopinées</i>	96
8.4.3. Analyse des immunomarquages sur membranes	96
9. Statistiques	96
RESULTATS	98
1. Etude la voie HH lors de la différenciation épithéliale et implication dans la BPCO	99
1.1. Publication.....	99
1.2. Résumé	100
2. Voie Hedgehog, potentiel biomarqueur de la BPCO	121
2.1. Publication.....	121
2.2. Résumé.....	122
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	155
1. Synthèse des travaux et discussion	156
2. Perspectives expérimentales	159
3. Conclusions	162
BIBLIOGRAPHIE	163

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques

Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD

Randa Belgacemi, Emilie Luczka, Julien Ancel, Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin, Adeline Germain, Nathalie Lalun, Phillipe Birembaut, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Gonzague Delepine, Myriam Polette, Gaëtan Deslée and Valérian Dormoy

Ebiomedicine, 2020, 51:102572

*

Sonic Hedgehog signalling as a potential endobronchial biomarker in COPD

Julien Ancel, Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Zania Diabasana, Sandra Dury, Maxime Dewolf, Arnaud Bonnomet, Nathalie Lalun, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée and Valérian Dormoy

Respiratory Research, 2020 [En révision]

*

Nicotinic receptors in the adult lung

Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Gonzague Delepine, Philippe Gosset, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée and Valérian Dormoy

Thorax, 2020 [Soumis]

Communications orales

Localisation des acteurs de la voie Hedgehog au sein de l'épithélium des voies aériennes dans la bronchopneumopathie chronique obstructive

Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Margot Vieubled, Christelle Coraux, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Carrefour Pathologie, Paris-France (Novembre 2018)

*

Chronic Obstructive Pulmonary Disease and ciliogenesis

Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Margot Vieubled, Christelle Coraux, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
French-German Lung Retreat, Paris-France (Septembre 2018)

*

Pathologies respiratoires inflammatoires chroniques et analyse de la ciliogenèse primaire

Randa Belgacemi,

Challenge de vulgarisation scientifique « Ma thèse en 180 secondes », Université de Reims Champagne-Ardenne, Finale régionale, CNRS Paris, Demi-finale nationale (Mars-Avril 2018)

Communications par voie d'affiche

Hedgehog pathway activation is altered in COPD patients

Randa Belgacemi, Julien Ancel, Jeanne-Marie Perotin, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
ERS International Congress, Madrid-Espagne (Octobre 2019)

*

Implication de la voie Hedgehog dans la BPCO

Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Margot Vieubled, Christelle Coraux, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Journée des jeunes chercheurs de la SFR CAP-Santé, Reims– France (Octobre 2018)

*

Implication de la voie Hedgehog dans la BPCO

Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Margot Vieubled, Christelle Coraux, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Journées de recherche respiratoire (J2R), Marseille - France (Octobre 2018)

*

Involvement of Hedgehog pathway in airway cell differentiation

Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Margot Vieubled, Christelle Coraux, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
ERS International Congress, Paris- France (Septembre 2018)

*

Implication de la voie Hedgehog dans la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes dans la BPCO

Randa Belgacemi, Jeanne-Marie Perotin, Margot Vieubled, Christelle Coraux, Emilie Luczka, Adeline Germain, Gonzague Delepine, Philippe Birembaut, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
1ère journée doctorale transfrontalière, Reims - France (Mars 2018)

ABRÉVIATIONS

A

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	Acide Ribonucléique

B

BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>

C

CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CHRN	<i>Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR)</i>
CKI	<i>Casein Kinase I</i>
CSI	Corticostéroïde inhalé
CVF	Capacité vitale forcé

D

DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DISP1	<i>Dispatched-1</i>
DLCO	Diffusion alvéolo-capillaire au monoxyde de carbone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique

E

ECBC	Examen cytobactériologique de crachats
EFR	Exploration fonctionnelle respiratoire
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

F

FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FT	Facteur de transcription

G

GEMC1	<i>Geminin Coiled-Coil Domain Containing</i>
GDS	Gaz du sang
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
GPC	Glypican
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>

H

HAS	Haute autorité de santé
HH	<i>Hedgehog</i>
HHIP	<i>Hedgehog Interacting Protein</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

I

IAL	Interface air-liquide
IFN	Interféron
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
IL	Interleukine
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

K

KRT	Kératine
------------	----------

L

LABA	<i>Long Acting β_2 Agonist</i>
LAMA	<i>Long Acting Muscarinic Antagonist</i>
LBA	Lavage Broncho-alvéolaire
LPC	Liquide Péri-ciliaire

M

mi-RNA	<i>Micro-RNA</i>
MMP	Métalloprotéinase
mMRC	<i>modified Medical Research Council</i>

O

OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

P

PA	Paquet-année
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PKA	Protéine kinase A
Pn-C	Pneumacult
PnI/II	Pneumocyte de type I/II
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PTCH1	<i>Patched-1</i>
PVDF	Polyvinylidene Difluoride

R

RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RIPA	<i>Radio Immuno-Precipitation Assay buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	<i>Region Of Interest</i>
RPM	<i>Revolution per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RTE	Résistance transépithéliale

S

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	<i>Smoothened</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSD	<i>Sterol Sensing Domain</i>
SUFU	<i>Suppressor of fused</i>
SVF	Sérum de Veau Fœtal

T

TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TVO	Trouble Ventilatoire Obstructif

V

VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
VEF	Volume Expiratoire Forcé

Z

ZO	<i>Zonula Occludens</i>
-----------	-------------------------

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation des voies aériennes inférieures chez l'Homme.....	21
Figure 2 : Stade de développement pulmonaire chez l'Homme.....	23
Figure 3 : Morphologie des voies aériennes inférieures humaine adulte.....	28
Figure 4 : Modèle de différenciation pour la mise en place d'un épithélium respiratoire fonctionnel à partir de cellules basales.....	30
Figure 5 : Modèle de réparation et de remodelage de l'épithélium des voies aériennes..	36
Figure 6 : Représentation schématique de l'appareil de clairance mucociliaire.....	37
Figure 7 : La BPCO dans le monde et en France.....	43
Figure 8 : Trajectoires de la fonction pulmonaire.....	45
Figure 9 : Algorithme de prise en charge de la BPCO.....	51
Figure 10 : Etude génomiques et BPCO.....	56
Figure 11 : Physiopathologie et limitation des flux aériens dans la BPCO.....	60
Figure 12 : Schéma de la voie de signalisation Hedgehog chez l'Homme.	67
Figure 13 : Voie Hedgehog et développement chez la souris.....	74
Figure 14 : Exemples d'inhibiteurs de la voie Hedgehog.....	78
Figure 15 : Modèle de culture primaire en interface air-liquide et analyses de données.	87
Figure 16 : Schémas représentatifs des différents sous-compartiments considérés pour la recherche des protéines d'intérêts (Gli2 et Smo).....	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Mesure de la spirométrie conduisant au diagnostic et à l'évaluation de la BPCO.....	47
Tableau 2 : Echelle mMRC de la dyspnée.	47
Tableau 3 : Classification de la sévérité clinique.....	48
Tableau 4 : Modèle des 5A pour l'aide à l'arrêt du tabagisme.	50
Tableau 5 : Comparaison fonctionnelle de quelques membres de la voie HH entre la drosophile et l'Homme.....	66
Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'étude des différents gènes d'intérêts en PCR.	90
Tableau 7 : Listes des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages et pour les électrophorèses.....	92

INTRODUCTION

Chapitre I : Le poumon

1. Généralités sur l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un ensemble d'organes essentiels permettant l'accomplissement d'un processus physiologique : la respiration, caractérisée par des échanges gazeux entre l'air et le sang pour oxygéner l'ensemble de l'organisme. Ce mécanisme physiologique est composé de deux phases, une phase ventilatoire incluant l'inspiration et l'expiration de l'air dans les poumons et la phase respiratoire comprenant les échanges gazeux entre les alvéoles et les capillaires sanguins (**Figure 1 ▼**).

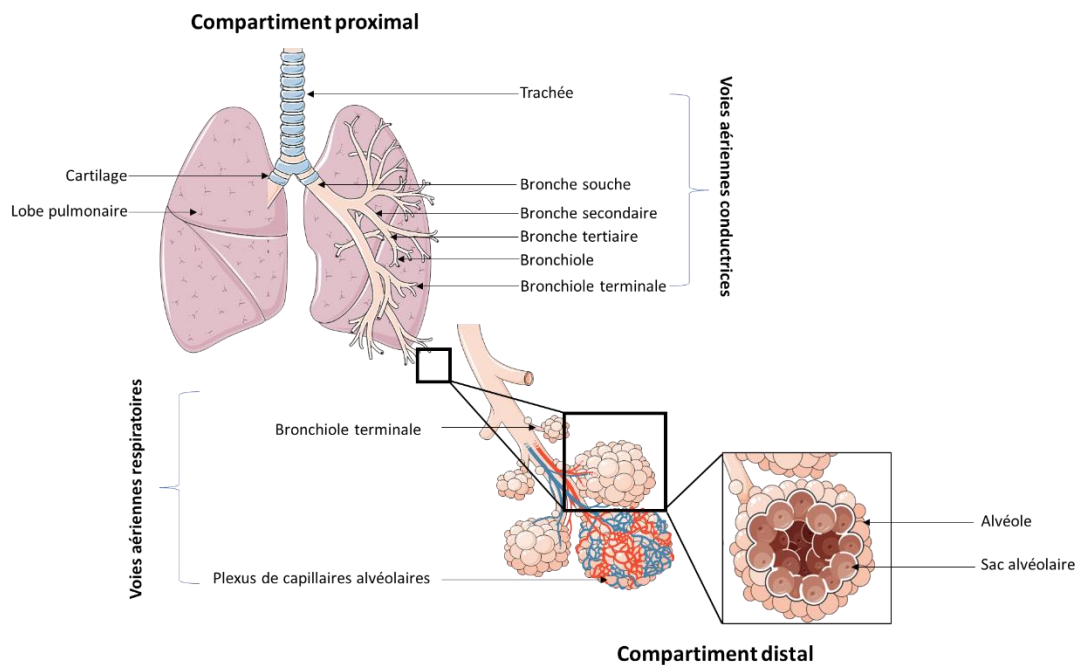


Figure 1 : Organisation des voies aériennes inférieures chez l'Homme.

Durant la phase ventilatoire, l'air inspiré transite par les voies aériennes supérieures (cavité nasale, pharynx, larynx) où il est filtré, humidifié et réchauffé. L'air passe ensuite dans les voies aériennes inférieures (trachée, bronches, bronchioles) pour finir dans les alvéoles. C'est en effet la paroi alvéolaire, en contact direct avec le plexus de capillaires alvéolaires qui va permettre les échanges gazeux entre le sang et les alvéoles avec une diffusion d'oxygène et de dioxyde de carbone. Une régulation fine des interactions moléculaires et cellulaires est requise pour la mise en place de ce processus fondamental.

Chez d'autres espèces et notamment la souris, particulièrement utilisée comme modèle expérimental, les voies aériennes comportent des différences notoires en termes morphologiques et physiologiques (Danopoulos et al., 2019a, 2019b; Rock et al., 2010),

justifiant une grande prudence concernant les extrapolation des résultats obtenus sur modèles animaux à la physiologie et physiopathologie humaine.

1.1. Caractéristiques générales du poumon

Le poumon, contient cinq lobes chez l'Homme, trois à droite et deux à gauche (**Figure 1** ◀). Chaque lobe est formé par une bronche lobaire qui par division dichotomique inégale donne des branches de plus petit diamètre jusqu'aux bronchioles qui donnent naissance aux alvéoles. Cet organe plastique est une barrière mécanique contre l'environnement notamment lors de l'inhalation de particules ou de pathogènes. En comparaison à d'autres barrières de l'organisme comme la peau ou les organes du système digestif, le poumon possède une capacité de renouvellement cellulaire plus lente le rendant plus sensible aux lésions (Beers and Morrissey, 2011).

1.2. Poumon et développement

1.2.1. Généralités

Le développement pulmonaire commence vers la 4^{ème} semaine de grossesse entre le 22^{ème} et le 27^{ème} jour. Les cellules participant à la constitution de cet organe trouvent leurs origines dans deux feuilletts différents. L'endoderme donne naissance aux tissus épithéliaux (revêtement et glandulaire) alors que le mésoderme est à l'origine des tissus conjonctifs, musculaires lisses et des tissus sanguins. Bien que non nécessaire en tant qu'organe respiratoire durant la vie intra-utérine, le poumon se développe tôt chez l'embryon afin d'être fonctionnel dès la naissance et poursuit son développement *ex utero*. Il joue un rôle essentiel dans la production du liquide amniotique qui sera dégluti ou excrété par la trachée et la bouche (Mullasery and Smith, 2015).

1.2.2. Les stades du développement pulmonaire

L'organogenèse pulmonaire est constituée de 5 phases se succédant de l'embryogenèse aux premières années de vie : le stade embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire. Les phases ne sont pas complètement distinctes et certaines étapes se chevauchent (Schittny, 2017) (**Figure 2** ▶).

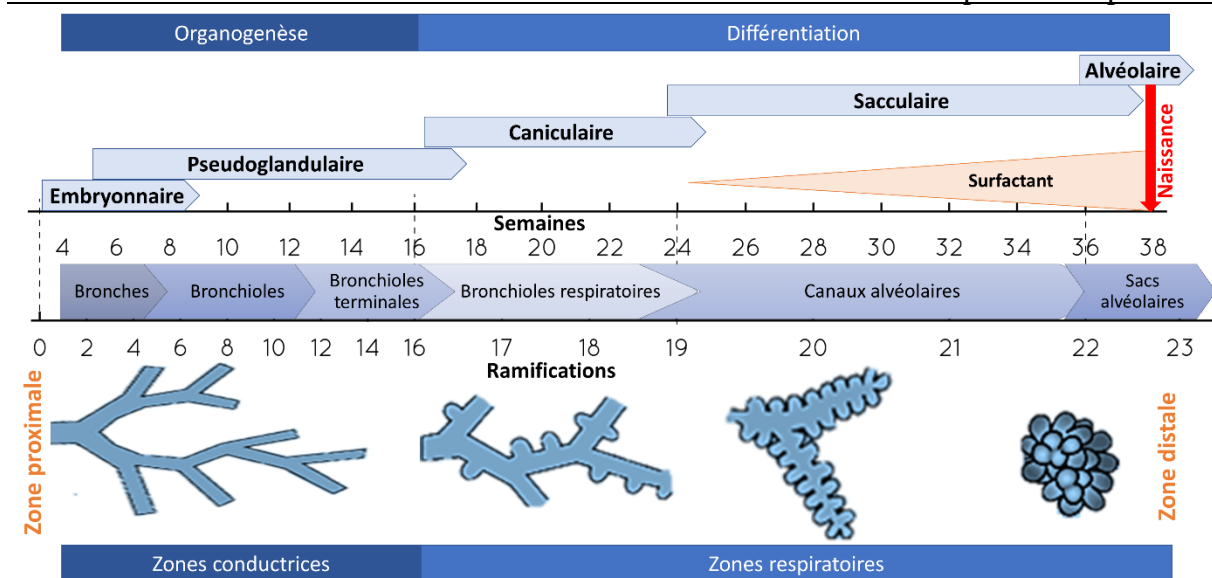


Figure 2 : Stade de développement pulmonaire chez l'Homme.

1.2.2.1. *Le stade embryonnaire*

Le développement pulmonaire s'initie peu avant la 4^{ème} semaine de grossesse et correspond à l'ébauche pulmonaire qui apparaît sous la forme d'un bourgeon qui naît de la partie ventrale de l'intestin primitif. La division de ce bourgeon formera les deux bronches souches. Le bourgeon droit s'étend parallèlement à l'œsophage alors que le gauche, plus grand, s'étend perpendiculairement faisant apparaître l'asymétrie pulmonaire. Chacun des bourgeons va ensuite se diviser pour donner les bronches secondaires : trois bourgeons à droite et deux à gauche correspondant aux futurs lobes. Au contact de la zone abritant la future trachée se produit la différenciation des cellules mésenchymateuses en cartilage. A la fin du stade embryonnaire, les segments des deux lobes sont formés ainsi que les vaisseaux pulmonaires et leurs anastomoses (Kitaoka et al., 1996).

1.2.2.2. *Le stade pseudoglandulaire*

Pendant le second stade, le poumon prend la forme d'une glande tubulo-acineuse. Les divisions continuent pour atteindre une vingtaine de ramifications afin de mettre en place l'arbre bronchique. Les bronchioles respiratoires sont ainsi déjà formées. Le cartilage et les muscles lisses se mettent en place dès la 10^{ème} semaine. L'arbre bronchique est revêtu d'un épithélium composé de cellules prismatiques précurseurs des cellules épithéliales ciliées et sécrétrices. L'épithélium subit une différenciation centrifuge de la partie proximale (proche de la trachée) vers la partie distale (proche des alvéoles) avec une apparition dans l'ordre : des cellules ciliées,

sécrétrices puis des cellules neuroendocrines. Des études ont d'ailleurs observé l'apparition des premières cellules épithéliales ciliées durant ce stade au cours de la 13^{ème} semaine ainsi que des premiers pneumocytes de type II (PnII) (Kitaoka et al., 1996). Les cellules de l'épithélium commencent à produire le liquide amniotique qui est un fluide de protection dans lequel baigne le fœtus durant la grossesse. Enfin, en parallèle, au niveau du mésenchyme commence la différenciation des cellules musculaires lisses.

1.2.2.3. Le stade caniculaire

Le troisième stade correspond à la formation des bronchioles terminales avec l'apparition des premiers saccules. L'épithélium subit aussi quelques changements, PnII cubiques se différencient en pneumocytes de type I (PnI) pavimenteux. Les PnII débutent aussi la synthèse du surfactant. Cette étape est importante car elle marque la viabilité du fœtus après la naissance. Une différenciation des PnII en PnI et une prolifération des capillaires étant cruciaux pour permettre les échanges gazeux. A ce stade il est possible d'évaluer cliniquement la maturation pulmonaire en mesurant le rapport entre deux protéines, la lécithine et la sphingomyéline, présentes dans le liquide amniotique et issues du surfactant (Brown and Duck-Chong, 1982; Cao et al., 2020). Des troubles au niveau du développement pulmonaire à ce stade peuvent être responsables d'une altération des futurs échanges gazeux. Simultanément, le mésenchyme est envahi par un réseau de capillaires qui commence à s'organiser mais reste encore à distance des sacs pulmonaires (saccules), futur lieu d'échange gazeux (Woik and Kroll, 2015).

1.2.2.4. Le stade sacculaire

Le quatrième stade correspond à la formation des sacs alvéolaires, partie terminale de l'arbre respiratoire, séparés entre eux par des septas composées de capillaires. Ces sacs possèdent une paroi lisse de plus en plus fine composée de PnI et PnII. A la fin de cette étape, l'espace intersacculaire est comblé par du tissu conjonctif de soutien (collagène, fibroblastes, élastine) nécessaire à l'activité alvéolaire (Rannels and Rannels, 1989). La croissance pulmonaire se poursuit avec la division des saccules accroissant ainsi l'espace destiné à l'air. La fin de ce stade marque la naissance : l'arbre pulmonaire, son épithélium ainsi que son parenchyme sont complètement formés.

1.2.2.5. *Le stade alvéolaire*

Le dernier stade commence peu avant la naissance et se poursuit jusqu'à une dizaine d'année après. Il correspond à la mise en place et à la maturation des alvéoles. Les septas primaires présents au stade précédent vont donner naissance à des septas secondaires séparant les sacs alvéolaires en petites sous unités appelées alvéoles. Ces septas sont aussi riches en matrice extracellulaire assurant la dilatation et la rétraction des alvéoles lors de la respiration via différentes protéines telles que le collagène ou l'élastine. L'augmentation du nombre de sous unités permet d'obtenir une surface d'échange gazeux plus importante afin d'atteindre la capacité respiratoire définitive. En effet à la naissance, le poumon possède moins de 15% du nombre définitif d'alvéoles (Whitsett and Weaver, 2015).

1.3. Voies de signalisation et développement pulmonaire

La complexité de la formation de la structure et de la fonction pulmonaire suppose l'implication de nombreuses voies de signalisation régulatrices. Ces voies affectent notamment la polarisation du poumon, la différenciation des cellules ainsi que la mise en place des ramifications permettant de former l'arbre bronchique. Parmi ces voies, certaines ont fait l'objet de nombreuses études en lien avec leur fonction dans l'organogenèse pulmonaire telles que la voie Wnt, Notch, BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ou encore Shh (*Sonic Hedgehog*).

La voie Wnt est composée d'une famille de 19 glycoprotéines contrôlant une variété de processus de développement (différenciation, prolifération, polarité ou encore migration). Concernant le poumon, elle joue un rôle dans la formation des voies aériennes distales responsables des échanges gazeux, participe à la spécification proximo-distal du poumon et influence les ramifications pulmonaires (Mucenski et al., 2003; Okubo and Hogan, 2004; Pongracz and Stockley, 2006). La voie Wnt est aussi capable de réguler d'autres voies de signalisations impliquées telle que la voie des BMP (Sekiya et al., 2004; Tago et al., 2000) en initiant son inhibition.

Les molécules de la voie des BMP font partie de la superfamille des facteurs de transcriptions TGF (*Transforming Growth Factor*) et orchestrent entre autres l'alvéogenèse en contrôlant la prolifération des PnII (Chung et al., 2018). La voie influence aussi la localisation et le nombre de bourgeons pulmonaires (Domyan et al., 2011).

A son tour, la voie des BMP régule la voie Notch, voie conservée dans l'évolution. Contrairement aux autres voies citées, sa signalisation se fait de manière juxtacrine (Fiúza and

Arias, 2007). Dans l'organogénèse pulmonaire, la voie Notch participe à la mise en place de l'axe proximo-distal du poumon en contrôlant les facteurs de transcription Sox2 et Sox9. Cette voie est aussi en partie responsable du devenir des cellules progénitrices basales en cellules ciliées ou sécrétrice (Wort et al., 2009). La voie Notch tend à inhiber la différenciation des cellules progénitrices en cellules ciliées en inhibant la protéine GEMC1 (*Geminin Coiled Coil Domain Containing Protein 1*) primordiale à la différenciation en cellules multiciliées en régulant la synthèse du gène de la multiciline (Terré et al., 2016). Chez l'Homme, lorsqu'il est nécessaire d'augmenter le nombre de cellules ciliées, ce sont des micro-ARN, miR-34 et miR-449 qui vont inhiber la voie Notch et permettre la différenciation des progéniteurs en cellules ciliées (Marcet et al., 2011; Song et al., 2014).

La voie Shh impacte quant à elle la morphogénèse des ramifications de l'arbre pulmonaire en assurant des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme (Bellusci et al., 1997; Pepicelli et al., 1998; Zhang et al., 2010). Son influence sur le parenchyme est nécessaire à la formation des muscles lisses bronchiques et vasculaires mais aussi à la formation du cartilage au niveau des bronches proximales (Miller et al., 2004). Le mésenchyme est capable à son tour d'inhiber la voie Shh par le biais de molécules de la famille des FGF contrôlant ainsi les ramifications. Outre le rapport avec la voie HH, les molécules de la famille des FGF agissent plus tardivement en participant à l'alvéogénèse (Danopoulos et al., 2019b; Itoh and Ohta, 2014).

Les régulations minutieuses initiées par ses voies sont exécutées spatio-temporellement afin de permettre le bon développement du poumon et la spécialisation de chaque compartiment. Une aberration de ces interactions peut mener ultimement à des malformations responsables de pathologies affectant la viabilité du fœtus.

A la naissance, les voies de conductions de l'air (bronches et bronchioles sauf bronchioles respiratoires) ainsi que la partie respiratoire (bronchioles respiratoires, alvéoles) commencent à être fonctionnelles. Cependant la capacité pulmonaire maximale n'est atteinte qu'à l'âge adulte.

2. Aspect tissulaire et cellulaire

Les fonctions pulmonaires essentielles à la physiologie de l'organe se mettent en place par la spécification des cellules et par les interactions qu'elles entretiennent entre elles.

2.1. Généralités

Le poumon est composé de différents compartiments (bronches, bronchioles et alvéoles) ayant chacun un épithélium différent assurant une fonction spécifique (conduction et échange gazeux). Les voies de conductions sont constituées de trois couches concentriques assurant la protection, l'élasticité et la fonction pulmonaire selon le compartiment. De la périphérie vers la lumière, la première couche est l'adventice, puis la couche conjonctivo-cartilagineuse et enfin la muqueuse. L'adventice est principalement constituée de tissu conjonctivo-adipeux contenant des vaisseaux et des nerfs et les deux enveloppes les plus internes ont une structure qui varie le long de l'axe bronchique.

La couche conjonctivo-cartilagineuse est aussi appelée armature. Dans la partie proximale des voies aériennes elle présente un empilement de cartilage hyalin en anneaux assurant la constriction et la dilatation et une protection mécanique lors de la respiration. Dans les bronches plus petites, le cartilage est fragmenté et fini par disparaître au niveau des bronchioles.

Enfin, en contact avec la lumière, la muqueuse est composée d'un épithélium de revêtement et glandulaire reposant sur une lame basale et un chorion conjonctif. Ce dernier est composé majoritairement de fibre de collagène, d'élastine mais aussi de capillaires sanguins et lymphatiques. L'épaisseur de l'épithélium diminue le long des voies de conduction passant d'un épithélium prismatique pseudostratifié haut à un épithélium cubique simple au niveau des bronchioles respiratoires. Les types cellulaires présents au niveau de l'épithélium et/ou leurs proportions varient selon le compartiment considéré et participent à la fonction et au maintien de l'homéostasie pulmonaire.

2.2. Histologie des épithéliums pulmonaires

La diversité des cellules constituant les épithéliums pulmonaires permet d'assurer le maintien et l'intégrité de la barrière épithéliale, la clairance muco-ciliaire ainsi que la sécrétion de molécules de défenses (molécules antimicrobiennes, antioxydantes, anti protéasique...).

Chaque compartiment de l'arbre bronchique étant spécialisé, les caractéristiques morpho-histologiques de l'épithélium évoluent. Il est pseudostratifié au niveau des bronches, les cellules reposent sur une lame basale et toutes n'atteignent pas la lumière. Il devient prismatique simple avec le rétrécissement du diamètre des voies aériennes comme au niveau des bronchioles de plus gros calibre. Enfin, il persiste un épithélium de transition cubique simple entre les bronchioles terminales et les alvéoles formées par un épithélium pavimenteux simple. Les cellules épithéliales des voies aériennes sont polarisées et jointives (Rackley and Stripp, 2012) (Figure 3 ▼).

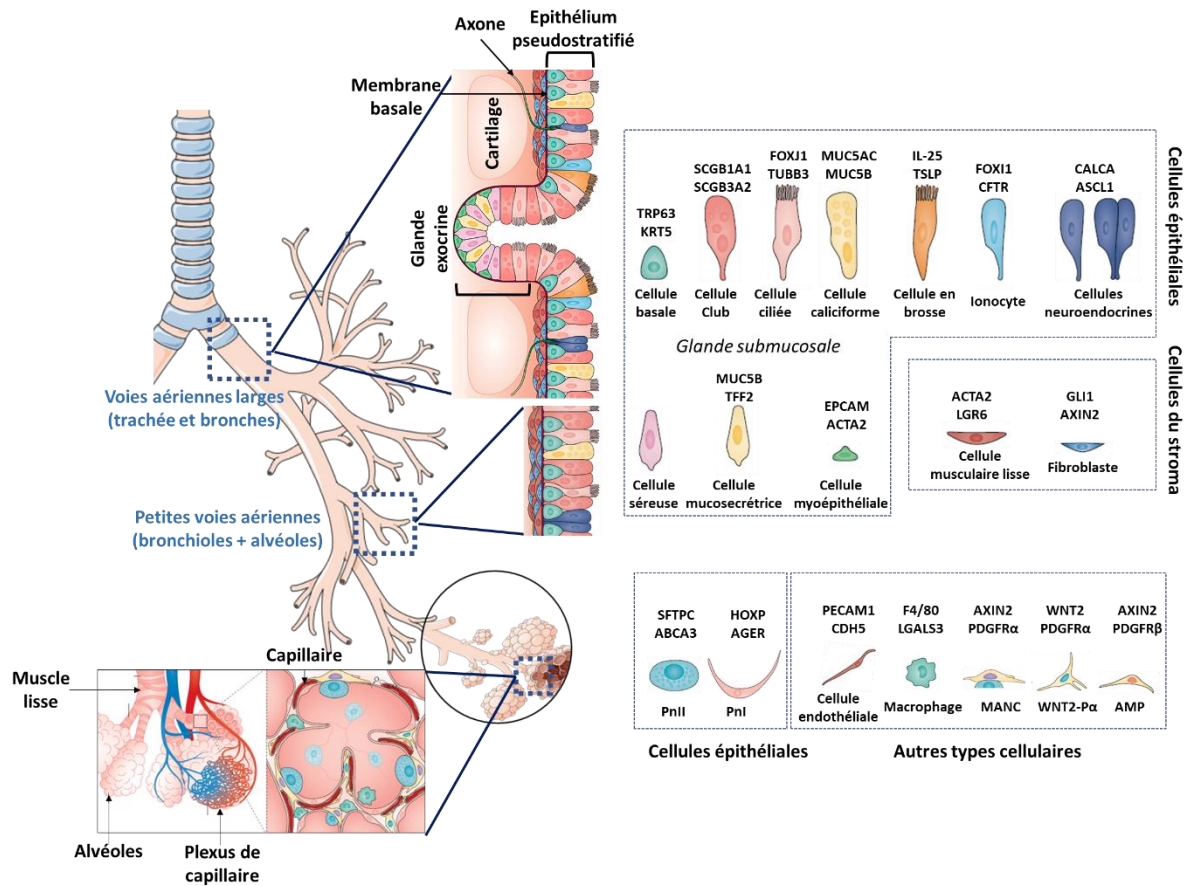


Figure 3 : Morphologie des voies aériennes inférieures humaine adulte.

Les principales cellules épithéliales et du stroma sont représentées de la trachée jusqu'aux alvéoles.

(Modifié d'après Zepp et Morrisey, 2019)

2.2.1. Les cellules basales

Les cellules basales font partie des cellules reposant sur la lame basale et qui n'atteignent pas la lumière des voies aériennes. De forme pyramidale, elles sont caractérisées par l'expression de la protéine Trp63 (*Transcription factor transformation related protein 63*) ou encore de KRT5 (*Keratin 5*) (Senoo et al., 2007; Zuo et al., 2015). Les cellules basales sont présentes des bronches aux bronchioles en diminuant de manière progressive jusqu'à disparaître à l'étage alvéolaire. Elles sont essentielles pour le renouvellement cellulaire en permettant la réparation et la régénération de l'épithélium lors de lésions épithéliales. Cellules progénitrices, elles sont capables de proliférer et de se différencier pour reconstruire un épithélium fonctionnel (Puchelle et al., 2006; Rock et al., 2010). Des études transcriptomiques par séquençage en cellule unique ont récemment mis en évidence des marqueurs permettant le regroupement des cellules basales en populations spécifiques à l'aide de nouveaux marqueurs (Ruiz García et al., 2019) (**Figure 4 ►**). La présence de ces différentes sous populations met en évidence l'importance des cellules basales pendant la régénération de l'épithélium mucociliaire.

Une aberration de l'équilibre de ces cellules peut conduire à de nombreux remaniements provoquant un remodelage épithélial et altérant la fonction de barrière de l'épithélium des voies aériennes. Le processus par lequel les cellules basales acquièrent leur capacité de cellules souches est encore discuté, en effet toutes les cellules basales ne sont pas impliquées dans les phénomènes de réparation. L'une des hypothèses est que les cellules basales présentant un cil primaire, organelle senseur essentiel au développement, recevraient plus facilement les signaux de l'environnement et seraient plus à même d'y répondre (Ruiz García et al., 2019).

Plusieurs voies de signalisations sont impliquées dans la régulation des cellules basales leur permettant de proliférer ou encore de se différencier (Brechbuhl et al., 2014). Dans ce dernier cas la voie Notch joue un rôle crucial. Elle influence le devenir des cellules basales en permettant la différenciation en cellules sécrétrices et en inhibant la formation de cellules multiciliées. A l'inverse lors de lésions, et afin de rééquilibrer les types cellulaires, la voie Notch est inhibée, la voie HH est activée et en synergie avec la multiciline, oriente la différenciation des cellules basales en cellules ciliées (Arbi et al., 2016; Morimoto et al., 2010, 2012).

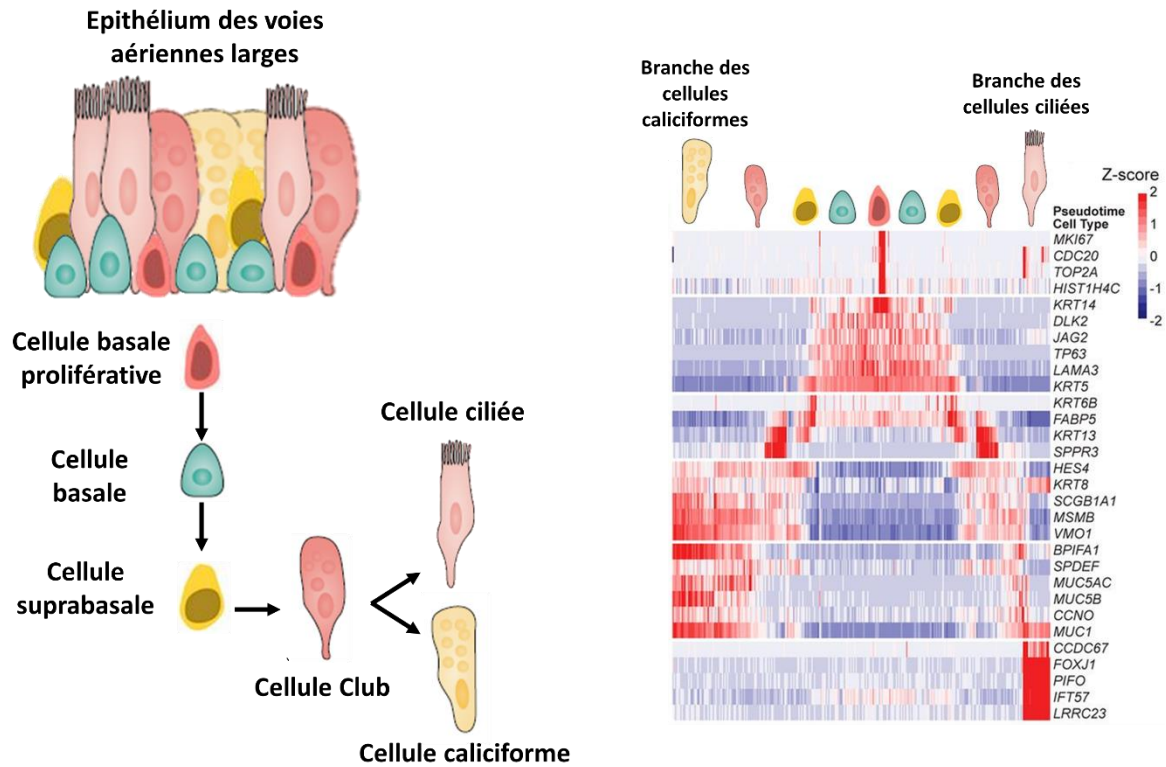


Figure 4 : Modèle de différenciation pour la mise en place d'un épithélium respiratoire fonctionnel à partir de cellules basales.

Trajectoire des cellules basales vers des cellules différenciées.

(Modifié d'après Ruiz García et al., 2019)

2.2.2. Les cellules intermédiaires

En plus des cellules basales, il existe des types cellulaires ayant des capacités de renouvellement intermédiaires au niveau de la trachée, des bronches ou encore des bronchioles qui ne sont pas totalement différenciées. Ces cellules expriment différents marqueurs pouvant être spécifiques de plusieurs types cellulaires à la fois.

Parmi ces cellules intermédiaires, les cellules Clubs nommées anciennement cellules de Clara sont majoritairement présentes au niveau des voies aériennes distales chez l'Homme (Boers et al., 1999; Reynolds and Malkinson, 2010). Ces cellules ont un rôle dans l'immunité par leur production de facteurs de défense et participent au renouvellement de l'épithélium au niveau des bronchioles. En effet, lorsque l'épithélium est lésé, elles sont capables de s'autorenouveler et de se transdifférencier afin de permettre une régénération du tissu (Reynolds and Malkinson, 2010). Des travaux ont démontré la présence de cellules Club bronchiolaires

exprimant le Muc5ac, protéines produites par les cellules caliciformes, montrant ainsi leur capacité de différenciation, dans ce cas en cellules mucosécrétrices (Gamez et al., 2015).

Les cellules Club peuvent exprimer à leur surface plusieurs marqueurs, le plus connu étant le CC10 (*Club Cell 10kDa protein*) aussi appelé CCSP (*Club Cell Secretory Protein*), utéroglobine ou SCGB1A1 (*Secretoglobulin family A1 member 1*) (Shijubo et al., 2003). Cette protéine est importante dans la production du surfactant et possèdent comme les autres types des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. CC10 possède des propriétés immunosuppressives essentiellement envers les lymphocytes Th2 et les macrophages la rendant essentielle pour l'homéostasie pulmonaire (Hung et al., 2004; Snyder et al., 2010).

2.2.3. Les cellules multiciliées

Totalement différenciées, les cellules multiciliées sont de forme cylindrique et sont identifiées par la présence de nombreux cils moteurs à leur surface apicale (entre 100 et 300). Le poumon adulte présente environ 3×10^{12} cellules multiciliées. Chaque cil mesurant 6 à 7 μm de longueur et 0,1 μm d'épaisseur. La structure de l'axonème du cil est de 9+2 microtubules avec une paire centrale les différenciant des cils primaires (9+0) qui sont des structures isolées, non motrices fonctionnant comme une antenne dans l'environnement (Ishikawa, 2017; Spassky and Meunier, 2017). Les cils sont liés entre eux par la paire centrale de microtubules via le complexe nexine-dynéine leur permettant une synchronisation de leur mouvement. La dynéine assure ainsi le battement ciliaire grâce à ses bras internes et externes. Le mouvement unidirectionnel et synchrone est coordonné et participe par propulsion à la clairance mucociliaire en déplaçant le mucus vers le système digestif. Il sera par la suite éliminé par déglutition ou par expectoration (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017).

Le battement est influencé par de nombreuses modalités. Des travaux démontrent une augmentation du battement ciliaire en présence de calcium, d'AMPc ou encore d'agonistes des récepteurs β -adrénergique (Bennett, 2002; Wyatt, 2015). D'autres facteurs comme le pH, la température ou encore l'âge affecte les battements et donc la clairance mucociliaire (Clary-Meinesz et al., 1992; Houtmeyers et al., 1999; Sutto et al., 2004).

Comme les cils primaires, les cils moteurs jouent un rôle de senseurs et répondent aux stimulations mécaniques et chimiques de l'environnement (Shah et al., 2009). Le cil est formé par plus de 600 protéines complexes et conservées (Lindskog et al., 2014). Une altération ou

une mutation d'une des protéines peut suffire à former la genèse d'une pathologie. Les cellules ciliées jouent ainsi un rôle important dans la barrière de défense qu'est l'épithélium respiratoire (trachée et bronches) (Vladar et al., 2016).

L'origine de ces cellules demeure controversée : elles sont issues des cellules basales mais des travaux évoquent une transdifférenciation des cellules sécrétrices en cellules ciliées ou même une origine dans des cellules intermédiaires (Mori et al., 2015; Spassky and Meunier, 2017).

2.2.4. Les cellules mucosécrétrices

Les voies respiratoires sont distinguées par deux types d'épithélium, un épithélium de revêtement et un épithélium glandulaire. L'épithélium de revêtement tapisse les voies aériennes et s'enfonce dans le chorion au niveau des bronches pour former l'épithélium glandulaire. Ces deux types d'épithélium présentent des cellules possédant des capacité mucosécrétrices.

Les cellules caliciformes ou cellules mucipares sont principalement présentes dans la partie proximale des voies aériennes au niveau de l'épithélium de revêtement. Elles permettent la production de mucines, protéines essentielles pour la fabrication du mucus (Ma et al., 2018; Whitsett, 2018). La mucine majoritairement produite par ces cellules est Muc5ac (Bonser and Erle, 2017; Hovenberg et al., 1996).

L'épithélium glandulaire est aussi constitué de cellules caliciformes mais présentent un second type de cellules sécrétrices de mucus dites mucosécrétantes. Ces cellules sécrètent principalement un second type de mucine, Muc5b mais aussi des protéoglycannes et des protéines aux caractères antimicrobiens (Wickström et al., 1998). Le mucus produit dans les glandes est acheminé vers la lumière des voies aériennes via un canal (Widdicombe and Wine, 2015). Les deux types d'épithéliums sont donc essentiels pour la sécrétion de mucines indispensables à la formation du mucus mais aussi à celle du liquide péri-ciliaire (LPC). Ce liquide permet la protection et la lubrification de l'épithélium en facilitant notamment le mouvement des cils. La différence osmotique entre le LPC et le mucus est essentielle à la mise en place de la clairance muco-ciliaire (Button et al., 2012a).

Les mucines sont une famille de polymères protéiques hautement glycosylés. Différents types de mucines ont été décrites, les mucines sécrétées non polymérisés, celles associées aux cellules et qui sont ancrées à la membrane et celles constituant le mucus (principalement

Muc5ac/Muc5b) (Button et al., 2012a). Le rôle principal du mucus est l'établissement d'une barrière physico-chimique pour capturer et éliminer les pathogènes ou aérocontaminants inhalés vers l'appareil digestif (Voynow and Rubin, 2009). La composition et l'abondance de ce mucus varie selon l'axe antéro-postérieur du poumon, l'environnement et l'inflammation (Whitsett, 2018). Il est essentiellement constitué d'eau (95%) associé à des lipides, des mucines, des sels, des molécules antimicrobiennes ainsi que des électrolytes.

Lors de phénomènes inflammatoires, la sécrétion de mucines et de mucus est augmentée afin de capter les pathogènes, et les cils moteurs des cellules ciliées de l'épithélium permettent le déplacement de ce mucus en dehors des poumons. Cependant, si ce phénomène perdure et que la composition du mucus est altérée, des pathologies pulmonaires peuvent se développer : asthme, bronchopneumopathie obstructive (BPCO) ou encore mucoviscidose (Ridley and Thornton, 2018).

2.2.5. Les cellules neuroendocrines

Malgré la complexité du poumon, il n'existe pas de tissus nerveux. Cependant, des cellules participent à l'innervation nerveuse, isolées ou sous forme de plexus dans l'épithélium des voies aériennes, ce sont les cellules neuroendocrines. Présentes dans l'épithélium de revêtement, elles possèdent une polarité inversée par rapport aux autres cellules en ayant un noyau basal et uniquement une petite extension cytoplasmique qui atteint la lumière. Elles ont la capacité de sécréter des granules composés de neurotransmetteurs critiques pour la modulation de la réponse immunitaire aux allergènes tels que la sérotonine, la calcitonine ou l'acide γ aminobutyrique (Barrios et al., 2019; Branchfield et al., 2016; Song et al., 2012). Elles possèdent aussi un rôle sur la régulation de la sécrétion du mucus (Sui et al., 2018).

2.2.6. Les pneumocytes

L'épithélium alvéolaire est de type pavimenteux simple reposant sur des cloisons conjonctives nommées les septas inter-alvéolaires où circulent les vaisseaux sanguins et lymphatiques. L'épithélium est constitué de deux types cellulaires, les PnI et les PnII (Guillot et al., 2013).

Les PnI tapissent la quasi-totalité de la surface alvéolaire et forment la zone d'échange gazeux avec les plexus vasculaires (Yang et al., 2016). Ces cellules sont aussi capables de sécréter les facteurs de croissance nécessaires au maintien du plexus. Les PnII présentent une

capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en PnI permettant l'homéostasie de l'épithélium alvéolaire au même titre que les cellules basales des bronches et bronchioles (Barkauskas et al., 2013). Elles sont aussi responsables de la sécrétion du surfactant jouant ainsi un rôle dans les défenses immunitaires et dans la réparation en cas de lésion (Barkauskas et al., 2013; Frank et al., 2016). La destruction de ces cellules et l'inflammation induite décrivent l'emphysème (Wallace et al., 2014).

2.2.7. Les ionocytes

Découvert récemment, les ionocytes sont les cellules présentant la plus forte expression du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) codant pour la protéine du même nom (Montoro et al., 2018; Plasschaert et al., 2018). La mutation de ce canal est responsable de la mucoviscidose, maladie associée à une altération de la composition ionique du mucus menant à une plus grande prédisposition aux infections (Ratjen et al., 2015). D'autres études doivent être menées afin de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans l'épithélium respiratoire et bronchiolaire.

2.3. Histologie du stroma pulmonaire

Les différentes populations de cellules épithéliales collaborent entre elles via des messages chimiques afin de maintenir l'homéostasie pulmonaire, mais cette stabilité épithéliale ne peut être complète sans l'intervention et le soutien des tissus sous-jacent assurant son architecture générale et sa protection. Le tissu sanguin délimité par les cellules endothéliales assure l'approvisionnement en sang de l'organe (Rafii et al., 2016).

Le tissu conjonctif non spécialisé et notamment les fibroblastes qui y sont logés produisent la matrice extracellulaire nécessaire au soutien des structures (White, 2015). Le tissu cartilagineux apporte le maintien de la structure de la trachée et des bronches.

Par ailleurs le tissu musculaire apporte la plasticité nécessaire aux voies de conductions aériennes afin de faciliter la respiration et le tissu cartilagineux apporte une protection mécanique supplémentaire pour éviter que les voies aériennes collapsent (Collins and Thébaud, 2014).

3. Fonction de l'appareil respiratoire

Le but premier de l'épithélium des voies aériennes est de protéger l'organisme des pathogènes et des polluants par l'intermédiaire d'une barrière physico-chimique fonctionnelle et de permettre la respiration. Cette barrière est composée par un ensemble de jonctions entre les cellules épithéliales, du processus de clairance muco-ciliaire ainsi que de la sécrétion de molécules de défenses.

3.1. Barrière physique

Les cellules des épithéliums pulmonaires sont connectées entre elles par un système composé de différentes jonctions. Au niveau du pôle apical, les cellules sont liées par des *Zonula Occludens* ou jonctions serrées qui sont étanches et imperméables. Ces jonctions sont constituées de molécules spécifiques telles que ZO-1 (*Zonula occludens 1*) ou encore les claudines (Overgaard et al., 2012; Van Itallie and Anderson, 2013; Yang et al., 2017). Ce type de jonction est notamment retrouvé dans d'autres barrières essentielles comme la barrière hémato-encéphalique (Greene and Campbell, 2016; Van Itallie and Anderson, 2014). Des jonctions adhérentes ou les desmosomes retrouvées au niveau latéral permettent les contacts inter-cellulaires pour la cohésion cellulaire. Le contact des cellules basales avec la lame basale se fait quant à lui via des hémidesmosomes (Wittekindt, 2017).

Lorsque l'épithélium respiratoire est lésé, l'intégrité de cette barrière est mise en danger et plusieurs mécanismes se mettent alors en place pour permettre la régénération d'un épithélium fonctionnel (**Figure 5 ►**). En effet, lors de l'introduction de pathogènes ou d'autres substances altérant les cellules et leur fonction, un phénomène de réparation et de régénération débute. Les cellules basales positionnées en bordure de la lésion vont s'étaler et migrer afin de repeupler la zone lésée. Un signal de prolifération est envoyé pour régénérer un ensemble de cellules cohésives. Durant cette étape et de manière transitoire, l'épithélium est pluristratifié et présente une métaplasie malpighienne. Progressivement, les cellules basales arrêtent de proliférer et commencent leur différenciation afin de donner un épithélium fonctionnel. Ce mécanisme de réparation fait intervenir un ensemble de molécules épithéliales mais aussi des molécules de la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéinases (MMPs), des facteurs de croissance ou encore des cytokines (Adam et al., 2014; Legrand et al., 1999).

Un déséquilibre de cette réparation induit la présence de remodelages histologiques tels que l'hyperplasie des cellules caliciformes, des cellules basales ou encore un maintien de la métaplasie malpighienne. Ces aberrations de l'épithélium sont d'ailleurs retrouvées dans les maladies inflammatoires chronique pulmonaires telles que l'asthme ou la BPCO (Ganesan and Sajjan, 2013; Puchelle et al., 2006).

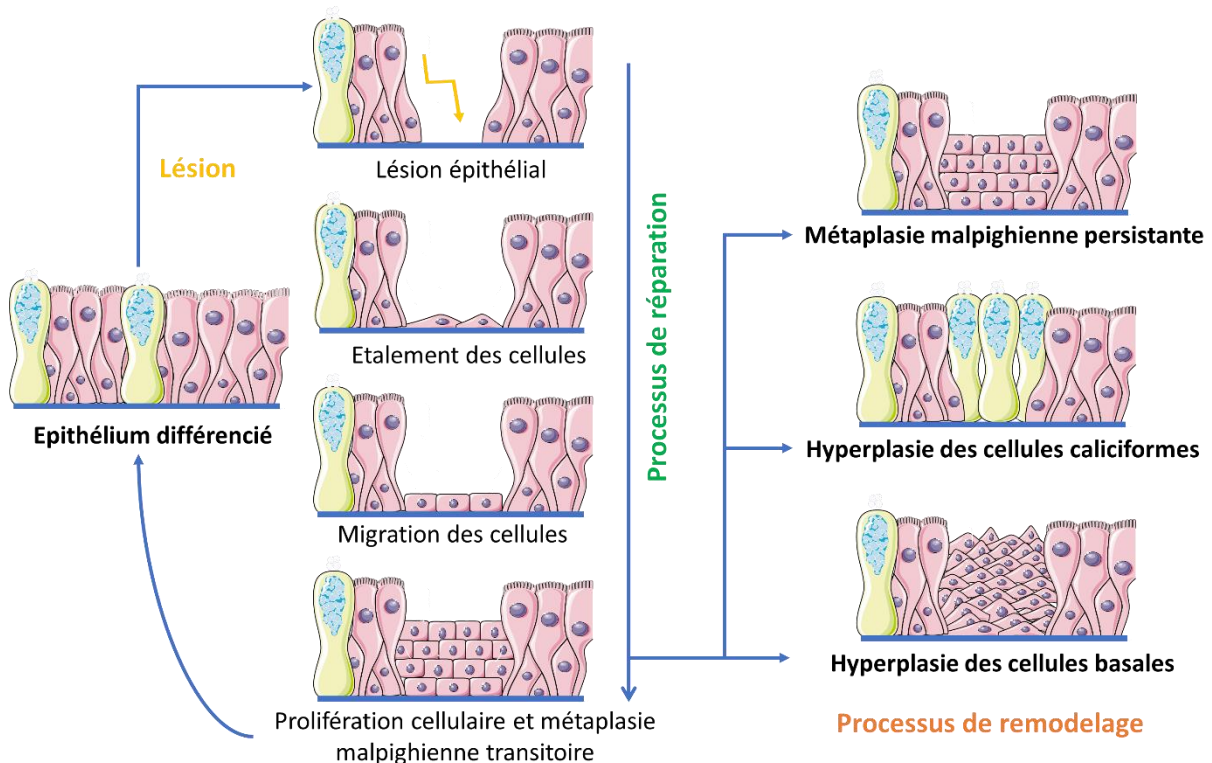


Figure 5 : Modèle de réparation et de remodelage de l'épithélium des voies aériennes.

Processus de réparation après une lésion et anomalies cellulaires associées.

(Modifié d'après Adam D et al., 2014)

3.2. Clairance mucociliaire

Les voies aériennes sont constamment exposées aux pathogènes, bactéries, virus, particules ou encore aux gaz. Pour répondre à ces agressions, des mécanismes de défense maintiennent le poumon dans des conditions limitant la charge microbienne et virale. La clairance mucociliaire fait partie des mécanismes de défense de l'appareil respiratoire, en effet elle permet la capture et le transport de corps étrangers et d'agents pathogènes vers le système digestif. Ce processus complexe se divise en deux composantes, le mucus qui piège les particules et les transportent hors du poumon par la force générée par les cils, et la couche péri-ciliaire qui fournit un environnement favorable aux battements synchrones et coordonnés des cils en les lubrifiant (modèle de gel en brosse) (Button et al., 2012a). La composition de ces liquides doit être régulée afin de posséder les caractéristiques physico-chimiques nécessaires à leur rôle. L'efficacité de cette clairance dépend aussi bien des cils moteurs que de la composition des deux phases du gel (**Figure 6 ▼**) (Button et al., 2016). La modulation de l'osmose entre le mucus et le LPC participe à la déstabilisation de la composition du gel menant à une anomalie de clairance présente dans certaines pathologies respiratoires (Button et al., 2012b).

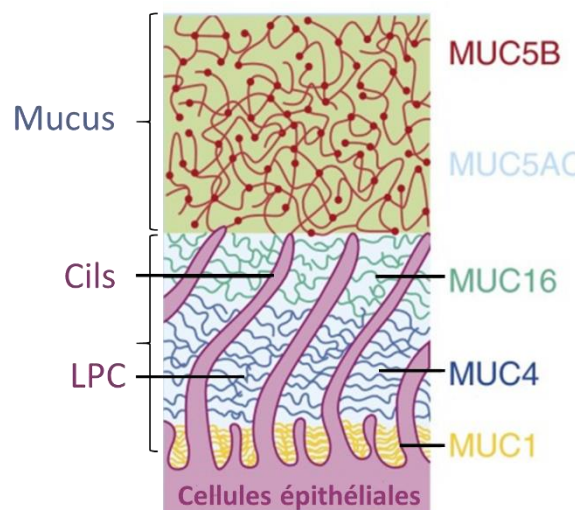


Figure 6 : Représentation schématique de l'appareil de clairance mucociliaire.

Modèle du gel en brosse composé d'une couche de mucus et d'une couche de liquide péri-ciliaire (LPC).

(Modifié d'après Button et al., 2016)

Les cellules ciliées prolongent leurs cils dans le LPC, liquide peu visqueux et aqueux d'une épaisseur quasi-équivalente à celle des cils (environ 7 μ m). Il est constitué de mucines de petite taille (Muc1, Muc4, Muc16 ou encore Muc20) ainsi que de mucopolysaccharides et de glycolipides (Ma et al., 2018). Les mucines sont produites par les différentes cellules mucosécrétrices de l'arbre pulmonaire (cellules caliciformes, cellules mucosécrétantes, cellules Club) permettant une continuité de leur sécrétion le long des voies aériennes (Bustamante-Marín and Ostrowski, 2017).

Cette composition de mucines du LPC permet la formation d'un maillage (20-40nm) jouant le rôle de filtre et empêchant la pénétration des agents infectieux bloqués dans le mucus sus-jacent. Par exemple, le virus de la grippe possède une taille variant de 80 à 120nm (Button et al., 2012a). Les molécules présentes dans le LPC se repoussent et créent une pression osmotique régulant l'hydratation de la couche supérieure contenant le mucus. En effet, il doit être suffisamment hydraté afin d'empêcher le mucus d'écraser les cils (Button et al., 2012b).

La couche de mucus est principalement formée par les mucines Muc5ac, Muc5b, Muc2, Muc8 ou encore Muc19, des mucines de plus grandes tailles que celles du LPC (Bustamante-Marín and Ostrowski, 2017; Rose and Voynow, 2006). Il contient aussi des électrolytes ainsi que des molécules antimicrobiennes (Whitsett, 2018).

L'interface LPC-mucus est une surface semi-perméable et la pression osmotique de ces deux phases est générée uniquement par les grosses molécules ne pouvant pénétrer dans le maillage. Les changements d'osmose, pouvant être à l'origine de pathologies, sont dû à une déshydratation de l'une des phases ou à une augmentation de la production de mucines. En effet, lorsque le mucus est déshydraté, la pression osmotique du mucus devient supérieure à celle du LPC, le mucus s'affaisse et écrase les cils moteurs. La clairance est fortement perturbée et le mucus contenant des pathogènes forme un nid pour les infections, notamment bactériennes (Button et al., 2012a).

L'hydratation et le maintien de l'osmose sont donc des éléments essentiels à la clairance. Cette hydratation est régulée par différents canaux ioniques. L'un des canaux principaux est le canal CFTR, responsable du flux d'ions chlorure des cellules épithéliales vers le milieu extracellulaire. Cette sortie d'ions favorise l'hydratation et impacte aussi le passage d'ions bicarbonates dans le mucus. En effet, un mucus trop acide possède une activité antimicrobienne moindre (Hobbs et al., 2013; Poulsen et al., 1994).

Le canal CFTR influence aussi l'activation des canaux sodique (ENaC) permettant une entrée du sodium dans le milieu intra-cellulaire. Ces canaux permettent l'absorption de l'excès de mucus mais ne peuvent être actifs que lorsqu'ils sont clivés par des protéases. L'activité de ces protéases et donc le contrôle de l'activation de ces canaux est régulé par des anti-protéases telle que la molécule SPLUNC-1 présente au niveau du mucus et du LPC. Cette molécule est capable, selon l'environnement, d'influer sur l'activation des canaux ENaC et de contrôler l'hydratation du mucus et la clairance mucociliaire (Garcia-Caballero et al., 2009; Kim et al., 2018).

3.3. Conduction de l'air et respiration

Plus qu'un simple rôle dans les mécanismes de défenses, les poumons sont responsables de la fonction vitale qui est la respiration en permettant la conduction de l'air jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les poumons sont ventilés lors des épisodes d'inspiration et d'expiration constituant le cycle respiratoire. Durant ces cycles, au niveau des alvéoles, les capillaires pulmonaires reçoivent le sang pompé par le cœur droit. Ces apports continus en sang vont permettre aux alvéoles d'assurer leur rôle d'oxygénation. L'air passe par le nez (au repos) ou la bouche pour traverser les voies aériennes supérieures, il parvient ensuite au niveau de la trachée et traverse les nombreuses bronches et bronchioles jusqu'aux alvéoles où ont lieu les échanges gazeux. Lors de son passage dans la partie conductrice l'air est humidifié, réchauffé à la température corporelle (37°C) et filtré en piégeant les particules nocives dans le mucus.

Il y'a environs 300 millions d'alvéoles chez l'Homme adulte, ce qui représente une surface d'échange gazeux d'environs 200m² équivalente à un terrain de volley. L'amplitude de cette surface permet des échanges gazeux optimaux et assure la transmission de l'oxygène dans le sang et l'extraction du dioxyde de carbone. Afin d'éviter l'effondrement des alvéoles durant l'expiration pouvant gravement nuire à la respiration et donc à l'oxygénation des organes vitaux, les PnII sécrètent le surfactant. Ce liquide joue un rôle dans la diminution des tensions superficielles et permet une bonne distension pulmonaire. Ce surfactant est principalement issu du compartiment alvéolaire et est composé de molécules spécifiques (SP-A, SP-B et SP-D) (Bonser and Erle, 2017; Calkovská, 2000). Différentes hypothèses sont émises quant à son origine : appartenance au LPC ou au mucus et au LPC (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017).

Les échanges entre les cellules alvéolaires, spécifiquement les PnI, et le sang se font en fonction de différences de pressions partielles. L'oxygène diffuse de la pression la plus élevée vers la pression la plus basse selon la loi de Fick. La pression partielle des alvéoles étant de 100 mmHg pour le dioxygène et de 40 mmHg pour le dioxyde de carbone quand respectivement elle est de 40 mmHg et de 46 mmHg dans le capillaire, l'oxygène circule des alvéoles jusqu'au sang et le dioxyde de carbone en sens inverse.

L'ensemble des données recueillies dans ce chapitre révèlent la complexité et l'importance du poumon. La bonne régulation des multiples interactions cellulaires et moléculaires prévient la mise en place des lésions. Cependant, et malgré les nombreux moyens de défense mis en place par l'organisme pour protéger le poumon, il reste très sensible aux pathologies. Le cancer du poumon représente l'une des premières causes de mortalité par cancer dans le monde (OMS, 2018). Mais il existe aussi d'autres pathologies pulmonaires handicapantes et réduisant fortement la survie comme la mucoviscidose, l'asthme ou encore la BPCO. Cette dernière est une pathologie peu diagnostiquée et sans traitement curatif suscitant l'intérêt de nombreux laboratoires d'étude.

**Chapitre II : La
bronchopneumopathie
chronique obstructive**

1. Définition

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie respiratoire méconnue auprès du grand public mais se plaçant comme l'une des premières causes de mortalité dans le monde (OMS, 2016). Elle est caractérisée par une diminution irréversible des débits aériens associée à divers degrés à une inflammation pulmonaire et un emphysème. Sur le plan clinique la BPCO se traduit par des symptômes communs à d'autres maladies telles que la toux ou encore une dyspnée à l'effort. Elle représente un problème de santé publique majeur d'une part par les causes qui mènent à cette affection qui sont principalement le tabagisme et l'exposition à la pollution (atmosphérique ou professionnelle) et d'autre part par le fait qu'elle est sous-diagnostiquée. Le diagnostic est souvent établi lorsque la pathologie devient handicapante alors qu'il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la BPCO.

2. Epidémiologie

La BPCO représente aujourd'hui la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde et toucherait, selon les derniers chiffres divulgués par l'OMS en 2016, 65 millions de personnes dans le monde (Lozano et al., 2012) (**Figure 7 ►**). En 2015 cette maladie fut la cause officielle d'environ 5% des décès dans le monde soit plus de 3,15 millions de personnes (OMS, 2016). A l'heure actuelle, plus de 90% des décès liés à la BPCO ont lieu dans les pays en développement à moyens et faibles revenus alors que les données épidémiologiques chiffrées disponibles sont en majorité issues des pays développés, qui malgré leurs moyens peinent à avoir des résultats fiables au vue de la progression de la maladie et de son faible diagnostique.

En Europe, 4-10% des adultes sont diagnostiqués pour la BPCO. En France, on évalue la prévalence de la BPCO à 6 à 8% des sujets de plus de 40 ans. L'hospitalisation de plus de 100 000 patients BPCO par an a pour conséquence des dépenses publiques non-négligeables (Institut de Veille Sanitaire, 2019). Le plan BPCO établi par le ministère de la santé pour 2005-2010 avait estimé les dépenses liées à la pathologie à 3,5 milliards d'euros par an soit 3,5% des dépenses totales de santé (Ministère de la santé) (Fuhrman et al., 2010; Roche et al., 2008, 2013).

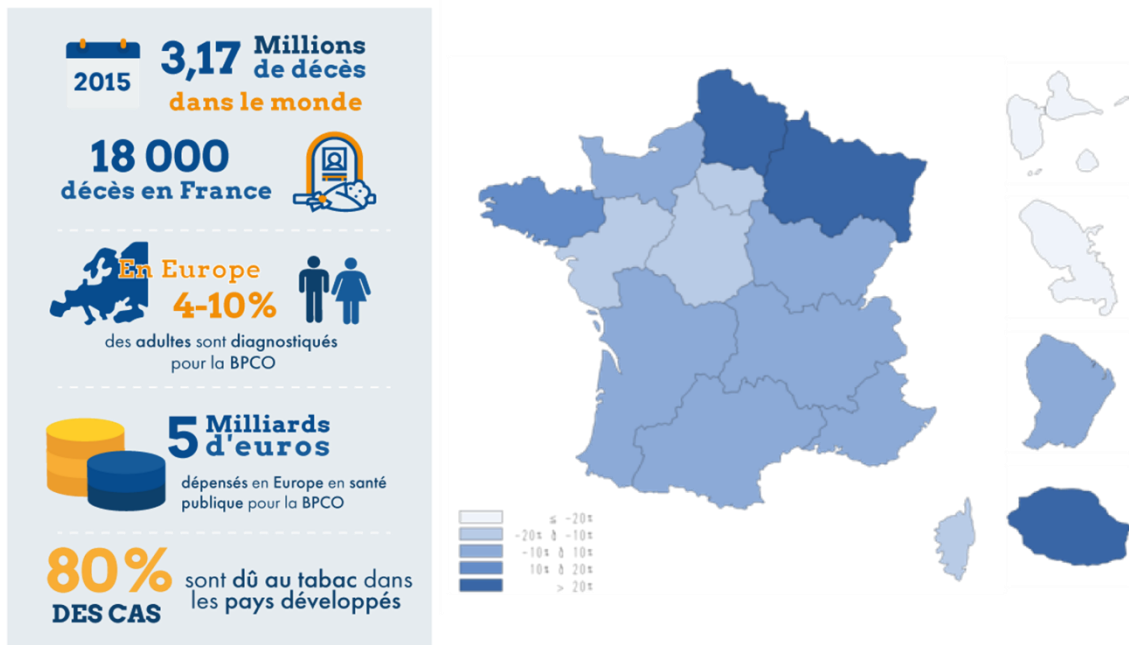


Figure 7 : La BPCO dans le monde et en France.

(Institut de Veille Sanitaire, 2017).

La prévalence de la BPCO étant estimée à 30% par an, il est impératif de développer des mesures efficaces de lutte.

Cette pathologie touche aujourd'hui autant d'hommes que de femmes alors qu'elle était essentiellement masculine il y a quelques dizaines d'années. La consommation de tabac de plus en plus généralisée chez les femmes dans les pays occidentaux et l'exposition à la pollution intérieure liée aux combustibles utilisés pour la cuisson dans les pays en voie de développement ont rééquilibré l'écart entre les hommes et les femmes (OMS, 2017 ; (Diaz-Guzman and Mannino, 2014; Varkey, 2004).

3. Symptômes, diagnostic et classification

3.1. Symptômes

La BPCO se développe progressivement avec des symptômes banalisés par les patients rendant le diagnostic tardif voire inexistant. Les fumeurs, de peur de devoir arrêter le tabac sont par ailleurs plus à même d'ignorer les signes avant-coureurs de la BPCO. Les symptômes tels que la toux chronique ou encore la présence d'expectorations (crachats) apparaissent lentement et s'installent dans le temps. Ils évoluent par la suite, et d'autres manifestations telles que la dyspnée (difficultés respiratoires) à l'effort puis au repos, ou encore le développement d'infections pulmonaires rendent la maladie handicapante (Vogelmeier et al., 2017a).

3.2. Diagnostic

L'orientation vers des examens menant au diagnostic de la BPCO se fait généralement *via* deux parcours. Dans un premier cas, le médecin généraliste, en connaissance de cause, peut décider d'envoyer le patient réaliser des examens fonctionnels respiratoires en vue d'établir un diagnostic. Il est aussi possible de détecter la pathologie lors d'explorations fortuites (médecines professionnelles, imageries médicales...). La difficulté du diagnostic est surtout liée à la progression lente des symptômes auxquels les patients s'habituent.

3.2.1. Par spirométrie (EFR)

Le diagnostic de la BPCO est posé en majorité après exploration de la fonction respiratoire (EFR), par spirométrie. Il se fait généralement chez les patients âgés de plus de 40 ans, présentant une toux chronique, des expectorations, de la dyspnée ou ayant des antécédents connus en lien avec la pathologie. Un patient est considéré comme ayant une BPCO si la mesure par spirométrie du rapport VEMS/CVF après prise de bronchodilatateurs est inférieure à 0,70 (VEMS : Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde ; CVF : Capacité Vitale Forcée, soit le volume d'air total expiré durant une expiration forcée à partir d'une inspiration maximale). La mesure de ce ratio révèle la présence d'un trouble ventilatoire obstructif (TVO) et en détermine la sévérité. Pour mieux apprécier le diagnostic, d'autres explorations fonctionnelles respiratoires sont effectuées en routine telles que la pléthysmographie (mesure de la distension pulmonaire), les tests pharmacodynamiques effectués après la prise de bronchodilatateurs, la mesure de la capacité du transfert du monoxyde de carbone, la mesure

des gaz du sang artériel ou encore l'épreuve d'effort (Rabe et al., 2007; Şerifoğlu and Ulubay, 2019; Welte et al., 2015). La catégorisation de la BPCO est en constante évolution et prend de plus en plus en considération l'évolution de la capacité pulmonaire dès les premières années de vie (**Figure 8 ▼**) (Agusti and Faner, 2019).

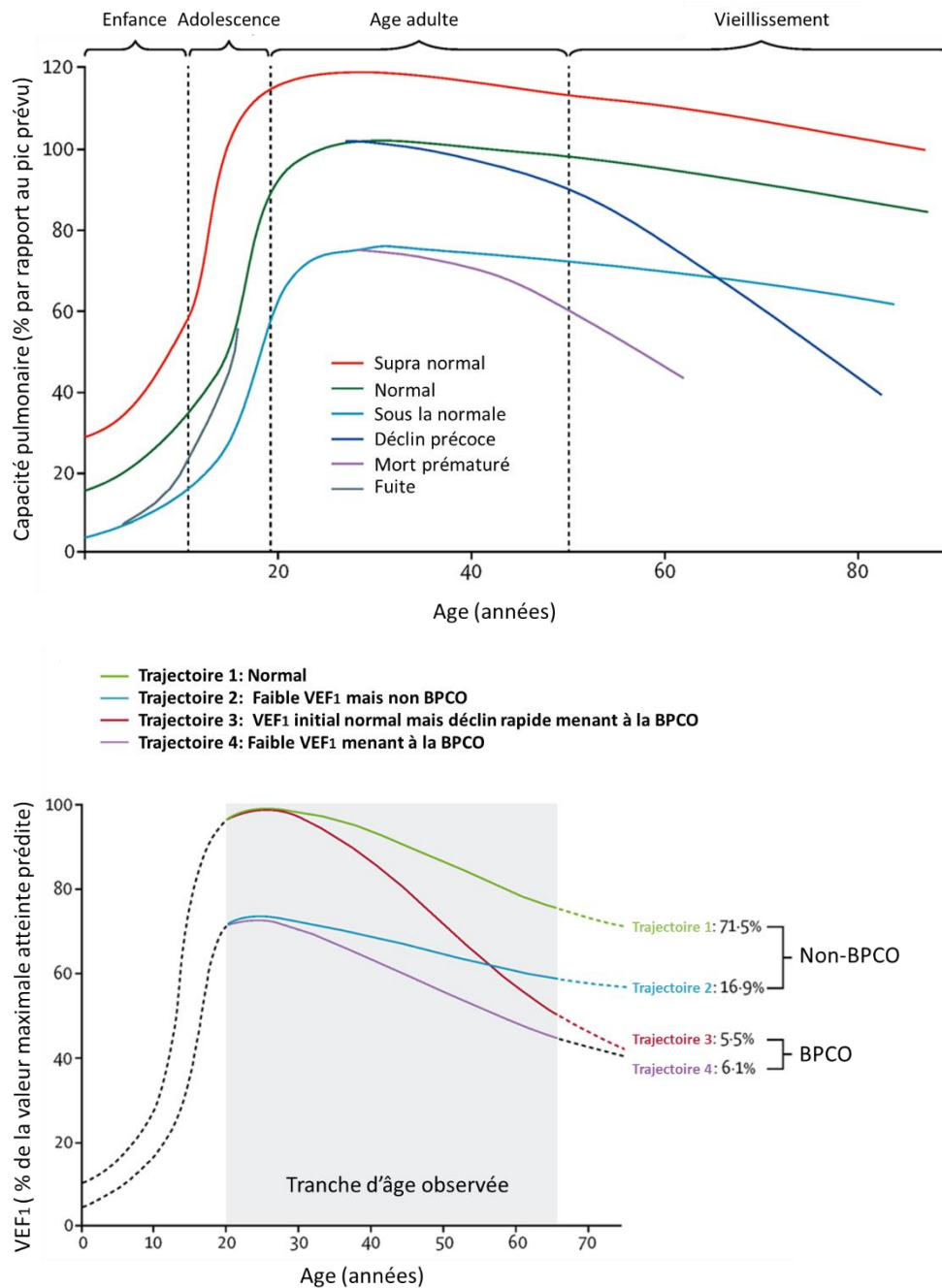


Figure 8 : Trajectoires de la fonction pulmonaire.

De la trajectoire potentielle (haut) à la réalité, réalisé sur cohortes cliniques (bas).

(Modifié d'après Agusti et al., 2019)

3.2.2. Par radiographie

Les symptômes de la BPCO étant communs et pouvant être liés à d'autres pathologies telles que l'asthme, les dilatations des bronches, la tuberculose ou les cancers des voies aériennes, il est essentiel d'effectuer des examens complémentaires afin de valider le diagnostic. Le scanner thoracique est ainsi effectué afin de localiser la présence éventuelle d'un emphysème, un des marqueurs clés associé à la BPCO, ainsi que des lésions associées (Şerifoğlu and Ulubay, 2019). Il est important de souligner que la présence d'un emphysème sans TVO n'est pas une BPCO, définie par l'existence d'un TVO irréversible. D'autres examens peuvent être effectués par la suite comme l'évaluation du système cardiaque ou la recherche de facteurs génétiques en lien avec la BPCO (déficit en α 1-antitrypsine). Le bilan des comorbidités doit aussi être effectué (Negewo et al., 2015).

3.3. Classifications

La BPCO est caractérisée par une obstruction bronchique des voies aériennes avec la présence ou non d'emphysème. Le remodelage des voies aériennes est impliqué dans cette obstruction bronchique chronique et une hypertension pulmonaire habituellement modérée peut également être associée. De plus, la pathologie présente des phases dites d'exacerbation, c'est-à-dire de périodes d'aggravation avec une augmentation des symptômes pouvant mener à des hospitalisations répétées (Pavord et al., 2016). La classification de cette pathologie peut donc être diverse et prendre en compte plusieurs facteurs. Deux classifications complémentaires sont recommandées par les commissions d'experts internationales : la première (GOLD 1-2-3-4) est liée à la sévérité fonctionnelle respiratoire en rapport avec la mesure du VEMS après prise de bronchodilatateurs ; la seconde (GOLD A-B-C-D) porte sur la sévérité clinique et prend en compte les facteurs de dyspnée et d'exacerbations.

3.3.1 GOLD (*Global Initiative for chronic obstructive Lung Disease*) : sévérité de l'obstruction bronchique (VEMS/CVF)

Cette première classification met en avant la sévérité de l'obstruction bronchique dans la BPCO et la divise en 4 stades (1-2-3 et 4). Elle se base sur le rapport VEMS/CVF (exprimé en valeur absolue) après prise de bronchodilatateur (**Tableau 1 ►**) (Vogelmeier et al., 2017b).

Stade	Caractéristiques
	Chez les patients VEMS/CVF < 70% après bronchodilatateur
1: BPCO légère	VEMS ≥ à 80% prédit après bronchodilatateur
2: BPCO modérée	VEMS entre 50% et 80% prédit après bronchodilatateur
3: BPCO sévère	VEMS entre 30% et 50% prédit après bronchodilatateur
4: BPCO très sévère	VEMS < 30% des valeurs prédit après bronchodilatateur

Tableau 1 : Mesure de la spirométrie conduisant au diagnostic et à l'évaluation de la BPCO.

(Selon la classification GOLD 1-4, 2020)

3.3.2 Sévérité clinique et dyspnée

La seconde classification, l'échelle mMRC (*modified Medical Research Council*) permet d'évaluer une dyspnée dans la vie quotidienne d'un patient (**Tableau 2 ▼**). Cette classification comparée à la première reste peu maniable car subjective au niveau de l'investigateur et du patient (Vogelmeier et al., 2017b).

Stade	Caractéristiques
Stade 1	Je suis essoufflé quand je me dépêche à plat ou quand je monte une pente légère
Stade 2	Je marche moins vite que les gens de mon âge à plat ou je dois m'arrêter quand je marche à mon pas à plat
Stade 3	Je m'arrête pour respirer après 90 mètres ou après quelques minutes à plat
Stade 4	Je suis trop essoufflé pour quitter ma maison ou je suis essoufflé rien qu'à m'habiller

Tableau 2 : Echelle mMRC de la dyspnée.

(Selon la classification GOLD, 2020)

Cette échelle est mise en relation avec la gravité des exacerbations en prenant en compte leurs fréquences et la gravité (hospitalisation ou non) (Safka et al., 2016) (**Tableau 3 ▼**).

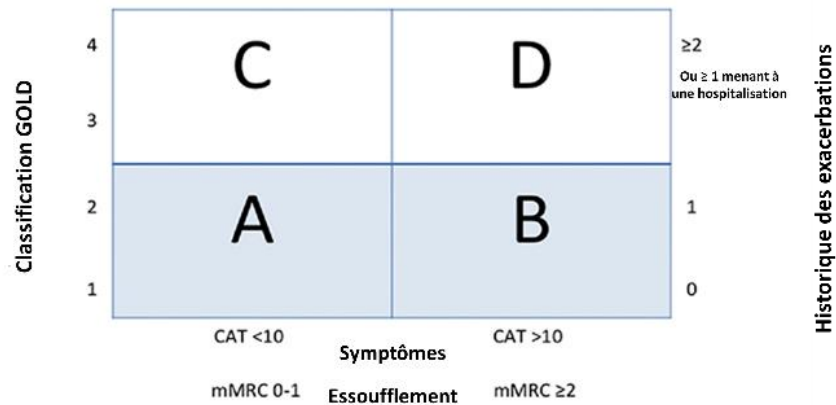


Tableau 3 : Classification de la sévérité clinique.

(Selon la classification GOLD A-D, 2020)

Ces classifications appréciant la sévérité de la BPCO sont actuellement la base du choix des traitements administrés aux patients (GOLD report, 2020).

3.4. Exacerbations

Les exacerbations sont des périodes supérieures à 24 heures caractérisées par une aggravation des symptômes (toux, expectorations) menant à une détresse respiratoire aiguë pouvant entraîner une hospitalisation et dans certains cas à l'identification première de la BPCO. Il existe des cas très sévères où le pronostic vital est engagé notamment en cas d'hypoxémie et/ou d'acidose respiratoire ($pH \leq 7,35$). En plus de la dyspnée, la gravité des exacerbations dépend aussi du terrain sur lequel la pathologie évolue tel que l'âge du patient, le contexte social ou encore les comorbidités (Pavord et al., 2016).

Elles sont majoritairement déclenchées par des infections virales, bactériennes voire les deux en même temps. Les bactéries les plus souvent impliquées sont *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus Pneumoniae* et *Moraxella Catarrhalis*. Les pics de pollution sont aussi des éléments déclencheurs même si, le plus souvent, la cause des exacerbations n'est pas identifiée (Leung et al., 2017; Sriram et al., 2018).

Les exacerbations de type légères et modérées sont majoritaires et ne s'accompagnent pas de signes graves. Elles sont prises en charge directement par le médecin traitant et aucune exploration paraclinique n'est réalisée contrairement aux épisodes sévères nécessitant une hospitalisation. Dans ce cas, afin d'apprécier la gravité de la pathologie, poser un diagnostic et traiter le patient, les explorations paracliniques deviennent nécessaires.

4. Traitements

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour la BPCO, seuls les symptômes peuvent être diminués afin d'améliorer la qualité de vie et réduire le risque de mortalité lors d'épisodes d'exacerbation.

4.1. Etiologie

La première ligne de défense face à la BPCO est l'arrêt des causes menant à son apparition.

4.1.1. Prévention et sevrage du tabagisme

Depuis quelques années, les programmes de lutte anti tabagique se multiplient et s'associent à une évolution de la législation en faveur de l'interdiction de fumer notamment dans les lieux publics, près des écoles ou encore au travail. En effet, le tabac est dans les pays occidentaux la première cause de l'apparition de la BPCO et son sevrage est un moyen simple et efficace de réduire les risques de développer la pathologie ou de ralentir sa progression. Le personnel médical s'attache à conseiller les patients et à les prévenir de l'importance de l'arrêt du tabagisme. Si cela n'est pas suffisant, l'utilisation de produits de substitutions peut être proposée. La mise en contact avec des groupes de discussion ou des associations peut aussi être un élément d'aide au sevrage (**Tableau 4 ►**) (Schauer et al., 2016).

ACTION		
Ask about tobacco use	Interroger sur la consommation de tabac.	Identifier et documenter le statut tabagique de tous les patients à chaque visite.
Advise to quit	Conseiller l'arrêt du tabagisme.	D'une manière claire, ferme et personnalisée, proposer à chaque fumeur d'arrêter de fumer.
Assess willingness to make a quit attempt	Evaluer la motivation à l'arrêt du tabagisme.	Demander au patients 'il envisage d'arrêter de fumer.
Assist in quit attempt	Aider la tentative d'arrêt du tabagisme.	Pour le patient disposé à faire une tentative d'arrêt, proposer une guidance et une pharmacothérapie pour l'aider à arrêter de fumer.
Arrange followup	Organiser le suivi de l'aide au sevrage tabagique.	Proposer des temps de suivi commençant la première semaine après la date d'arrêt.

Tableau 4 : Modèle des 5A pour l'aide à l'arrêt du tabagisme.

(HAS, 2014)

4.1.2. Expositions professionnelles et pollution

Bien que les données sur le nombre de personnes atteintes de BPCO, après exposition professionnelle ou pollutions domestiques et extérieures, soient peu connues, des stratégies visant à réduire leurs impacts sont mises en place. En France, par exemple, le plan BPCO mis en place par le gouvernement prescrit des directives spécifiques aux médecins du travail afin de dépister et prévenir la pathologie dans les entreprises à risques.

4.2. Médicaments

Par la suite, et notamment lors d'épisodes d'exacerbations les traitements médicamenteux deviennent nécessaires. La prise en charge précoce de la BPCO permet de limiter le taux de mortalité. L'administration des traitements est très codifiée et fréquemment mise à jour par les comités d'experts nationaux et internationaux (Welte et al., 2015) (Figure 9 ►).

4.2.1. Bronchodilatateurs

Il existe deux familles principales de bronchodilatateurs : les β_2 -agonistes et les anticholinergiques pouvant être administrés seuls ou en combinaisons, essentiellement par voie inhalée. Ils sont prescrits en première intention et peuvent être utilisés à courte durée lors de périodes d'exacerbations ou en traitement de fond. Ils permettent à long terme de diminuer la

dyspnée et le nombre d'exacerbations sans forcément impacter significativement le VEMS (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; SPLF. Société de Pneumologie de Langue Française, 2003 ; Zysman et al., 2016).

4.2.2. Corticostéroïdes

Envisagée en deuxième intention, la corticothérapie inhalée n'est indiquée que dans le cas de BPCO avec exacerbations fréquentes et en association avec un bronchodilatateur de longue durée d'action. Une corticothérapie systémique de courte durée peut également être utilisée en cas d'exacerbation. La prise de corticoïdes systémiques au long cours est à proscrire compte-tenu d'une absence d'efficacité sur le plan respiratoire et de ses effets indésirables multiples (Fine et al., 1988; Higham et al., 2020).

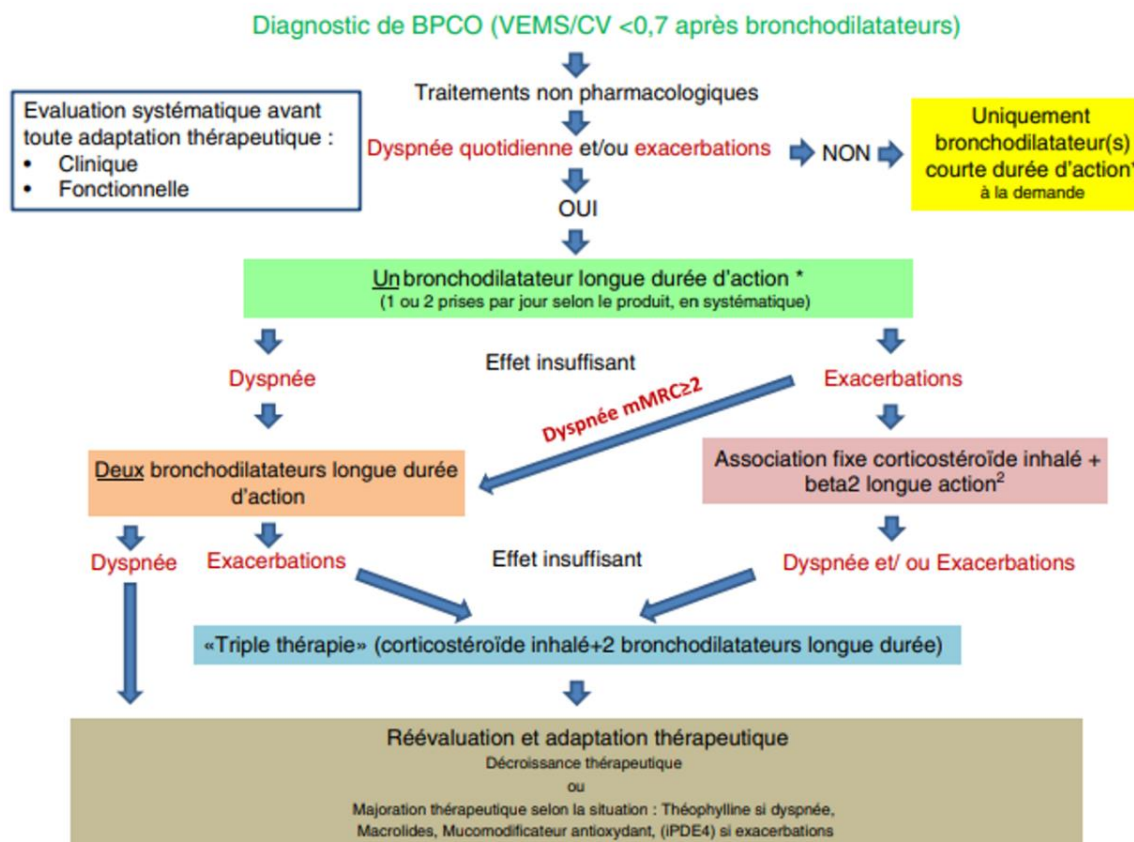


Figure 9 : Algorithme de prise en charge de la BPCO.

Du diagnostic à la thérapie.

(Zysman M et al., 2016)

4.2.3. Combinaison LABA/LAMA/CSI

Lorsque les exacerbations sont régulières il est impératif de les prévenir compte tenu de leur impact négatif sur le pronostic vital. Il est donc possible d'associer, pour un traitement à long terme les LABA (*Long Acting β_2 -Agonist*) avec les LAMA (*Long Acting Muscarinic Antagonist*). Les antimuscariniques sont des agents bloquant l'activité inhibitrice des récepteurs muscariniques sur l'acétylcholine. Dans le cas de la BPCO, ils sont utilisés car l'acétylcholine est connue pour provoquer une contraction des muscles lisses, en particulier au niveau des bronches. Une combinaison de bronchodilatateurs est prescrite quand ces derniers, seuls, ne donnent pas de résultats probants. Lorsque les exacerbations deviennent plus graves, il est possible de combiner les corticostéroïdes inhalés (CSI) avec les LABA voire d'envisager une triple thérapie LABA/LAMA/CSI (Horita et al., 2017; Vanfleteren et al., 2018) (**Figure 9 ◀**).

4.2.4. Antibiothérapies

La prise d'antibiotique est limitée aux périodes d'exacerbations et est requise lorsque la cause identifiée est d'origine bactérienne. L'expectoration associée à une infection bactérienne est le plus souvent purulente. Les antibiotiques utilisés en première intention sont l'amoxicilline (avec ou non de l'acide clavulanique), la pristinamycine ou encore les macrolides. Un antibiogramme peut être effectué par la suite afin d'optimiser l'efficacité des antibiotiques (Huckle et al., 2018; Mammen and Sethi, 2016)

4.3. Traitements non médicamenteux

D'autres types de traitements peuvent être exploités lorsque la sévérité se détériore ou dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de BPCO. Les traitements non médicamenteux sont des recommandations et des mesures d'hygiène visant à réduire les facteurs de risques menant à la pathologie. La prévention en passant par l'éducation pour la santé ouverte au grand public (campagne manger-bouger, lutte contre le tabagisme etc.) est un moyen efficace ayant déjà fait ses preuves pour plusieurs autres maladies (diabète, cholestérol, etc...).

4.3.1. Chirurgies

Dans certains cas et après sélection sur des critères cliniques définis, des patients peuvent subir des traitements chirurgicaux afin d'améliorer leur qualité de vie. Actuellement, quatre techniques conventionnelles sont proposées. Elles sont toutes en lien avec la présence d'un emphysème important.

4.3.1.1. *Chirurgies conventionnelles de la BPCO*

La première technique consiste en une chirurgie d'exérèse de bulle d'emphysème consistant à supprimer les bulles d'emphysèmes présentent au niveau des poumons après scanners thoraciques et identification de la présence des bulles ou de complication telle qu'un pneumothorax (Marchetti and Criner, 2015).

La seconde consiste en une chirurgie de réduction du volume pulmonaire, qui peut être réalisée dans une population très sélectionnée, sans comorbidité majeure et ayant un emphysème hétérogène prédominant aux sommets. Cette prise en charge est associée à une amélioration des capacités à l'exercice, mais associée à une morbidité et une mortalité non négligeable, raison pour laquelle elle est peu pratiquée actuellement (van Agteren et al., 2016).

La troisième, la chirurgie de transplantation, est quant à elle réalisée chez des patients jeunes (moins de 65 ans) et sans comorbidités majeures. Elle peut être réalisée en mono- ou bi-pulmonaire, et dans de rares cas en cœur-poumon. La balance bénéfique/risque doit être évaluée rigoureusement et discutée avec le patient (Siddiqui and Diamond, 2018).

Enfin, de nouvelles techniques de réduction de volume de l'emphysème par voie endobronchique ont été développées incluant les valves, les spirales et la vapeur thermique (Herth et al., 2019). La technique des valves endobronchiques a le plus haut niveau de preuve basé sur des études randomisées contrôlées. Trois à cinq valves unidirectionnelles, se fermant lors de l'inspiration et s'ouvrant à l'expiration, sont placées dans les voies respiratoires dans le but de réduire le volume du lobe traité. Le principe de cette technique est le même que celle de la réduction du volume pulmonaire mais avec un risque de morbidité-mortalité moins important (Dutau et al., 2019; Slebos et al., 2017).

4.3.1.2. *Méthodes novatrices*

Au-delà de ces techniques utilisées depuis plusieurs années, d'autres méthodes apparaissent afin de palier à certaines situations où les méthodes conventionnelles ne suffisent plus. En effet, la technique de dénervation du nerf parasympathique de manière ciblée dans le poumon est une nouvelle stratégie pour le traitement de la BPCO. Une fois dénervé, le nerf parasympathique diminue la sécrétion d'acétylcholine augmentant ainsi la bronchodilatation. Cette technique est effectuée par bronchoscopie et est peu invasive tout en améliorant la fonction respiratoire (Ramaswamy and Puchalski, 2018; Slebos et al., 2015, 2020; Valipour et al., 2018, 2019).

4.3.2. **Oxygénothérapie**

L'oxygénothérapie peut être prescrite à court terme ou à long terme (faite à domicile). Des études ont démontré que l'administration d'oxygène améliore la survie des patients en insuffisance respiratoire chronique, diminue l'hypertension pulmonaire et améliore la tolérance à l'effort. Prescrite lorsque la saturation pulsée en oxygène est inférieure à 88% elle a pour objectif de la faire remonter à 90%. Un contrôle régulier des gaz du sang doit cependant être effectué pour éviter les hypercapnies ou les acidoses respiratoires (Murphy et al., 2017; Stoller et al., 2010).

4.3.3. **Exercices physiques et éducation thérapeutique**

Les traitements médicamenteux s'accompagnent de programmes multidisciplinaires mis en place pour diminuer les symptômes et améliorer la qualité de vie. Ces programmes intègrent un réentraînement à l'effort (muscultation, gymnastique...) ou encore une éducation thérapeutique. Cette dernière a pour rôle de rendre le patient autonome face aux médicaments qu'il doit prendre et lui faire acquérir les compétences nécessaires pour gérer la maladie et en prévenir les complications (HAS, 2017).

5. Facteurs de risques et physiopathologie

Pour permettre une prise en charge optimale des patients, il est indispensable d'identifier les facteurs de risques associés à la pathologie et de comprendre l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la genèse de la BPCO.

5.1. Facteurs de risques

La BPCO est une maladie multifactorielle dont l'origine peut-être la conséquence d'un ensemble de facteurs de risques endogènes ou exogènes orientant les principales caractéristiques de la pathologie : l'inflammation, le remodelage et l'emphysème.

5.1.1. *In utero*

Les facteurs influençant le développement pulmonaire *in utero* ou dans l'enfance (infections respiratoires, allergies, asthme etc.) sont des facteurs de risques potentiels. Ils peuvent être d'origine externe et liés à l'environnement de la mère ou d'origine interne lors de mal formation du fœtus. Les deux origines étant complémentaires (Hylkema and Blacquière, 2009; Savran and Ulrik, 2018).

5.1.2. Génétique

Actuellement, le déficit en α -1 antitrypsine est le seul facteur de risque génétique associé au développement d'une BPCO (Greulich and Vogelmeier, 2016). Ce gène code pour une protéine qui est un inhibiteur de protéases à sérine. Elle est produite au niveau du foie et va permettre la protection du parenchyme pulmonaire contre les protéases. Son déficit révèle l'apparition d'un emphysème pulmonaire (Edgar et al., 2017; Falk and Briscoe, 1970; Hutchison et al., 1971).

De nombreuses études pangénomiques ont tenté d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la BPCO. L'analyse des polymorphismes génétiques a d'ailleurs mis en avant le lien entre des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (CHRNA3/5) ainsi que des éléments de la voie Hedgehog (HHIP : *Hedgehog interacting protein*) et la BPCO. La mutation de ces deux acteurs est liée au facteur tabagique et à la diminution de la fonction respiratoire (Pillai et al., 2009; van der Plaat et al., 2017; Xu et al., 2019). Cependant, et même si 22 gènes ont été identifiés comme potentiellement associés à la BPCO, aucune étude n'a été effectuée sur

l'implication physiologique de ces candidats dans la genèse de la pathologie (**Figure 10 ▼**) (Ragland et al., 2019).

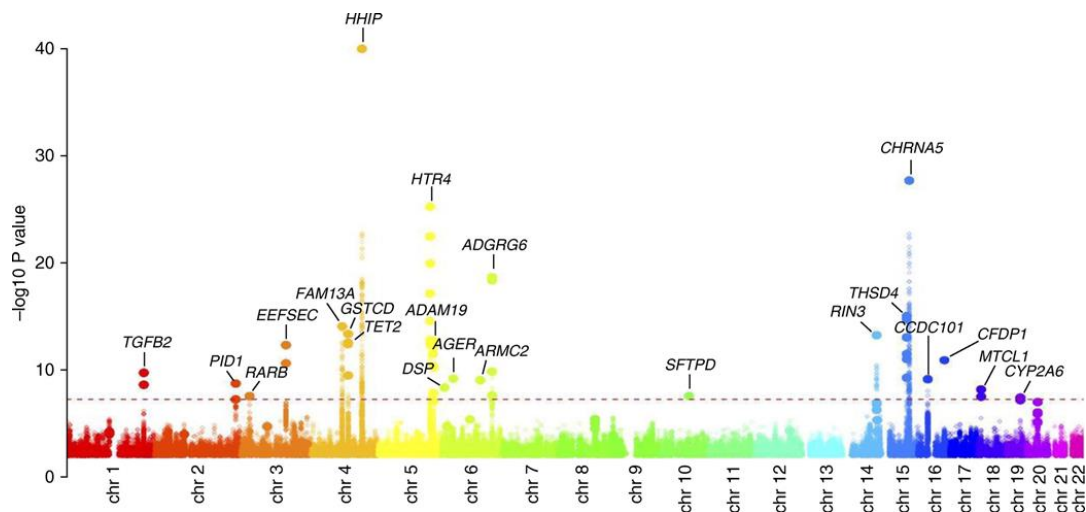


Figure 10 : Etude génomiques et BPCO.

Histogramme Manhattan de la distribution des polymorphismes génétiques sur l'ensemble des chromosomes humains en fonction de leur valeur prédictive d'association avec la BPCO.

(Ragland et al., 2019)

5.1.3. Tabagisme

Les fumeurs présentent un taux de mortalité global 1,5 fois plus important que les non-fumeurs. Les effets nocifs du tabac sont principalement dus au monoxyde de carbone qui présente une affinité plus grande pour l'hémoglobine comparé à l'oxygène. Les produits irritants présents dans la cigarette provoquent à terme des lésions épithéliales et inflammatoires au niveau des voies aériennes pouvant entraîner différentes pathologies comme les cancers ou encore la BPCO (Borgerding and Klus, 2005). C'est ainsi que le tabac est de loin le principal facteur de risque (> 80%) de la BPCO en Europe et en Amérique du Nord (OMS, 2017).

La fumée de cigarette est composée de plus de 4000 composés chimiques dont 250 sont classés comme dangereux pour la santé et plus de 50 comme cancérigènes. Cette fumée est caractérisée par trois types de courants : le courant primaire correspondant à la fumée inhalée (fumée principale du tabac), le courant secondaire résultant d'une consommation de la cigarette par l'air environnemental et se dégageant entre deux bouffées, et enfin le courant tertiaire

correspondant à la fumée inhalée par le fumeur et qui présente les particules de fumée de tabac restées en suspension. Cette dernière est aussi responsable du tabagisme passif.

Le premier courant est majoritairement composés d'éléments inorganiques tels que l'azote, l'eau, de monoxyde de carbone, d'oxydes nitriques, de métaux (plomb et mercure), de composés organiques (méthane, naphtalène, nitrosamines ou encore goudron) ainsi que d'additifs et d'agents de combustion (nitrates) (Borgerding et al., 2012). Le second courant contient un mélange d'agents chimiques complexes formés de plusieurs milliers de produits sous formes gazeuses ou particulières émis lors de la combustion complète du tabac. A plus basse température, la combustion peut être incomplète et produire des concentrations plus importantes des éléments cancérigènes tels que les nitrosamines. Cette fumée contient aussi plus de monoxyde de carbone et d'ammoniac que la fumée primaire la rendant plus toxique (Behera et al., 2014). Enfin le courant tertiaire, responsable du tabagisme passif représente la fumée rejetée par le fumeur ainsi que les particules dues à la combustion de la cigarette qui sont restées en suspension dans l'air (Figueiró et al., 2016; Torres et al., 2018).

Cet ensemble de composés toxiques et réactifs présent dans la fumée de cigarette est responsable des lésions produites au niveau des voies aériennes (Talhout et al., 2011). En effet, des études montrent que le tabac influe négativement sur l'homéostasie de l'épithélium et du parenchyme pulmonaire rendant surprenant le fait que seulement 20% des fumeurs développent une BPCO. En effet, il existe un effet dose dépendant entre la fumée de cigarette inhalée et les phénomènes d'apoptose, de prolifération cellulaire mais aussi sur le stress oxydatif, les dommages sur l'ADN ou encore la perte de l'intégrité de l'épithélium (Murray et al., 2017; Thorley and Tetley, 2007). Plus spécifiquement, l'acroléine et les aldéhydes présents dans la fumée de cigarette sont toxiques pour les cellules ciliées, cellules nécessaires au maintien de l'homéostasie pulmonaire (Rahman, 2002). Cependant, il est suggéré que l'épithélium pulmonaire, par différents mécanismes de défenses et de réparation, limite les dommages provoqués et maintient dans la plupart des cas une bonne fonction pulmonaire. Chez les personnes atteintes de BPCO, l'arrêt du tabagisme réduit le déclin de la fonction respiratoire et explique que le sevrage tabagique fait partie des soins de première ligne contre la pathologie qui reste néanmoins irréversible (Agrawal et al., 2019).

5.1.4. Pollutions

La fumée de tabac et sa nocivité représente un facteur de risque majeur de la BPCO dans notre pays, cependant d'autres éléments ont été reconnus par le rapport GOLD comme des facteurs de risque mineur, notamment l'exposition d'origine professionnelle ou encore les particules de pollution (Diette et al., 2012). Ces risques sont majoritaires dans les pays asiatiques, présentant peu d'alternative à l'utilisation de combustibles domestiques (cuisine, chauffage). Ces pays sont aussi marqués par un grand nombre d'usines avec une protection moindre du salarié face aux polluants et où l'éducation pour la santé n'est pas encore accessible à tous (Rosenberg et al., 2015).

L'exposition à des aérocontaminants d'origine professionnelle est incriminée dans au moins 15% des cas de BPCO (Hu et al., 2006). L'Inserm évoque différents métiers à risque dont le secteur minier (silice, oxyde de fer) (Marine et al., 1988), le secteur du bâtiment ou des travaux publics (Bergdahl et al., 2004), le secteur agricole (pesticides) (Guillien et al., 2016) ou encore la fonderie/sidérurgie (métal) et les métiers du textile. Ces différents travailleurs sont exposés chroniquement à des particules ou des gaz de différentes origines (organique, non-organiques, bactérie, virus...) et à long terme développent des lésions bronchopulmonaires.

La pollution domestique est composée en grande partie de la combustion de biomasse (charbon, bois, fuel) utilisée pour la cuisson des aliments ou le chauffage. La présence d'humidité, ou de moisissures, représentent aussi des facteurs de risques aggravant de la BPCO (Bruce et al., 2000). L'exposition à ce type de pollution se fait à long terme et à tout âge rendant ses conséquences plus importantes que la pollution atmosphérique. Estimée comme causant 1 à 2% des cas de BPCO en Amérique du nord et en Europe, cette pollution urbaine et rurale est aussi un facteur de risque jouant un rôle notamment dans le déclenchement des exacerbations. Le pourcentage étant beaucoup plus élevé dans les pays asiatiques.

Les lésions provoquées par les différentes pollutions restent tout de même histologiquement différentes. Alors que les lésions provoquées par la fumée de cigarette provoquent autant d'emphysème que de bronchites les autres pollutions sont caractérisées par la composante bronchite principalement. Cela serait principalement imputable à l'inspiration plus profonde prise lors la consommation de tabac (Rivera et al., 2008).

5.1.5. Socio-économique

Plusieurs études démontrent une corrélation entre la fonction pulmonaire et les facteurs socio-économiques (Hegewald and Crapo, 2007; Rocha et al., 2019). Le fait d'habiter dans un pays pauvre avec une politique de santé peu développée, de travailler en usines et d'habiter dans un lieu propice à la pollution domestique et urbaine augmente le risque d'infections respiratoires et diminue l'accès aux soins. Dans les pays plus riches, où le tabagisme est la principale cause de BPCO, ce sont les femmes qui sont plus atteintes, elles présentent une altération bronchique plus importante que les hommes. Plus sujette à la dépression ou encore l'anxiété, les femmes ont une qualité de vie plus altérée (Deng and Song, 2018; Raheison et al., 2010). La compréhension plus poussée du lien entre ce facteur de risque et la BPCO pourrait permettre la mise en place de structures sociales qui viseraient à diminuer les inégalités face à la pathologie.

5.2. Physiopathologie de la BPCO

La BPCO est une maladie inflammatoire des voies aériennes caractérisée par la présence d'un remodelage (obstruction bronchique, fibrose bronchique) et une destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème) (**Figure 11 ►**). L'apparition de ces deux éléments est principalement due à la présence d'une inflammation chronique pulmonaire (Eapen et al., 2017). Les données disponibles sur la physiopathologie de la BPCO sont pour la majorité issues d'études effectuées sur les fumeurs. Il est donc probable qu'il existe des différences physiopathologiques pour les autres facteurs de risques notamment la pollution. Le phénotype, les comorbidités ou encore la progression de la maladie peuvent différer (Golpe et al., 2017).

La surproduction de mucus et le défaut de clairance mucociliaire sont des éléments importants dans la mise en place de l'obstruction bronchique. L'emphysème est quant à lui responsable de la destruction du parenchyme pulmonaire qui mène à une réduction de la surface d'échange gazeux au niveau des alvéoles et *in fine* une limitation de l'oxygénation. Le lien entre l'emphysème et les phénomènes d'obstruction peut être différent selon les patients. En effets, des données collectées lors d'une étude clinique chez des patients atteints de BPCO suggèrent deux progressions possibles. L'une faisant apparaître l'emphysème avant l'obstruction bronchique (70% des cas) et l'autre l'inverse (30% des cas) (Young et al., 2020). La

compréhension de la mise en place de ces mécanismes étant primordiale à la prise en charge de la maladie.

En conditions physiologiques l'épithélium des voies aériennes est capable de produire des molécules de défenses (défensines, lactoferrines, lysozymes etc...) mais en conditions pathologiques comme dans le cas d'une BPCO la production de ces molécules est altérée rendant les défenses immunitaires inefficaces.

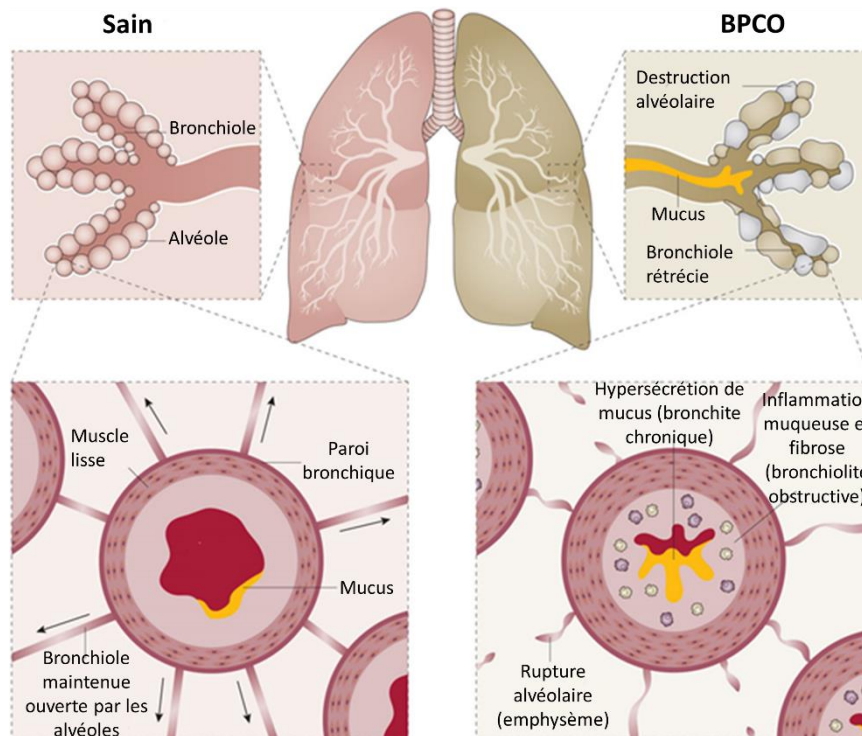


Figure 11 : Physiopathologie et limitation des flux aériens dans la BPCO.

(Barnes et al., 2015)

5.2.1. Inflammation chronique

L'inhalation d'agents nocifs comme ceux présents dans la fumée de cigarette engendre une réponse inflammatoire dans les voies respiratoires et les alvéoles faisant intervenir l'immunité innée et acquise. Diverses molécules, comme les protéases, sont produites afin de protéger l'épithélium. Cependant un équilibre protéases/anti-protéases maintient l'homéostasie pulmonaire. Dans la BPCO cette inflammation devient chronique et l'équilibre des molécules de défenses est altéré.

5.2.1.1. Cellules épithéliales et inflammation

Lors de lésions pulmonaires, les cellules de l'épithélium sont endommagées et un processus d'apoptose est initié. La dégradation de ces cellules entraîne la libération de motifs moléculaires particuliers nommés les DAMP pour *Damage-associated molecular patterns*. Ces motifs vont pouvoir être reconnus par les cellules avoisinantes via les récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptors*) entraînant le déclenchement d'une réponse immunitaire non spécifique (Pouwels et al., 2014). Cette réponse se traduit par la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les chimiokines, cytokines (TNF- α , IL-6, IL-8) ou encore des prostaglandines. Ces médiateurs vont à leur tour favoriser le recrutement d'autres cellules inflammatoires tissulaires ou circulantes maintenant ainsi l'inflammation au niveau des lésions. Les cellules épithéliales sont, par leur capacité à produire des motifs particuliers et des éléments pro-inflammatoires, des acteurs importants dans la mise en place et la persistance de l'inflammation lors d'agressions comme chez les patients atteints de BPCO (Brajer-Luftmann et al., 2019; Faiz et al., 2018).

5.2.1.2. Système immunitaire et inflammation

La libération de molécules endogènes associées à la présence de pathogènes par les cellules au niveau d'une lésion des voies aériennes entraîne une réponse du système immunitaire (SI). En effet dans la BPCO l'altération de la régulation du SI joue un rôle important dans l'apparition de l'emphysème (Cosio et al., 2009).

C'est le SI inné qui intervient le premier avec un rôle important des cellules dendritiques. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes capables de reconnaître des substances nocives exogènes (particules aéro-contaminantes, virus, bactéries...) et d'activer une réponse du SI rapide. Un lien entre la sévérité de la BPCO et le nombre de cellules dendritiques activées a d'ailleurs été établi. En effet, les patients malade présentent un nombre accru de ces cellules dans la circulation sanguine (Brajer-Luftmann et al., 2019; Faiz et al., 2018). De la même façon, des études ont montré un taux de macrophages plus élevé chez les patients BPCO. Recrutés parmi les premiers éléments de la réponse inflammatoire ils sont à leur tour capable de recruter et d'exprimer des molécules aggravant l'inflammation. Plus spécifiquement, les macrophages alvéolaires sécrètent des protéases électrolytiques comme les MMPs (2, 9 et 12) ou l'élastase initiant ou aggravant l'emphysème (Nakajima et al., 2016; Russell et al., 2002; Yamasaki and Eeden, 2018). Enfin, les polynucléaires neutrophiles,

première défense de l'organisme grâce à leur capacité de phagocytose et de sécrétion (protéases, molécules antimicrobiennes, dérivés réactifs de l'oxygène) semblent altérés dans la BPCO. Malgré leur nombre important chez les patients, les épisodes d'exacerbations restent fréquents, suggérant que la balance entre les molécules anti-inflammatoires/pro-inflammatoires bascule en faveur de la seconde composante et aggrave ainsi l'emphysème pulmonaire (Hoenderdos and Condliffe, 2013; Jaroenpool et al., 2016).

Plusieurs études ont démontré la présence de nombreux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ en lien avec l'obstruction bronchique et la destruction alvéolaire chez les patients présentant une BPCO (Barnes, 2016; Peres et al., 2018). Lors d'épisodes d'exacerbations ils permettent le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative contre les différents pathogènes assurant ainsi la protection du poumon. Cependant, lorsque leur nombre est trop élevé, il y a production d'anticorps dirigés contre les cellules pulmonaires créant ainsi une réponse auto-immune destructrice (Feghali-Bostwick et al., 2008; Motz et al., 2008).

Outre l'épithélium, la dégradation de la matrice extracellulaire par les différentes molécules sécrétées par les éléments du système immunitaire engendre la production de peptides ayant une capacité pro-inflammatoire maintenant l'inflammation présente chez les patients BPCO (Akthar et al., 2015; Burgess and Weckmann, 2012; Ricard-Blum and Salza, 2014).

5.2.2. Stress-oxydatif

Le stress-oxydatif est lié à la présence de molécules oxydantes dans les voies aériennes provenant de la réponse inflammatoire ou d'éléments exogènes inhalés. Comme pour les molécules de l'inflammation ou les protéases, il existe un équilibre entre le nombre de molécules oxydantes/antioxydantes. Une altération en faveur des molécules oxydantes génère des lésions épithéliales profondes par atteintes de l'ADN (Neofytou et al., 2012; Sturgill et al., 1985). Chez les patients BPCO, une altération de certains régulateurs de la production de molécules antioxydantes a été démontrée en lien avec une augmentation de l'emphysème et du maintien de l'inflammation (Fischer et al., 2015; Kirkham and Barnes, 2013).

5.2.3. Remodelage de l'épithélium

Le déséquilibre des différentes balances évoquées précédemment pour donner suite aux lésions ou encore les mutations induites par l'ensemble des facteurs exogènes conduisent à des changements phénotypiques de l'épithélium et du parenchyme. Ces changements altèrent l'homéostasie pulmonaire et empêchent la réparation du tissu lésé en faveur d'un remodelage. Cette perte de la capacité de régénération entraîne une altération de la structure histologique et par conséquent une perte de fonction de l'épithélium.

L'épithélium respiratoire est d'abord une barrière physique, cependant il est nécessaire pour cette barrière d'assurer les échanges entre les compartiments intracellulaires et extracellulaires (ions, protéines...). Les jonctions cellulaires doivent conférer une certaine perméabilité à l'épithélium afin d'assurer ces échanges (Wittekindt, 2017). La perméabilité des jonctions dépend des protéines qui y sont présentes. L'organisation des jonctions peut ainsi changer et s'adapter afin d'être perméable aux solutés selon leur taille ou encore leur charge. La perte de l'étanchéité sélective des jonctions, principalement les jonctions serrées, peut entraîner une fuite non contrôlée de protéines de haut poids moléculaires dans les voies respiratoires. Au niveau des alvéoles, cette fuite cause des œdèmes alvéolaires responsables d'un syndrome de détresse respiratoire (Koval, 2013). Ce remodelage des jonctions est principalement dû aux facteurs sécrétés lors de l'inflammation tels que le TNF α . Il affecte les protéines jonctionnelles aussi bien en influant sur leur transcription que sur leur localisation. L'inhibition de la voie TNF α -NF κ B réduit d'ailleurs fortement le risque de lésion pulmonaire (Hardyman et al., 2013).

Les patients BPCO présentent aussi une hyperplasie des cellules basales ou encore une métaplasie malpighienne évoquant une altération de ces cellules essentielles. En effet par leurs capacités de différenciation et de prolifération elles peuvent donner les types cellulaires responsables de l'organisation structurelle et fonctionnelle de l'épithélium (cellules ciliées, mucipares ou renouvellement des cellules basales) (Rock et al., 2010). L'altération de cette capacité de régénération des cellules basales entraîne une modification du phénotype de l'épithélium qui perd ainsi sa fonction de protection. Des études montrent une diminution du nombre de cellules ciliées et à l'inverse une augmentation du nombre de cellules mucosécrétrices entraînant un déséquilibre de la clairance mucociliaire qui à son tour augmente l'obstruction bronchique et maintient la présence des pathogènes au niveau pulmonaire (Gohy et al., 2019). Cela peut s'expliquer en partie par une diminution de l'activité de la voie de

signalisation Notch chez les patients BPCO, voie impliquée dans la différenciation des cellules basales en cellules ciliées ou mucosécrétrices (Tilley et al., 2009; Tsao et al., 2009).

L'altération de la différenciation des cellules basales en cellules mucipares entraîne la présence d'hyperplasie des cellules mucosécrétrices participant à la mise en place et l'augmentation de l'obstruction bronchique. Il a été décrit chez les patients BPCO une augmentation des mucines principales Muc5ac et Muc5b (Caramori et al., 2009; Kirkham et al., 2008) modifiant ainsi la composition du mucus. Cette altération couplée à une diminution de l'activité du canal CFTR, responsable de l'hydratation du mucus, provoquent un changement osmotique entraînant un écrasement des cils moteurs et une augmentation des infections (De Rose et al., 2018; Ghosh et al., 2015).

Enfin, outre l'épithélium, les conséquences des différents changements fonctionnels et de l'inflammation entraînent une destruction du parenchyme pulmonaire par l'emphysème. Cela se traduit par un élargissement anormal des espaces alvéolaires et une destruction de leur paroi. Les principales molécules responsables sont les protéases, notamment les MMPs dont le nombre et l'activité est augmenté chez les patients BPCO. Parmi elles se trouvent des collagénases, gélatinases ou encore des élastases qui détruisent les parois alvéolaires générant à leur tour des matrikines qui perpétuent l'inflammation et aggravent la limitation du débit respiratoire (Gilowska et al., 2018; Wells et al., 2015).

Ce chapitre met en lumière la complexité de l'identification, de la prise en charge et de la compréhension de la physiopathologie de la BPCO. Afin de remédier au retard qu'accuse aujourd'hui les professionnels de santé et les chercheurs il est indispensable de mieux comprendre les éléments menant à la genèse de la pathologie. Ainsi l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la BPCO pourrait aider au diagnostic voire à la mise en place de nouvelles thérapeutiques. L'une des pistes est la voie Hedgehog impliquée dans le développement du poumon et dont la dérégulation est responsable de nombreuses maladies humaines.

Chapitre III : La voie

Hedgehog

1. Généralités

La voie Hedgehog (HH) est une voie de signalisation découverte en 1980 par screening de mutants chez la drosophile (*Drosophila Melanogaster*). Longtemps connue pour son implication durant le développement, elle est aujourd'hui le sujet de nombreux travaux portant sur son implication chez l'adulte aussi bien en physiologie qu'en physiopathologie (Carballo et al., 2018; Lees et al., 2005; Petrova and Joyner, 2014).

Le nom Hedgehog a été donné pour la ressemblance du mutant *hh* de la drosophile avec un hérisson (Wieschaus and Nüsslein-Volhard, 2016). La conservation de cette voie durant l'évolution souligne son importance. Trois orthologues de ce gène ont été retrouvés chez les vertébrés, deux portent le nom de races de hérisson : Desert et Indian, le dernier porte le nom d'un jeu vidéo populaire à l'époque et lui-même ressemblant à un hérisson : Sonic. La voie régule de multiples processus tels que la prolifération, la différenciation et est impliquée dans le développement et le maintien de nombreux organes.

2. Acteurs de la voie Hedgehog et signalisation

Les composants de la voie HH ont d'abord été identifiés chez la drosophile puis les orthologues ont été recherchés chez d'autres espèces. Les mécanismes de la voie d'action sont bien connus pour la drosophile mais restent encore à élucider chez les vertébrés et notamment chez l'Homme, le modèle d'étude courant étant la souris (**Tableau 5 ▼**).

Gène chez la drosophile	Gène chez l'Homme	Fonctions
Hedgehog (<i>hh</i>)	Shh, Ihh, Dhh	Ligand
Patched (<i>ptc</i>)	Ptc1, Ptc2	Réception du signal et inhibition de Smoothened
Smoothened (<i>smo</i>)	Smo	Transduction du signal
Costal2 (<i>cos2</i>)	Kif27/Kif7	Transduction du signal Interaction avec Ci/Glis
Suppresseur de fused (<i>sufu</i>)	Sufu	Stabilisation de Ci/Glis
Cubitus interruptus (<i>ci</i>)	Gli1, Gli2, Gli3	Activateur ou répresseur de la voie HH
PKA CKI GSK3β	PKA CKI GSK3β	Phosphorylation de Ci/Glis, Sufu, Smo

Tableau 5 : Comparaison fonctionnelle de quelques membres de la voie HH entre la drosophile et l'Homme.

(Adapté de Wilson et Chuang, 2010)

Le nombre d'acteurs appartenant à la voie ayant augmenté chez les mammifères, la voie HH semble avoir gagné en complexité. La voie principale est la voie canonique nécessitant l'ensemble des acteurs principaux (**Figure 12 ▼**).

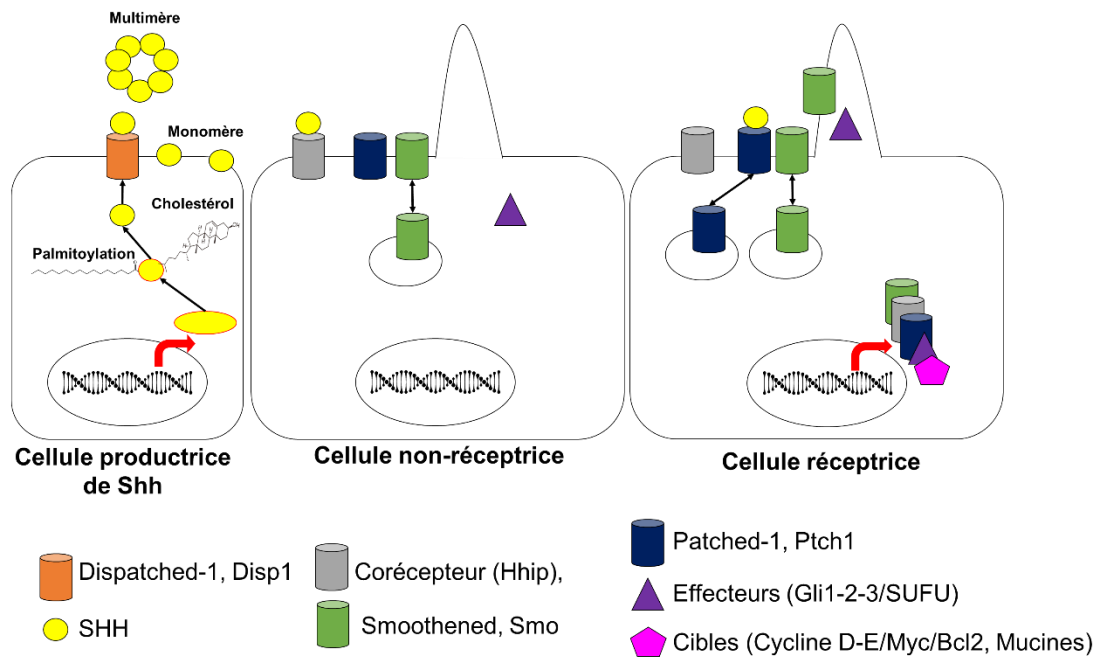


Figure 12 : Schéma de la voie de signalisation Hedgehog chez l'Homme.

2.1. Les ligands : synthèse, sécrétion et diffusion du morphogène

Les ligands de la voie HH sont des morphogènes sécrétés déterminant le comportement et les fonctions cellulaires de manières différentielles en formant un gradient de concentration le long de l'axe des cellules réceptrices du ligand. Les deux premiers ligands de la voie HH présentent une expression localisée. En effet *Ihh* (*Indian Hedgehog*) contrôle la croissance cartilagineuse et osseuse (Amano et al., 2020; Karp et al., 2000) et *Dhh* (*Desert Hedgehog*) contrôle le développement des cellules germinales des testicules, la spermatogenèse ainsi que la mise en place et le maintien des nerfs périphériques (Bitgood et al., 1996; Parmantier et al., 1999; Sharghi-Namini et al., 2006). A l'inverse *Shh* (*Sonic Hedgehog*) est ubiquitaire et régule de nombreux éléments durant le développement et la vie adulte. Tous les ligands sont capables d'initier l'activation de la voie HH même si l'amplitude d'activation diffère. À concentration identique, le *Shh* a un potentiel activateur plus important que l'*Ihh*, lui-même plus que le *Dhh* (Pathi et al., 2001).

Le Shh est synthétisé sous forme d'un précurseur de 45kDa avant de subir différentes modifications post-transcriptionnelles au niveau du golgi, la forme fonctionnelle étant la forme sécrétée (Lee et al., 1994; Porter et al., 1995).

La première étape de maturation consiste en une auto-protéolyse de la protéine en C-terminale grâce à une activité autocatalytique du précurseur. Deux peptides, l'un de 26kDa et l'autre de 19kDa, sont libérés dans le cytoplasme. Ce dernier subit une attaque nucléophile sur le motif conservé « Gly-Cys-Phe » par une molécule de cholestérol en C-terminal. Puis une acétyltransférase transmembranaire ajoute un motif palmitoyl en N-terminale (Chen et al., 2004). Ces modifications lipidiques par ajout d'un cholestérol et d'une palmitoylation sont indispensables et nécessaires à l'activité de la protéine et à son ancrage à la membrane (Koleva et al., 2015). En effet, des études ont montré que l'absence de ces modifications entraîne une baisse significative de l'activité de la voie HH (Chen et al., 2004).

Une fois la protéine mature, elle migre vers la membrane plasmique afin d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire. Le ligand Shh agit de manière autocrine mais aussi et surtout paracrine. Sa sécrétion dépend de la protéine Dispatched-1 (Disp1). Disp1 est une protéine transmembranaire faisant partie de la famille de récepteurs à 12 domaines transmembranaires. Elle possède un domaine SSD (*sterol sensing domain*) sensible au stérol (Kugler et al., 2015). Le Shh ayant subi les modifications lipidiques va donc pouvoir se lier à Disp1 et se diriger vers la membrane. Une altération de la protéine Disp1 entraîne une accumulation du ligand à la membrane et une absence de sa sécrétion. Cette conséquence se répercute principalement sur l'effet paracrine du ligand (Tian et al., 2005; Tukachinsky et al., 2012).

Les molécules de Shh sont capables de se lier entre elles afin de former des multimères. Ces complexes sont plus stables et possèdent une activité plus importante que le Shh monomérique. Ils sont d'ailleurs décrits comme étant responsables de l'activité à longue distance du Shh (Chen et al., 2004; Etheridge et al., 2010; Farzan et al., 2008). Pour former des multimères, plusieurs monomères se lient entre eux et introduisent dans leurs complexes des lipoprotéines. Afin de rester solubles dans le milieu extracellulaire, les parties lipidiques hydrophobes sont masquées à l'intérieur du complexe. La diffusion de ces multimères sur de longue distance est aussi dépendante d'autres molécules telles que les glypicans, qui vont agir sur la stabilisation du complexe. Il est intéressant de noter que ce mécanisme d'action est différent selon les espèces, la drosophile ayant peu l'utilité d'une signalisation à longue distance compte tenu de sa taille.

2.2. Réception du signal

Les cellules capables de lier le ligand Shh et de transduire le signal de la voie HH possèdent deux principaux récepteurs activateurs. Le contrôle de la voie se fait quant à lui par la présence de corécepteurs inhibiteurs. La détermination des cellules capables de répondre ou de réprimer la voie n'est pas complètement élucidée.

2.2.1. Les récepteurs activateurs

Une fois le ligand produit et sécrété, différentes cellules sont capables de réceptionner le signal, soit dans un but d'activer la signalisation HH soit à l'inverse pour l'inhiber. La balance entre ces deux mécanismes est essentielle pour l'homéostasie de la voie et des phénomènes qu'elle régule.

2.2.1.1. Récepteur Patched-1

Le récepteur Patched-1 (Ptch1) est une protéine clé de la voie de 145kDa. Il possède 12 domaines transmembranaires composés de deux boucles hydrophiles extracellulaires et une extrémité carbo et amino-terminal intracellulaire. Il comprend un domaine SSD indispensable à sa fonction ainsi que cinq domaines centraux transmembranaires conservés. Le récepteur possède une structure particulière regroupant plusieurs récepteurs sous le nom de la famille des *Patched-Related Protein* (dont Disp1) (Qi et al., 2018).

Le Shh est capté entre les deux boucles extracellulaires et d'autres corécepteurs interviennent pour stabiliser la liaison Shh-Ptch1 (Cdo, Boc) (Allen et al., 2011; Barnes et al., 2005). Lorsque le ligand est absent, Ptch1 inhibe le récepteur Smo (*smoothened*) responsable de l'activation de la voie. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la relation entre Smo et Ptch1. La première étant une inhibition par contact direct entre les récepteurs, cependant elle fut rapidement réfutée car il n'existe pas de rapport stœchiométrique entre les deux, une mole de récepteur Ptch1 peut inhiber 50 moles de Smo (Taipale et al., 2002). La seconde hypothèse, propose un rôle de Ptch1 sur le contrôle d'internalisation de groupes lipidiques, dont le cholestérol, affectant le transport de Smo à la membrane ou son changement de conformation (Bidet et al., 2011).

2.2.1.2. Récepteur Smoothened

Lorsque le ligand se lie au récepteur Ptch1, ce dernier lève son inhibition sur Smo qui change de conformation et devient actif. C'est un récepteur composé de 7 domaines

transmembranaires et faisant partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Il contient 4 régions extracellulaires conservées riches en cystéines et pouvant former des ponts disulfures impliqués dans son changement de conformation. Cette structure se complète par 7 hélices transmembranaires et 4 régions cytoplasmiques moins conservées dans l'évolution (Hedger et al., 2019). La principale différence notée entre la drosophile et les vertébrés sur l'activation de la voie HH par Smo, est la nécessité du cil primaire chez les vertébrés (Kim et al., 2015; Wang et al., 2009). Des études menées sur la drosophile et la souris ont démontré la présence d'un motif de localisation au cil primaire sur le domaine carboxy-terminal du récepteur Smo chez la souris uniquement (Corbit et al., 2005). Une fois que le récepteur Smo a changé de conformation, à la suite de l'attachement du ligand sur Ptch1, il se transloque au niveau du cil primaire où il va pouvoir initier une cascade de signalisation cellulaire poursuivant l'activation de la voie HH.

2.2.2. Les corécepteurs inhibiteurs

Le corécepteur Hhip ou *Hedgehog interacting protein*, reconnu comme inhibiteur de la voie, est capable de se lier aux ligands de la voie HH mais impacte préférentiellement la signalisation médiée par Ihh ou Shh. Il ne porte pas le nom de récepteur car aucune signalisation en aval, au niveau cytoplasmique, n'est induite par Hhip après sa liaison avec le ligand (Bosanac et al., 2009).

Lorsque Hhip lie le ligand, l'activation de la voie HH est réduite. Il entre en compétition avec le récepteur Ptch1 pour la réception du ligand. Ce récepteur a été identifié comme important pour le développement pulmonaire et spécifiquement pour la mise en place des ramifications pulmonaires. Les souris Hhip *-/-* présentent une forte létalité néonatale ainsi que des problèmes respiratoires. Son inhibition provoque une augmentation de l'activité de la voie HH révélant son rôle d'inhibiteur (Chuang and McMahon, 1999; Chuang et al., 2003).

Il existe d'autres protéines jouant le rôle de corécepteur inhibiteur comme le glypican-3 (GPC3). Cette protéine fait partie des 6 membres de glypicans décrit chez les mammifères. Ce sont des protéoglycanes liés à la membrane plasmique. GPC3 est capable de se lier de manière compétitive au Shh présent dans le milieu extracellulaire réduisant sa disponibilité pour le récepteur Ptch1. Une fois lié, le complexe GPC3-Shh est endocyté et dégradé diminuant ainsi l'activité de la voie HH (Capurro et al., 2015, 2008). Il est fort probable que d'autres molécules

influent sur la mise en disponibilité du Shh pour les récepteurs activateurs mais ils sont pour le moment non identifiés ou leur mécanisme d'action peu connu.

2.3. Transduction du signal

Lorsque le Shh est capté par le récepteur Ptch1 et que le récepteur Smo est libéré et transloqué au cil primaire la voie HH est activée. Cette activation nécessite l'implication de plusieurs protéines ou de complexes protéiques agissant de manière spécifique et coordonnée.

La première protéine appartenant à la famille des kinésines, KIF7 est dépendante du cil primaire. Situé à sa base, lors de l'activation de la voie, elle migre dans le cil où elle se fixe sur Smo et permet l'activation de facteurs de transcription, les Glis (Endoh-Yamagami et al., 2009).

Découvert pour la première fois dans un glioblastome humain (Pavletich and Pabo, 1993), les Glis, au nombre de trois chez les vertébrés contre un seul chez la drosophile, sont des facteurs de transcriptions (FT) appartenant à la famille des FT à doigt de zinc de type C2H2 (Hatayama and Aruga, 2012). Ce sont les activateurs directs des gènes cibles de la voie HH. Alors que Gli1 a été décrit comme uniquement capable d'activer la voie, Gli2 et Gli3 sont bifonctionnels et possèdent un domaine en N-terminal pouvant être clivé dans le protéasome et leur confère un rôle de répresseur de la voie. Le domaine N-terminal libéré va pouvoir se diriger dans le noyau et interagir avec des corépresseurs et limiter la transduction du signal. Il faut noter que c'est l'un des rares cas de dégradation partielle ayant lieu dans le protéasome (Wang and Price, 2008).

Les Glis, en absence de ligand, sont complexés dans le cytoplasme par la protéine Sufu (*Suppressor of Fused protein*) qui les séquestrent hors du noyau (Jia et al., 2009). Alors qu'elle joue un rôle marginal chez la drosophile, cette protéine de 53kDa chaperonne les Glis et coordonne leur transport jusqu'au protéasome pour permettre leur dégradation ou la formation de la forme répressive, principalement celle de Gli3 (Pan et al., 2009). Cette inhibition de la voie est aussi médiée par des phosphorylations de trois kinases, la PKA (*Protein Kinase A*), CKI (*Casein Kinase I*) et la GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) (Chen et al., 2011; Liu, 2019).

Gli2 est le principal FT activateur de la voie et Gli1 est un activateur secondaire de la signalisation (Bai et al., 2002). La balance Gli2A/Gli3R est essentielle dans le contrôle de l'activation de la voie (Petrova et al., 2013).

2.4. Cibles et effecteurs de la voie HH

Importés dans le noyau, les Glis exercent leurs activités d'activateur ou d'inhibiteur de la voie, en se liant à des corépresseurs ou en liant l'ADN via leur domaine en doigt de zinc. La complexité de cette signalisation repose sur son double rôle, en effet les FT sont capables de réguler chacun des éléments de la voie HH en plus d'autres cibles. Ce rétrocontrôle pouvant être aussi bien positif que négatif reste crucial pour le maintien de la voie et de l'homéostasie cellulaire qu'elle régule (Barrett et al., 2008; Ribes and Briscoe, 2009; Sanial et al., 2017). Les cibles, même si elles ne sont pas toutes parfaitement définies, sont essentiellement associées aux phénomènes de prolifération, de survie et d'entrée dans le cycle cellulaire tels que la cycline-D, n-myc, bcl2 ou encore snail (Katoh and Katoh, 2009; Duman-Scheel et al., 2002; Kenney et al., 2003; Regl et al., 2004; Li et al., 2006). D'autres cibles sont transcrites uniquement selon l'organe considéré comme les mucines au niveau des voies aériennes (Xu et al., 2018).

L'étude par cristallographie des différents acteurs de la voie a permis d'élucider de nombreuses questions en lien avec la conformation des protéines ainsi que leurs interactions. Ces études ont permis le développement de molécules inhibitrices à visé thérapeutique, elles-mêmes exploitées par la recherche fondamentale pour mieux caractériser les mécanismes cellulaires associés à l'activation de la voie HH (Kong et al., 2019; Kowatsch et al., 2019).

La voie décrite précédemment est la voie canonique de la signalisation HH, en effet elle passe par le ligand, les récepteurs Ptch1 et Smo ainsi que les FT Glis. Cependant l'inhibition du ligand, des FT ou encore des Glis n'empêche pas une activité de la voie HH supposant la possibilité d'autres moyens d'activation et l'implication d'autres protéines. Deux autres modalités d'initier la signalisation ont été décrit : la voie non-canonique ligand dépendante, où la transduction du signal se fait avec le ligand Shh en passant ou non par les récepteurs mais sans action des Glis ; ainsi qu'une voie non-canonique ligand indépendante, où un signal autre que Shh active les Glis en passant ou non par les récepteurs.

3. Voie Hedgehog et développement

Découverte lors d'étude du processus de développement de la drosophile, l'implication de la voie HH chez les vertébrés a été rapidement mise en évidence. En effet, une aberration du fonctionnement de la voie chez le fœtus entraîne de graves malformations (Abramyan, 2019;

Briscoe and Thérond, 2013). Cependant, les études contribuant à comprendre les mécanismes de la voie durant le développement chez les vertébrés sont effectuées chez les rongeurs principalement, remettant en question une fois de plus la différence inter-espèce.

3.1. Organogenèse et morphogenèse

La voie HH participe à un large spectre de processus cellulaires fondamentaux nécessaires à la survie. Chez l'Homme elle est responsable de la polarité dorso-ventrale du tube neural, de la différenciation antéro-postérieure du fœtus ou encore de l'asymétrie droite/gauche des organes. En plus d'influencer la mise en place de l'ensemble du fœtus, elle contribue aux développements d'autres organes comme les poumons ou encore le cerveau (De Luca et al., 2016; Johnson et al., 1994; Yang and Niswander, 1995).

3.2. Développement pulmonaire

Le Shh est un morphogène crucial du développement qui régule les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme, permet la mise en place des ramifications bronchiques et influence la différenciation des cellules basales. Le développement pulmonaire en 5 stades est orchestré par un ensemble de voie de signalisation, de facteurs de croissances ainsi que d'autres éléments de la matrice extracellulaire. L'importance de la voie HH dans ces événements a été démontrée d'une part chez la souris via la mutation de gènes et étudié dans de nombreuses pathologies pulmonaires chez l'Homme. Seul un article démontre la présence de l'ensemble des principaux acteurs de la voie HH chez l'embryon humain (Zhang et al., 2010).

Le Shh murin est exprimé très tôt chez le fœtus, 10 jours (E10) après le début de la gestation et spécifiquement dans la partie distale des bourgeons pulmonaires où il forme un gradient de concentration qui sera responsable de la polarisation du poumon (**Figure 13 ►**). A E16, le Shh est exprimé aussi bien en proximal qu'en distal mais limité aux cellules les moins différenciées comme les cellules basales (Kugler et al., 2015). Le récepteur Ptch1 est quant à lui exprimé peu après le ligand à environs E11,5 autour et en face des bourgeons dans la partie distale. Hhip est exclusivement exprimé au niveau mésenchymateux en dessous des régions exprimant le Shh appuyant le concept d'interaction entre l'épithélium et le mésenchyme. Des études effectuées sur des souris shh^{-/-} ont démontré l'importance de la voie HH pour la mise en place des ramifications pulmonaires. En effet, les souris mutées, présentent uniquement un lobe et des malformations importantes de la trachée. Cependant, selon le moment à laquelle la

mutation est active, les conséquences sur le développement sont plus ou moins graves supposant une régulation spatio-temporelle cruciale du morphogène. Par ailleurs, des études ont révélé que la voie HH régule d'autres voies importantes pour le développement du poumon. En effet le Shh restreint le Fgf10 exprimé par le mésenchyme et régulant lui aussi la voie HH en l'inhibant et en limitant la prolifération cellulaire pour permettre une ramification optimale. À l'inverse, il est lui-même régulé par d'autres voies : Wnt5A inhibe la voie HH en affectant le Shh et le récepteur Ptch1 (Li et al., 2005).

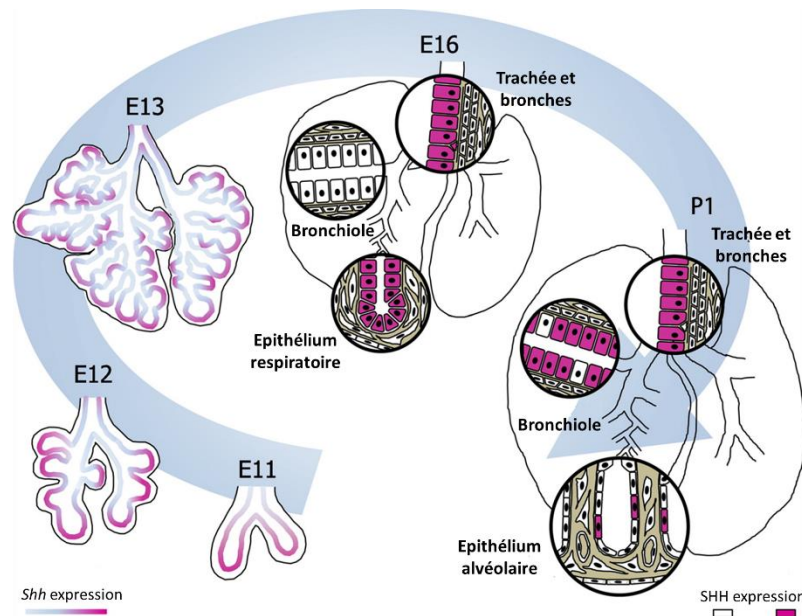


Figure 13 : Voie Hedgehog et développement chez la souris.

Du développement à la vie adulte

(D'après Kugler et al., 2015)

La dernière étape du développement pulmonaire, l'alvéolisation commence peu avant la naissance et continue jusqu'à l'âge de 10 ans et requiert aussi la voie HH. Des travaux ont démontré que la signalisation HH est en partie responsable de l'alvéolisation et de la maturation des alvéoles. L'absence de la voie provoque notamment une dysplasie broncho-pulmonaire chez la souris, l'une des maladies graves affectant les nouveau-nés mais dont le lien avec la voie HH chez l'Homme n'a pas encore été établi (Dang et al., 2012).

4. Homéostasie chez l'adulte

Le rôle de la voie HH est clairement déterminant lors de la morphogenèse des organes mais qu'en est-il de l'expression des acteurs de cette voie lorsque l'organisme est fonctionnel ?

4.1. Généralités

Le concept de biologie régénérative repose sur la réémergence de voies de développement durant les processus de réparation, mais la réalité étant que ces voies, notamment la voie HH ne semblent jamais avoir été désactivées. Ces voies semblent être réorientées chez l'adulte pour maintenir des fonctions cellulaires en fonction des organes. De nombreuses études récentes montrent que la voie HH joue un rôle dans la signalisation maintenant les cellules souches et progénitrices au sein de différents organes comme le cerveau (Ahn and Joyner, 2005; Ihrle et al., 2011), la peau ou encore la vessie (Shin et al., 2011). La signalisation HH est un facteur clé dans la régulation des tissus adultes agissant en coopération avec d'autres voies pour contrôler le devenir des cellules et le maintien de la plasticité cellulaire.

4.2. Quiescence et réparation pulmonaire

La voie HH semble avoir un rôle bien défini durant le développement et plusieurs travaux tendent à montrer son implication dans le poumon adulte.

Le Shh est le ligand prédominant dans le poumon adulte, il est exprimé à la fois au niveau des voies aériennes proximales et distales (Peng et al., 2015; Wang et al., 2018). D'autres études identifient la présence du ligand et d'autres acteurs de la voie dans le stroma, notamment des cellules Gli2+, réceptrices du signal (Liu et al., 2013). L'activité Shh au niveau du stroma pulmonaire semble diminuée de manière proximo-distale, appuyant l'hypothèse du rôle de la signalisation HH dans la signature génétique des compartiments pulmonaires (Wang et al., 2018).

Le rôle de la voie HH dans le poumon adulte est surtout décrite pour son implication dans l'alvéogenèse. Alors que cette voie participe à l'alvéogenèse post-natale, elle semble maintenir l'homéostasie alvéolaire en agissant sur les PnII via le stroma chez l'adulte (Frank et al., 2016). Le faible taux de Shh régule le stroma environnant par rétroaction en inhibant son expansion. La suppression du Shh épithélial au niveau alvéolaire entraîne une expansion du stroma adjacent et une diminution du rôle des PnII dans l'auto-renouvellement et la

différenciation (Peng et al., 2015). A l'inverse, une surexpression de la voie HH dans ce compartiment entraîne l'apparition d'emphysème. Une autre étude révèle la présence des éléments de la voie notamment Gli2 ou encore Ptch1 au niveau des cils moteurs des cellules multiciliées (Mao et al., 2018). Un rôle senseur des cils moteurs en contact direct avec la lumière bronchique a été suggéré. En présence de pathogènes ou d'une altération du mucus, la voie HH serait activée afin de limiter le risque de lésions et de réparer l'épithélium, rôle non présent durant le développement.

D'autres travaux révèlent un potentiel rôle protecteur de Hhip dans les poumons par son activité répressive de la voie (Castaldi et al., 2014).

Le Shh et la voie de signalisation associée ne doivent donc pas être complètement éliminés ni surexprimés afin de maintenir une quiescence pulmonaire. Ainsi dans le poumon adulte, la voie HH est présente et régule les interactions épithélio-mésenchymateuses pour maintenir l'homéostasie tissulaire.

Des susceptibilités physiologiques ou génétiques peuvent modifier l'activité de la voie HH et perturber le processus d'homéostasie conduisant, dans le cas du poumon, à des phénomènes d'emphysème, de fibrose ou encore d'obstruction bronchique.

5. Pathologies associées à la voie Hedgehog

5.1. Maladies congénitales

Il existe différentes mutations congénitales provoquant une expression constitutive de la voie HH qui mènent à des malformations lors du développement. Plusieurs pathologies sont liées à cette surexpression de la voie notamment au niveau du cerveau ; des malformations sévères comme l'holoprésencéphalie ou encore la cyclopie y sont associées (Chiang et al., 1996; Dubourg et al., 2007; Roessler et al., 1996).

5.2. Atteintes chez l'adulte

La voie HH est cruciale pour le développement et l'homéostasie des organes, il est donc compréhensible que la dérégulation d'un des mécanismes de la signalisation participe à la genèse de pathologies.

5.2.1. Voie HH et oncogénèse

Les premières études de l'implication de la voie HH et une aberration de sa signalisation ont été mise en évidence dans un panel de cancers chez l'adulte comme le médulloblastome, le carcinome basocellulaire, le cancer du rein, de l'œsophage, le cancer gastrique, le cancer du pancréas, du sein ou encore du poumon (Dormoy et al., 2009; Skoda et al., 2018; Zeng and Ju, 2018).

5.2.1.1. *Les différents types de cancers*

De nombreuses voies de signalisation impliquées dans le développement sont réactivées dans différents cancers. En effet, les cellules cancéreuses présentent un caractère dédifférencié se comportant comme les cellules au cours du développement. Une aberration de la signalisation liée à la voie HH engendre une dérégulation de la prolifération, de la migration ou encore de la différenciation pouvant mener ou accentuer la croissance tumorale. Quatre classes de cancers en lien avec la voie HH ont été décrit (Scales and de Sauvage, 2009).

Le type I est caractérisé par des mutations en aval du ligand sur les acteurs de la voie comme Ptch1, Smo ou encore les Glis. C'est un type ligand-indépendant. Le type II, implique une activation de la voie autocrine dépendante du ligand. Le type III, ligand dépendant aussi, mais avec un effet paracrine de la voie HH qui maintient le développement du microenvironnement de la tumeur par production de facteurs de croissance. Enfin le type IV implique une sécrétion du ligand par le stroma environnant stimulant les cellules cancéreuses proches.

Le premier lien effectué avec l'oncogénèse concernait le carcinome basocellulaire ou encore le médulloblastome à la suite d'une mutation activatrice de la voie HH. Dans le premier cas par exemple, la surexpression de la voie HH engendre une prolifération anormale des cellules basales (Bale and Yu, 2001; Booth, 1999).

L'implication de la voie HH dans les cancers a permis le développement de nombreux inhibiteurs. Le but premier étant thérapeutique, ces inhibiteurs ont constitué des outils moléculaires pour comprendre les mécanismes de mise en place et d'action de la voie.

5.2.1.2. Les inhibiteurs de la voie HH

La cyclopamine fût le premier inhibiteur de la voie HH, un alcaloïde extrait de la plante *Veratum californicum*. Il a été découvert après qu'un agneau dont la mère avait mangé la plante durant la gestation ait présenté une cyclopie. En effet, cette molécule est capable de se fixer sur Smo et d'inhiber sa translocation au cil et donc l'activation des FT. Cependant, en raison d'une faible biodisponibilité et de sa toxicité, cette molécule n'a pas été utilisée en thérapeutique. Par la suite, d'autres dérivés de la molécule ont été conçus et testés dans des modèles pré-cliniques (**Figure 14 ▼**). Parmi ces molécules, un anticorps est aussi utilisé, l'AB5E1, qui empêche la liaison du ligand à son récepteur (Bariwal et al., 2019; Zhang et al., 2017).

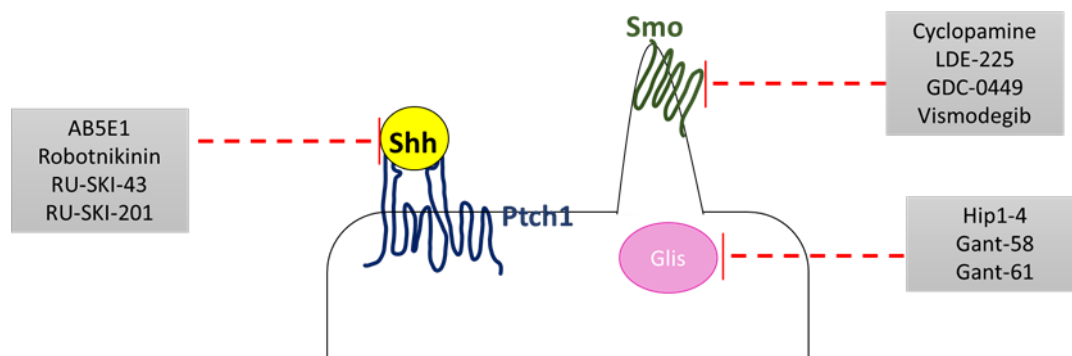


Figure 14 : Exemples d'inhibiteurs de la voie Hedgehog.

5.2.2. Pathologies pulmonaires

Les données recueillies depuis quelques années indiquent une forte implication de la signalisation HH chez l'adulte en plus de son rôle durant le développement. Une aberration des voies de signalisation lors du développement peut impacter la susceptibilité de développer des pathologies (Gluckman et al., 2008). Par ailleurs, des phénomènes génétiques ou épigénétiques chez l'adulte peuvent engendrer une dérégulation de la voie impactant ainsi son rôle dans la quiescence et la réparation pulmonaire.

5.2.2.1. Fibrose pulmonaire et asthme

La fibrose pulmonaire est une maladie évolutive, d'étiologie inconnue, caractérisée par une perte de l'architecture et de la fonction alvéolaire (Gross and Hunninghake, 2001). Le poumon des patients atteint de fibrose est caractérisé par la présence anormalement élevée de myofibroblastes et d'une accumulation de matrice extracellulaire menant à la destruction des

alvéoles. Diverses voies du développement sont altérées chez ces patients notamment la voie HH. Des études démontrent une surexpression de la voie dans les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires (Cigna et al., 2012; Coon et al., 2006; Stewart et al., 2003). Cette régulation positive de la voie HH entraîne une altération de la communication entre l'épithélium et le stroma environnant empêchant la réparation et favorisant l'expansion des cellules et la stimulation de l'angiogenèse (Fernandez and Eickelberg, 2012). Les études indiquent une aberration entre les cellules exprimant et réceptionnant le Shh. En effet le récepteur Ptch1 et le FT Gli1 sont surexprimés augmentant la prolifération et protégeant de l'apoptose induite par le TNF α ou encore l'IFN γ (Bolaños et al., 2012). L'ensemble de ces phénomènes liés à la dérégulation de la voie HH entretient la fibrose chez les patients.

De la même manière, les asthmatiques présentent une surexpression de la voie HH, notamment du ligand Shh. L'asthme est une maladie respiratoire chronique due à une inflammation constante des bronches. Elle se manifeste notamment par des crises caractérisées par des épisodes de gênes respiratoires, de toux sèches ou encore de sensation d'oppression au niveau de la poitrine. Les patients présentent une inflammation des voies aériennes et une obstruction bronchique (Mims, 2015). La surexpression de la voie HH chez ces patients engendre un remodelage des voies aériennes en lien avec une augmentation des cytokines (Il-4/Il-13) (Wang et al., 2020). Ces cytokines sont capables à leur tour de recruter et d'activer des polynucléaires éosinophiles impliqués dans la réponse allergique et entretenant l'inflammation (Wang et al., 2019). Par ailleurs, des études pangénomiques ont associé des régions proches du gène HHIP avec une anomalie de la fonction respiratoire chez les asthmatiques (Li et al., 2011).

5.2.2.2. *BPCO*

D'autres études pangénomiques suggèrent l'influence du gène HHIP dans l'obstruction bronchique chez les patients BPCO indépendamment du tabagisme, expliquant en partie le faible nombre de fumeur développant la pathologie (Pillai et al., 2009; Zhou et al., 2012). La majorité des différents variants de HHIP semble en partie liée à la diminution de la fonction respiratoire dans la BPCO. Par ailleurs, le polymorphisme rs13118928 du gène HHIP a été récemment lié au phénotype emphysémateux de la BPCO (Bártholo et al., 2019; Kim et al., 2013). Il semblerait ainsi que la voie HH joue un rôle important dans la BPCO, cependant aucune étude n'a été effectuée afin de comprendre le lien entre les acteurs de la voie et la physiopathologie dans ce contexte.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La BPCO est une pathologie respiratoire progressive caractérisée par un remodelage des voies aériennes et une inflammation chronique entraînant des lésions irréversibles des épithéliums pulmonaires. Le principal facteur de risque de la BPCO est le tabagisme, afin de mieux comprendre les lésions profondes engendrées par la fumée de cigarette des études d'associations génétiques pangénomiques ont été effectuées. Cependant un faible nombre de polymorphismes est identifié mais l'ensemble des études converge vers l'altération du gène HHIP codant pour la protéine du même nom et membre de la voie HH en association à la BPCO. Par ailleurs, la voie HH est décrite comme étant impliquée dans le développement pulmonaire et durant la vie adulte en condition d'homéostasie ou dans la mise en place de pathologies respiratoires. En effet, la voie est surexprimée chez les patients atteints de fibrose pulmonaire ou d'asthme. Enfin, le cil primaire est nécessaire à la signalisation HH et notre laboratoire a mis en évidence une augmentation des cellules possédant un cil primaire chez les patients BPCO (Perotin et al., 2018).

Considérant (i) l'organogenèse pulmonaire et son homéostasie, (ii) la physiopathologie de la BPCO, et (iii) l'ensemble des fonctions de la voie HH, le but de ce projet de thèse a donc été d'évaluer l'implication de la voie HH dans la BPCO. Pour ce faire nous avons pour objectifs :

- D'étudier l'implication de la voie HH durant la différenciation d'un épithélium respiratoire en caractérisant la présence des éléments de la voie à différentes étapes *in vitro* en concomitance avec les marqueurs de cellules basales, ciliées et mucosécrétrices,
- De déterminer l'impact de l'altération de la voie durant la différenciation en utilisant un inhibiteur de la voie HH (AB5E1),
- D'identifier les acteurs de la voie HH sur des tissus issus de patients ne présentant pas de pathologies respiratoires ou une BPCO et d'en comparer la localisation et l'expression,
- De mesurer chez les patients atteints ou non de BPCO l'activation de la voie dans un contexte de fibroscopie endobronchique dans le but d'établir un biomarqueur de la pathologie.

Au cours de ce travail nous nous sommes focalisés sur les principaux acteurs de la voie soit le ligand Shh, les récepteurs Smo et Ptch1 et les FT Glis. Dans le but d'établir l'intégrité

de l'épithélium et une différenciation épithéliale nous avons utilisé les marqueurs connus soit p63 et Ck5 (cellules basales); FoxJ1 (ciliogénèse); Muc5ac et Muc5b (cellules mucosécrétrices) ainsi que la mesure de l'intégrité épithéliale par RTE.

Les différentes investigations ont été menées sur plusieurs sources de matériel biologique. La dissociation et la mise en culture de cellules, en interface air-liquide (IAL), issues de polypes nasaux a permis l'étude de la voie HH durant la différenciation et après inhibition. La présence des acteurs de la voie HH a été révélée par des analyses transcriptomiques par RT-qPCR et protéomique par western blot, ELISA et immunomarquage. Enfin des tissus pulmonaires inclus en paraffine de patients BPCO ou non ont permis l'observation des éléments de la voie HH au sein de l'épithélium des voies aériennes adultes.

Par ailleurs, et dans le but de confirmer nos premiers résultats, des fibroscopies endobronchiques ont été effectuées sur des patients BPCO ou non, sans autres pathologies respiratoires associées. Des brossages bronchiques, biopsies ainsi que des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été collectés. Des cultures *in vitro*, ainsi que des analyses transcriptomiques et protéomiques identiques à la première partie de notre étude ont été réalisées afin de comprendre le rôle de la voie HH dans la BPCO.

MATERIELS ET

METHODES

1. Caractéristiques des patients et recrutement

1.1. Caractérisation clinique

Le recrutement a eu lieu dans le service de Pneumologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Reims dans le cadre de la cohorte Recherche et Innovation en Pathologie Respiratoire Inflammatoire (RINNOPARI, NCT02924818), avec obtention de l'accord du CPP et de l'ANSM.

Les patients témoins (n = 30) sont définis par une absence de trouble ventilatoire aux Explorations Fonctionnelles Respiratoires (EFR). Il s'agit de patients bénéficiant d'un bilan respiratoire approfondi pour divers symptômes (hémoptysie, toux chronique, dyspnée, nodule(s) pulmonaire(s)) et qui ont été invités à participer à l'étude en l'absence de pathologie respiratoire chronique ou aiguë au décours de ce bilan. Les patients BPCO (n = 28) sont définis classiquement sur la base de données cliniques et spirométriques dont un rapport Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde (VEMS) / Capacité Vitale Forcée (CVF) < 0,70 après bronchodilatation (Ho et al., 2019).

La sévérité de la BPCO est déterminée selon la classification spirométrique (GOLD 1 : $VEF_1 \geq 80\%$, GOLD 2 : $VEF_1 \leq 50\%$, GOLD 3 : $VEF_1 \leq 30\%$, GOLD 4 : $VEF_1 < 30\%$).

Ne sont pas inclus tout patient ayant présenté un épisode aigu, dont une exacerbation respiratoire dans les 4 semaines précédant l'inclusion. Les critères d'exclusions comportent : asthme, tuberculose ou autre pathologie respiratoire chronique, notamment bronchique (dilatation des bronches). Aucun patient n'était traité par immunosuppresseur. Les anciens fumeurs sont considérés comme tel après une période d'au moins 6 mois sans cigarettes.

A la date d'inclusion, chaque sujet bénéficie d'une biologie sanguine, Gaz du sang (GDS), EFR (spirométrie, pléthysmographie et mesure de la Diffusion Alvéolo-Capillaire au monoxyde de Carbone (DLCO), éventuel test de réversibilité bronchique en cas de TVO), un entretien et examen clinique avec un investigateur, un Examen Cytobactériologique des Crachats (ECBC) induit ainsi qu'une fibroscopie bronchique souple sous anesthésie locale lorsque c'était possible. Un auto-questionnaire est également complété le jour de l'inclusion comportant des échelles et scores classiques de symptômes respiratoires et de qualité de vie. A l'aide d'un registre préétabli, des données standardisées sont recueillies, telles que les informations démographiques, le tabagisme, le nombre de Paquet-Année (PA = nombre de paquet moyen par jour x le nombre d'année de tabagisme effectif), les éventuelles expositions

professionnelles, les traitements par voie orale, parentérale et/ou inhalée, ainsi que le rythme des exacerbations et/ou hospitalisation sur les 12 derniers mois et leurs modalités de prise en charge. Chaque patient a remis un consentement éclairé et écrit, après lecture d'une note d'information et d'explication par l'investigateur. Quand cela était possible et selon les recommandations internationales, en routine clinique, une fibroscopie bronchique permettant d'obtenir des brossages bronchiques, des biopsies et des lavages broncho-alvéolaire (LBA) a été effectués. Le recueil, l'analyse et l'anonymisation des données ont été réalisées conformément à la Loi de Santé publique N°2004-806 du 9 août 2004 ; des Directives Européennes 2001/20/CE et loi n°2004-801 du 6 août 2004, relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel selon les recommandations de la CNIL. Les prélèvements biologiques, hors diagnostique, étaient transportés à l'unité Inserm UMR-S 1250 pour la réalisation des protocoles expérimentaux.

1.2. Caractérisation scanographique

Un scanner datant de moins de 6 mois est disponible pour tous les sujets et il est le plus souvent réalisé le jour même de l'inclusion. L'analyse est menée par deux investigateurs indépendants pour notamment caractériser l'emphysème dont l'étendu est par la suite quantifiée selon un score visuel, et chaque lobe classé distinctement en 5 catégories : aucun emphysème, < 25% ; 25-50% ; 50-75% et > 75% d'emphysème visible.

2. Echantillons biologiques

2.1. Fibroscopies bronchiques (Brossages et biopsies)

La totalité de l'examen est réalisée sous surveillance continue de la saturation pulsée en oxygène, de la fréquence cardiaque et de la tolérance clinique. La voie d'introduction nasale étant privilégiée. Une anesthésie locale étagée en nasale, oro-pharyngée, trachéale puis bronchique est administrée à l'aide de Xylocaïne® 1%. Après un premier temps consacré à une analyse macroscopique assurant l'absence de lésion endobronchique suspecte, un LBA est réalisé dans le territoire lobaire moyen suivant les recommandations de *l'American Thoracic Society*. Puis un brossage bronchique est réalisé dans chaque segment basal droit, soit trois brosses qui sont par la suite disposées dans du RPMI 1640 contenant 1 %

Pénicilline/Streptomycine (Sigma-Aldrich). Enfin, sont effectuées au moins deux biopsies à la pince en prélevant préférentiellement l'éperon lobaire moyen et un rameau d'un segment basal droit. Ces dernières sont fixées dans du formol 4 % jusqu'à utilisation.

Les cellules présentent sur les brosses bronchiques, réceptionnées après fibroscopie, sont remises en suspension de manière mécanique (frottement des brosses avec une pince stérile dans une boîte de pétri) dans du RPMI 1640 contenant 1 % Pénicilline/Streptomycine complétement avec du sérum de veau fœtal (SVF) suivi d'une centrifugation (2x 12500 RPM, 5 min). Le culot est par la suite repris durant une 1 min dans 1 mL de Trypsine Versène® avant une nouvelle centrifugation (12 500 RPM, 5 min). Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu de prolifération et comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez®. Les cellules sont soit mises en culture soit *cytopsinées* afin d'effectuer des marquages immunofluorescents selon les protocoles dédiés décrit ci-dessous.

2.2. Lavages broncho-alvéolaires (LBA)

Trois seringues de 50mL de NaCl 0,9% sont administrées puis récupérées successivement par aspiration douce manuelle. L'ordre d'administration est identifié séquentiellement de A à C (A correspondant à la première seringue recueillie). Les analyses de routine sont réalisées : bactériologiques, mycologiques et parasitaires ainsi que le décompte cellulaire (total et différentiel) de la fraction C, représentant l'étage alvéolaire. Un aliquote est envoyé en bactériologie pour analyse classique et culture exhaustive. Le restant de chaque fraction est par la suite centrifugé à 1300 RPM pendant 5 x 2 min. Le surnageant est récolté, aliquoté et immédiatement placé à -20°C tout comme le culot cellulaire.

2.3. Polypes nasaux

Les cellules utilisées pour la culture primaire sont issues de polypes nasaux de patients (n=11) après recueil de leur consentement éclairé, selon la réglementation en vigueur (Article L.1245-2 du code de la santé publique). Les tissus sont recueillis par les différents oto-rhino-laryngologistes collaborateurs du CHU de Reims ou de la Clinique Mutualiste de la Sagesse de Rennes et transférés au laboratoire dans du RPMI 1640 contenant 1 % Pénicilline/Streptomycine (Roswell Park Memorial Institute Medium, Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Des questionnaires portant sur la consommation tabagique ont été complétés au cours des consultations avec le chirurgien. Les données recueillies concernent le statut tabagique (non-fumeur, ex-fumeur ou fumeur actuel), la consommation en

paquets-années et la date d'arrêt de la consommation le cas échéant. Les prélèvements sont collectés après acceptation d'un consentement de la part des patients.

2.4. Tissus pulmonaires

Les tissus pulmonaires sont issus de patients atteints ou non de BPCO (n=40) caractérisés cliniquement par le service de pneumologie du CHU de Reims (IRB CHU-REIMS 20110612). Des fragments de bronches sont prélevés afin d'être inclus en paraffine (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE) ou en OCT (*Optimal Cutting Temperature*). Les blocs de tissus FFPE sont conservés à température ambiante et ceux en OCT à -80°C. Les blocs FFPE sont coupés grâce au microtome Thermo Scientific™ HM 340E. Les coupes sont réalisées à une épaisseur de 5 µm et déposées sur une goutte d'eau sur des lames adhésives Thermo Scientific™ SuperFrost Plus. Ces dernières sont conservées à température ambiante avant utilisation. Les blocs inclus en OCT sont coupés grâce au Cryostat Leica CM3050 S. Les coupes sont réalisées à une épaisseur de 10 µm, déposées sur des lames adhésives Thermo Scientific™ SuperFrost Plus et conservées à 4°C.

3. Culture cellulaire primaire

3.1. Différenciation de l'épithélium

Après lavage et dissociation mécanique succincte, les polypes sont digérés enzymatiquement pendant une nuit à 4°C, dans du milieu RPMI 1640-GlutaMAX-HEPES 25 mM supplémenté de 0,05% (p/v) de collagénase de type XIV de *Streptomyces griseus*. Les cellules sont ensuite centrifugées pour obtenir un culot cellulaire (5 min ; 1250 rpm), remises en suspension dans du milieu Pneumacult-Ex (PnC-EX, STEMCELL Technologies). Les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules automatique (ADAM, Labtech) puis ensemencées sur des plaques 12 puits contenant des inserts d'une porosité de 0.4µm (Corning, Fisher Scientific) recouverts de collagène IV (0,3 mg/mL) (Sigma-Aldrich) à hauteur de 200,000 de cellules dans 500 µl de PnC-EX. Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules sont cultivées dans du milieu PnC-EX jusqu'à confluence totale (**Figure 15 ►**). Le milieu de la chambre inférieure est alors remplacé par du milieu Pneumacult-ALI (PnC-ALI, STEMCELL Technologies) et la chambre

supérieure est laissée à l'air pour permettre la différenciation (culture à l'interface air-liquide, IAL). Les milieux sont changés tous les deux jours.

Une cinétique est effectuée en prélevant un puits tous les 7 jours après le passage en IAL jusqu'à IAL 35 correspondant à la fin de la différenciation (avec environ 75% de la surface de la membrane recouvert de cellules présentant des cils moteurs). La cinétique est aussi composée des surnageants de la chambre inférieure dit basaux (au moins 24 h de culture) et les surnageants apicaux (prélevés en déposant 250µl de PBS stérile sur la chambre supérieure) centrifugés à 1000 RPM, 10 min, 4°C et conservés à -20°C. Enfin les membranes contenant les cellules sont récupérées et divisées en deux parties, une moitié de membrane est congelée directement à -20°C pour les études protéomiques et transcriptomiques et une autre moitié est fixée au méthanol froid 100% pour réaliser des marquages immunologiques. L'ensemble des inserts fixés est conservé à -20°C avant utilisation.

3.2. Traitement des cellules et inhibitions de la voie Hedgehog

L'inhibition de la voie Hedgehog est établie en ajoutant au milieu basal l'anticorps AB5E1 (AB_2188307, Interchim, 1 µg/mL) dilué dans de l'eau stérile (Ericson et al., 1996; Maun et al., 2010; Pepinsky et al., 1998, 2000; Wang et al., 2000) qui capture le Shh dans le milieu (Alfaro et al., 2014; Bailey et al., 2008; Chaudary et al., 2017; Donnelly et al., 2013; Pascual et al., 2005; Xiao et al., 2010). L'anticorps est ajouté au milieu de culture à chaque changement de milieu, soit tous les deux jours. Dans le PnC-EX durant la phase de prolifération, aussi bien dans la chambre inférieure que supérieure ou dans le PnC-ALI durant la phase de différenciation uniquement dans la partie basale (**Figure 15 ▼**).

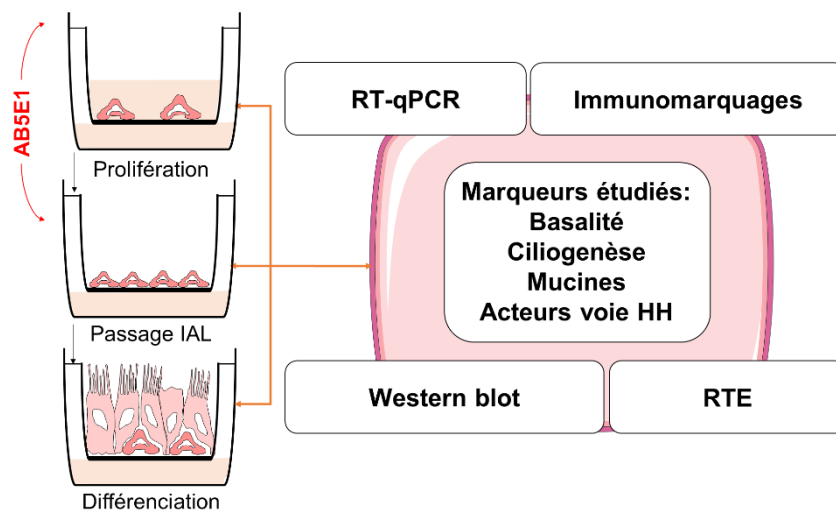


Figure 15 : Modèle de culture primaire en interface air-liquide et analyses de données.

3.3. Culture des fibroscopies

Les cellules en suspensions obtenues après dissociation mécanique des brosses sont déposées au même nombre et mises en culture de la même manière que les polypes nasaux. Une cinétique est aussi effectuée aux jours 7-14-21 et 35 d'IAL avec prélèvement des surnageants basaux et apicaux comme décrit précédemment.

4. Résistance transépithéliale

La résistance transépithéliale (RTE) est évaluée à chaque prélèvement d'insert c'est-à-dire tous les 7 jours en utilisant un tensiomètre EVOM2 couplé à une sonde STX2 (World Precision Instruments Hitchin) à température ambiante. La sonde est mise à équilibrée au préalable 1 h dans du PnC-ALI avant mesure. Chaque insert est déposé dans un puit contenant 1mL de PnC-ALI et 1mL est ajouté à la partie apicale avant d'effectuer trois mesures représentatives de la RTE. La résistance d'un insert, uniquement recouvert de collagène IV, est aussi mesurée pour servir de valeur de référence. La valeur de référence est soustraite à celle de l'échantillon et les résultats sont exprimés en résistance par unité de surface ($\Omega \times \text{cm}^2$).

5. Immunoprécipitation

Le complexe formé entre le Shh et le AB5E1 a été évalué par immunoprécipitation à l'aide de protéine G sépharose (P3296, Sigma Aldrich). L'anticorps d'intérêt ou des IgG de souris servant de contrôle négatif sont incubés, à différentes concentrations, dans 2 mL de PnC-ALI durant 24 h à 37 °C, 5% CO₂ dans des Eppendorfs. Puis ces derniers sont laissés une nuit à 4°C en rotation en présence de 100uL de billes de protéines G sépharose. L'immunocomplexe est isolé après une série de centrifugation (13,000g X 10 min à 4°C) puis lavé au PBS. L'analyse du complexe se fait par électrophorèse suivie d'une révélation en chemoluminescence.

6. Analyses transcriptomiques

6.1. RT-qPCR

6.1.1. Extraction des ARNs

Les ARNs totaux des cellules primaires cultivées sur les supports perméables sont extraits grâce au kit *High Pure RNA Isolation kit* (Roche Diagnostics GmbH) selon les recommandations du fabricant. En bref, les membranes congelées à sec à -20°C sont déposées

dans un tube collecteur puis mises en contact avec le tampon de lyse pour libérer les ARNs. La solution passe ensuite sur une colonne de purification et une première centrifugation permet la capture des ARNs dans la résine (15 sec ; 8000 g). Après une incubation de 15 min avec une solution de DNase à température ambiante, les ARNs retenus sur la colonne sont lavés 3 fois puis élués dans un volume final de 50µL d'eau stérile par centrifugation (1 min ; 13,000 g). La concentration des ARNs élués est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (NanoDrop-1000, Thermo Scientific). Les échantillons sont considérés comme fiables si le rapport 260/280 nm est d'environ 2,2 et si le rapport 260/230 nm est proche de 2. Les éluats contenant les ARNs sont conservés à -80°C.

6.1.2 Transcription inverse

Une transcription inverse des ARNs en ADNc est tout d'abord effectuée grâce au kit *Transcriptor First strand cDNA Synthesis* (Roche Applied Science). En bref, les hexamères aléatoires sont ajoutés aux échantillons d'ARNs pour une première incubation dans un thermocycleur (10 min ; 65°C). Un mix contenant un inhibiteur de RNase, dNTPs et Transcriptase inverse est ensuite ajouté pour une deuxième phase d'incubation dans le thermocycleur (10 min à 25°C ; 30 min à 55°C ; 5 min à 85°C). Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

6.1.3. Polymérisation en chaine quantitative

Les PCR quantitatives sont réalisées avec le kit *Fast Start Universal Probe Master* (Roche Applied Science) et l'appareil LightCycler 480 (Roche Applied Science), dans des plaques 96 puits selon les recommandations du fabricant. Les ADNc sont dilués au 1/2 et 250ng sont ajoutés en duplicata au mix contenant les amorces (20µM), la sonde spécifique des amorces et le tampon de réaction. Les séquences des amorces utilisées sont détaillées dans le **tableau 6** ►.

La plaque est ensuite filmée, centrifugée (1 min ; 1,000 g) puis insérée dans le LC480 pour le lancement du programme de PCR : préincubation (10 min, 95°C) ; amplification (10 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C ; 1 sec 72°C) sur 45 cycles et refroidissement (30 sec, 40°C).

Gènes	Amorces sens	Amorces antisens
GAPDH	5'-ACCAGGTGGTCTCTCTGAC-3'	5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'
CK5	5'-TTCATGAAGATGTTCTTTGATGC-3'	5'-AGGTTGCGGTTGTTGTCC-3'
GLI1	5'- CCAGCCAGAGAGACCAACAG-3'	5'- CCCGCTTCTTGGTCAACTT-3'
GLI2	5'- CTACCTCAACCCCGTGGAC-3'	5'-CTGAGAGTGGGGAGATGGAC-3'
GLI3	5'-ACATGGAATATCTTCATGCTATGG-3'	5'-GGTGATATGGACAGTGTACGTTTT-3'
PATCHED-1	5'-GGCCTGGCAGAGGACATA-3'	5'- GGAAAGCACCTTTTGAGTGG-3'
SMOOTHENED	5'-ATGGCACCATGAGGCTTG-3'	5'-GGGCGTAGTACACGATGACA-3'
SHH	5'-GCTTCGACTGGGTGTACTACG-3'	5'- GCCACCGAGTTCTCTGCT-3'
FOX-J1	5'-CAGATCCACCTGGCAGA-3',	5'-CGTACTGGGGGTCAATGC-3'
MUC5AC	5'-CACGTCCCCTTCAATATCCA-3'	5'-GGCCCAGGTCTCACCTTT-3'
MUC5B	5'-GTACAATGGCACCTTCTACGG-3'	5'-GTACAATGGCACCTTCTACGG-3'

Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'étude des différents gènes d'intérêts en PCR.

6.1.4. Analyses des données

Les résultats sont normalisés à l'expression du gène de ménage GAPDH puis une quantification relative rapportée aux cellules sans traitement correspondant à notre référence (Zuo et al., 2019). Pour établir les histogrammes de quantification relative, les données suivantes sont extraites :

- **Moyenne des CP** (*Crossing Point*, cycle seuil) des duplicats de réactions de PCR obtenus sur les courbes de fusion de chaque échantillon, (maximum entre deux duplicats 0,3 CP)
- $\Delta\Delta CP$: (CPgène cible traité – CP gène ménage traité) – (CPgène cible contrôle – CP gène ménage contrôle)
- $2^{-\Delta\Delta CP}$: ratio des expressions relatives. Cette valeur est utilisée pour les représentations graphiques en exprimant le log2 pour corriger sur d'éventuels écarts importants de niveau d'expression des transcrits. Les valeurs comprises entre 0,5 et -0,5 sont considérées sans variation par rapport à la situation contrôle.

6.2. Etude de cohortes indépendantes

Pour valider les observations faites, une analyse de l'expression des gènes du tissu pulmonaire humain a été effectuée à partir d'une cohorte indépendante (GSE47460) incluant 145 patients BPCO et 91 patients non-BPCO (Cruz et al., 2019; Scott et al., 2017).

7. Analyses protéomiques

7.1. Western-blot

Les protéines totales sont extraites avec du tampon RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) [Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Igepal 1% (v/v), deoxycholate de sodium 1% (p/v), iodoacetamide 5 mM et SDS 0,1% (v/v)] additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases complet (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Allemagne). Les lysats sont incubés sur glace pendant 15 min puis centrifugés à 4°C à 12 500 g pendant 10 min. Les surnageants protéiques sont recueillis et conservés à -80°C avant dosage et utilisation en western blot. Les échantillons sont dosés à l'aide du kit de dosage protéique *Biorad DC protein Assay Reagent Package* (Biorad, Hercules, CA, Etats-Unis) selon les recommandations du fournisseur. La lecture est réalisée à 750 nm avec un spectrophotomètre à microplaques *Multiskan® EX* (Thermo Scientific). Des dilutions en série de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Biorad) sont utilisées pour obtenir la gamme étalon (0 à 1000 µg/mL).

Selon les protéines détectées, 10 µg d'échantillons protéiques sont mélangés au tampon de charge Laemmli 5X contenant 5% (v/v) de β-mercaptoéthanol (Biorad) et dénaturés 5 min à 100°C dans un thermobloc. Les échantillons sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% (Euromedex) dans un tampon de migration [Tris 25 mM, Glycine 192 mM et SDS 0,1% (v/v)] à ampérage constant (20 mA). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF) (Perkin Elmer.), préalablement activée par du méthanol, sous l'effet d'un voltage constant (100V) dans un tampon de transfert [Tris 25 mM, Glycine 192 mM, MEOH 20% (v/v) et SDS 0,03% (v/v)] refroidi durant 1h. Après transfert, les membranes sont incubées 2 h sous agitation à température ambiante dans un tampon de blocage [PBS, Tween-20 0,1% (v/v) et lait écrémé lyophilisé 5% (p/v)]. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C sous agitation lente avec les anticorps primaires d'intérêts (**Tableau 7 ▼**). Après 1 rinçage de 15 min et 2 de 5 min dans du tampon [PBS, Tween-20 0,1% (v/v)], les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire adéquat

anti-lapin, chèvre ou anti-souris, conjugué à une HRP (horse raddish peroxydase) (1/1000ème) (Dako) pendant 1h à température ambiante dans l’obscurité. La révélation est réalisée à l’aide du kit *ECL Prime* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Royaume-Uni). Le signal chemoluminescent est ensuite détecté à l’aide de l’automate *Amersham imager 600* muni d’une caméra CCD refroidie à -30°C (GE Healthcare). L’analyse quantitative des signaux chemoluminescents obtenus est réalisée à l’aide du logiciel ImageJ. Les valeurs obtenues (unité arbitraire de densité de pixel) pour les protéines étudiées sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour le gène de ménage GAPDH.

Protéines	Anticorps	Espèces	Concentrations
Arl13b	1711-1-ap (ProteinTech)	Lapin	IF: 1/200
Acetyl-tubuline	T6793 (Sigma Aldrich)	Souris	IF: 1/1000
P63	AF1916 (R&D Systems)	Chèvre	IF : 1/100
GLI1	HPA065172 (Sigma Aldrich)	Lapin	IF : 1µg/mL
GLI1	AF3455 (R&D Systems)	Chèvre	WB : 1/1000
GLI2	HPA074275 (Sigma Aldrich)	Lapin	WB : 0.5µg/mL IF : 0,4µg/mL
GLI3	HPA005534 (Sigma Aldrich)	Lapin	WB : 0,6µg/mL IF : 0,6µg/mL
PATCHED-1	E-AB-10571 (Elabscience)	Lapin	WB : 1/500 IF : 1/100
SMOOTHENED	E-AB-12925 (Elabscience)	Lapin	IF : 1/50
SMOOTHENED	NBP2-24543 (Novus Biologicals)	Lapin	WB : 1µg/mL
SHH	AF464(R&D Systems)	Chèvre	WB : 1/300 IF : 1/100
FOX-J1	14-9965-82 (Ebioscience)	Souris	WB : 1/1000
MUC5AC	NBP2-15196 (Novus Biologicals)	Souris	IF : 1/100
MUC5B	E-AB-15988 (Elabscience)	Lapin	IF : 1/100
CK5	AB24647 (Abcam)	Lapin	WB : 1/500
DHH	13889-1-AP (ProteinTech)	Lapin	WB : 1/1000
IHH	13388-1-AP (ProteinTech)	Lapin	WB : 1/1000
GAPDH	Clone 6C5 (Millipore)	Souris	WB : 1/300 000

Tableau 7 : Listes des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages et pour les électrophorèses.

7.2. Extraction protéique fractionnée

Dans le but d’étudier l’expression protéique des molécules d’intérêt en fonction du compartiment cellulaire, le kit *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells* (Thermoscientific, 78840) a été utilisé. Il permet la séparation des protéines cytoplasmiques, membranaires, nucléaires solubles, nucléaires liées à la chromatiques et des protéines du

cytosquelette. En bref, les réactifs commerciaux sont ajoutés aux cellules avec des étapes de centrifugations selon les recommandations du fournisseur. Le premier réactif ajouté provoque une perméabilisation sélective de la membrane et libère le contenu cytoplasmique soluble. Le second dissout le plasma, les mitochondries et les membranes du golgi sans solubiliser les membranes nucléaires. Le troisième réactif permet la récupération des éléments nucléaires solubles alors que le quatrième, couplé avec une nucléase micrococcalle extrait les protéines nucléaires liées à la chromatine. Enfin le dernier réactif isole les protéines du cytosquelette. Chaque fraction est ensuite dosée et conservée à -20°C avant résolution par électrophorèse et révélation par chemoluminescence.

7.3. ELISA et étude du ligand Shh

La concentration en Shh dans les différentes fractions de LBA (A à C) ainsi que dans les surnageants des cultures de polypes non-traitées par AB5E1 a été mesurée par *Enzyme-linked Immunosorbent assay* (ELISA) en accord avec les recommandations techniques de RayBiotech (Norcross, GA ; ELH-ShhN-001). Sur une plaque de 96 puits, une gamme de Shh faite à l'aide des solutions fournies dans le kit ainsi que les échantillons sont déposés en duplicata à hauteur de 100µL par puit et laissés une nuit à 4°C sous agitation douce. La révélation est réalisée selon les réactifs du fournisseur, comportant un anticorps secondaire biotinilé, suivi de l'application de streptavidine. Le seuil de détection est de 8pg/mL. L'analyse est effectuée sur un lecteur de microplaques *Multiskan®* réglé sur une densité optique (DO) de 450nm.

8. Immunofluorescence et analyse par microscopie

8.1. Marquage des coupes en paraffine

Les lames de tissus pulmonaires FFPE sont incubées à 60°C pendant une nuit afin d'effectuer un pré-déparaffinage qui est finalisé par deux incubations au xylène (10 et 5 min). Les lames sont par la suite réhydratées par trois bains d'éthanol successifs de 3 min en concentrations décroissantes (100 %, 70% et 50%) suivi de deux rinçages à l'eau ultrapure de 3 min. Un démasquage des sites antigéniques est réalisé à l'autoclave en *Vector antigen unmasking solution* (tampon citrate, pH 6.0, 100X, code H3300, *Vector lab*) sur un cycle de 20 min à 120°C. Les lames sont rincées par la suite au PBS.

Si l'antigène recherché est non membranaire, une perméabilisation des cellules est réalisée avec du PBST (*Phosphate Buffered Saline, Triton X-100 0,1%*) (2 X 5 min), puis un rinçage au PBS est effectué. Les lames sont incubées 30 min à température ambiante dans une solution de blocage (PBST-BSA 10% si perméabilisation ou PBS-BSA 10%). Un premier anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 3% est incubé avec les tissus une nuit à 4°C. Le premier anticorps primaire est récupéré et 6 lavages de 3 min au PBS sont effectués. Un second anticorps primaire, d'espèce différente du premier, est dilué dans les mêmes conditions que le premier est déposé sur les coupes durant 1 h à température ambiante. De manière similaire, les lames sont lavées après récupération du second anticorps primaire. Le tissu est par la suite mis en contact 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière avec du DAPI (4',6-diamidino-2phénylindole, marquage nucléaire) et Ales anticorps secondaires correspondant dilués dans du PBST-BSA 3% ou PBS-BSA. Les lames sont lavées au PBS et montées avec des lamelles dans du liquide de montage Aqua-Poly/Mount (*Polysciences Europe GmbH*). La liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages est détaillée dans le **tableau 7**.

8.2. Marquage des coupes à froid et des *cytopins*

Le marquage des coupes à froids et des *cytopins* est similaire à celui de coupes tissulaires en FFPE. Cependant la première étape de déparaffinage est remplacée par une succession de lavage au PBS afin de réhydrater le tissu et de retirer l'OCT pour les coupes à froid. Le reste des étapes est identique au marquage FFPE.

8.3. Immunomarquage des membranes d'inserts

Les cellules primaires cultivées en IAL sur des membranes perméables sont prélevées à différents temps (0 à 35 jours après mise en IAL), découpées en 12ème et fixées au méthanol froid pendant 10 min à -20°C. Les fragments sont conservés dans des tubes Eppendorf à -20°C avant utilisation. Afin d'effectuer les marquages une réhydratation par trois bains successifs de 5 min avec des concentrations décroissantes de méthanol (75%, 50 % et 25%) dilué dans du PBT (PBS + 1% DMSO + 0.1% Triton 100X) est nécessaire. Elle est suivie par trois lavages au PBT de 10 min et un rinçage à l'eau pure avant une seconde perméabilisation à l'acétone froid (-20°C) de 7 min. Un nouveau rinçage à l'eau ultra pure est effectué suivi de trois bains au PBT de 10 min. Un blocage au PBT-BSA 10% de 2 h est réalisé à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C en présence du premier anticorps primaire dilué dans du PBT-BSA 3%. Après récupération de l'anticorps primaire, 6 lavages au PBT de

10 min se succèdent. Un second anticorps primaire dilué dans du PBT-BSA 3% est ajouté pour la nuit à 4°C. Après récupération de ce dernier, les membranes sont de nouveau rincées six fois 10 min au PBT. Ensuite, les anticorps secondaires correspondants sont incubés pendant 2 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. La liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages est détaillée dans le **tableau 7**. Les fragments sont également marqués au DAPI simultanément avec les anticorps secondaires. Les membranes sont lavées six fois au PBT, toujours à l'abri de la lumière avant d'être clarifiées par un mélange de glycérol/PBT dans 3 bains de 20 min chacun en concentrations croissantes (75% PBT/ 25% Glycérol ; 50% PBT/ 50% Glycérol et 25% PBT/ 75% Glycérol). Pour finir, les membranes sont montées entre lames et lamelles dans du liquide de montage *Aqua-poly/Mount* et mis sous poids durant une nuit. Avant observation microscopique, elles restent conservées à 4°C.

8.4. Analyses par microscopie

Les images sont acquises à l'aide d'un microscope à épifluorescence Axioimageur Zeiss piloté par le logiciel d'acquisition Zen blue 2.0 avec un objectif x20 Apochromatique (NA 0.75) et une caméra Coolsnap FX ou d'un microscope confocale Zeiss LMS710 (20X/0,8) piloté avec le même logiciel.

8.4.1. Analyse des coupes FFPE et des coupes à froid

Les images des immunomarquages en fluorescence acquises par microscope sont traitées en utilisant les logiciels ZEN (8.1, 2012) et ImageJ. Cinq zones représentatives de chacune des lames sont acquises et la localisation des protéines d'intérêts Gli2 et Smo est évaluée. Pour chaque image, la longueur totale d'épithélium est mesurée et la présence des molécules dans cinq sous compartiments (ciliaire, sub-ciliaire, cytoplasmique, membranaire et nucléaire) est recherchée (**Figure 16 ▼**).

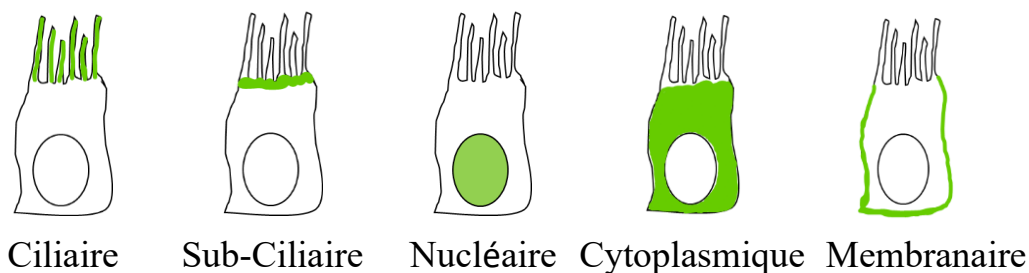


Figure 16 : Schémas représentatifs des différents sous-compartiments considérés pour la recherche des protéines d'intérêts (Gli2 et Smo).

8.4.2. Analyse des cellules *cytospinées*

Les images numériques des *cytospins* ont été acquises au format VSI puis consultées par le logiciel OLIVIA™ Reader (Olympus). Afin de réaliser un comptage cellulaire différentiel manuel, des extractions en région d'intérêt de 3 zones représentatives de 1000*1000 pixels par *BIOP VSI reader export plug-in* (https://biop.epfl.ch/TOOL_VSI_Reader.html) ont été réalisées. Les quantifications ont d'abord été faites sur des noyaux isolés pour un comptage cellulaire total. Puis chaque population cellulaire a été comptée indépendamment, les marquages à la tubuline acétylée, au Mu5ac et à p63 représentant respectivement les cellules ciliées, mucosécrétrices et basales. Il a été vérifié pour chaque cellule la positivité exclusive et limitée à un seul canal d'acquisition (en dehors du DAPI). Les cellules ne remplissant pas ces critères n'ont pas été comptabilisées (moins de 5 % des événements visualisés). Concernant le marqueur d'intérêt Gli2, la proportion totale de cellules marquées a été relevée, ainsi que la proportion de cellules Gli2 positives au sein de chaque population caractérisée. Enfin, pour chaque cellule positive pour Gli2, la localisation subcellulaire (cytoplasmique, nucléaire et/ou sub-ciliaire) est étudiée. Chaque lame a donc été analysée en triplicat indépendant en aveugle des paramètres cliniques avec une bonne reproductibilité entre les régions d'intérêts.

8.4.3. Analyse des immunomarquages sur membranes

Les images sont acquises avec un microscope confocal et traité avec les mêmes logiciels que précédemment. Le nombre de cellules basales (p63), ciliées (Arl13B ou tubuline acétylée), mucosécrétrices (Muc5ac ou Muc5b) et les cellules en cours de prolifération (Ki67) est compté sur cinq images représentatives de la membrane avec le logiciel ImageJ. Le résultat est rapporté sur la surface totale de la membrane en millimètre carrée (mm²). Lorsque le comptage n'a pas été possible la quantification a été effectuée en utilisant les niveaux de gris moyen sur le canal d'acquisition de fluorescence d'intérêt après avoir retiré le bruit de fond.

9. Statistiques

Les comparaisons relatives aux données continues ont été analysées selon le test de Student relatif aux petits échantillons après vérification des hypothèses de normalité et d'égalité de variance. En cas de sous-groupes multiples, les variables ont été analysées par ANOVA et en cas de significativité, les comparaisons par paires menées par analyse de Tuckey (HSD) post-hoc. Concernant les variables dichotomiques, les données ont été analysées par test de Chi-2,

corrigées par la méthode de Yates en cas d'effectifs limités. En cas d'analyses par sous-groupes pour ces mêmes variables, la procédure de Marascuilo était appliquée. Concernant les analyses de fractions de LBA deux à deux, les analyses ont été réalisées selon le test non-paramétrique de Mann-Whitney étant donné une distribution non normale et des variances non égales. Tous les tests ont été considérés en bilatéral et les résultats comme significatifs pour un risque alpha de premier ordre de 5 %. Les matrices de données ont été analysées par XLSTAT (Version 2019.1.3, Addinsoft, New York, NY. <http://www.xlstat.com/en/>). Les données sont ensuite représentées sur le logiciel GraphPad Prism (Version 8, États-Unis).

RESULTATS

1. Etude la voie HH lors de la différenciation épithéliale et implication dans la BPCO

1.1. Publication

Airway Epithelial Cell Differentiation Relies on Deficient Hedgehog Signalling in COPD

(Belgacemi et al., 2020)

EBioMedicine 51 :102572.

1.2. Résumé

La voie Hedgehog (HH) est l'une des voies les plus étudiées dans le contexte du développement des organes. La signalisation HH est nécessaire à la morphogénèse pulmonaire ainsi qu'à l'homéostasie pulmonaire en régulant la quiescence et la réparation des cellules épithéliales. Etant donné que le remodelage épithélial est une composante majeure de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), nous avons étudié l'implication des différents acteurs de la voie HH dans la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et nous avons analysé ces mêmes acteurs chez les patients atteints de BPCO.

La présence du ligand principal sécrété Shh (Sonic Hedgehog) a été mesurée par ELISA dans les surnageants de culture en interface air-liquide de cellules épithéliales des voies aériennes. L'activation de la voie HH a été évaluée par RT-qPCR, western blot et immunomarquage. L'inhibition de la voie HH a été obtenue en séquestrant le Shh du milieu de culture durant la différenciation des cellules épithéliales. La localisation des acteurs principaux de la voie a été étudiée dans des tissus pulmonaires issus de patients BPCO ou non.

Nos résultats démontrent que les cellules basales produisent le ligand Shh responsable de l'activation de la voie HH durant le processus de différenciation. L'inhibition de la signalisation HH par inhibition du ligand, conduit à un remodelage de l'épithélium des voies aériennes avec une augmentation du nombre de cellules basales et une diminution de la ciliogénèse. Le facteur de transcription activateur de la voie Gli2, semble être un élément clé dans la régulation de la différenciation de l'épithélium. De manière intéressante, Gli2 et Smo sont absents de l'épithélium bronchique des patients BPCO.

Nos données suggèrent que la voie HH est cruciale pour la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et mettent en évidence son rôle dans la mise en place du remodelage épithélial présent chez les patients BPCO.



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom

Research paper

Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD

Randa Belgacemi^a, Emilie Luczka^a, Julien Ancel^{a,b}, Zania Diabasana^a, Jeanne-Marie Perotin^{a,b}, Adeline Germain^a, Nathalie Lalun^a, Philippe Birembaut^{a,c}, Xavier Dubernard^d, Jean-Claude Merol^{a,d}, Gonzague Delepine^{a,e}, Myriam Polette^{a,c}, Gaëtan Deslee^{a,b}, Valerian Dormoy^{a,*}

^a Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, P3Cell UMR-S1250, SFR CAP-SANTE, Reims 51097, France

^b CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Service de pneumologie, Reims 51092, France

^c CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire de biopathologie, Reims 51092, France

^d CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service d'oto-rhino-laryngologie, Reims 51092, France

^e CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service de chirurgie cardio-vasculaire et thoracique, Reims 51092, France

ARTICLE INFO

Article History:

Received 3 September 2019

Revised 11 October 2019

Accepted 20 November 2019

Available online 23 December 2019

Keywords:

Chronic obstructive pulmonary disease

Airway epithelial cells

Differentiation

Cilia

Hedgehog

ABSTRACT

Background: Hedgehog (HH) pathway is constantly under scrutiny in the context of organ development. Lung morphogenesis requires HH signalling which participates thereafter to the pulmonary homeostasis by regulating epithelial cell quiescence and repair. Since epithelial remodelling is a hallmark of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), we investigated whether the main molecular actors of HH pathway participate to airway epithelial cell differentiation and we analysed their alterations in COPD patients.

Methods: Sonic HH (Shh) secretion was assessed by ELISA in airway epithelial cell (AEC) air-liquid interface culture supernatants. HH pathway activation was evaluated by RT-qPCR, western blot and immunostaining. Inhibition of HH signalling was achieved upon Shh chelation during epithelial cell differentiation. HH pathway core components localization was investigated in lung tissues from non-COPD and COPD patients.

Findings: We demonstrate that progenitors of AEC produced Shh responsible for the activation of HH signalling during the process of differentiation. Preventing the ligand-induced HH activation led to the establishment of a remodelled epithelium with increased number of basal cells and reduced ciliogenesis. Gli2 activating transcription factor was demonstrated as a key-element in the regulation of AEC differentiation. More importantly, Gli2 and Smo were lost in AEC from COPD patients.

Interpretation: Our data suggest that HH pathway is crucial for airway epithelial cell differentiation and highlight its role in COPD-associated epithelial remodelling.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the fourth leading cause of death worldwide and affect the daily lives of millions [1,2]. If the main risk factors are clearly identified [3], characterization of various clinical phenotypes, early detection of the disease and identification of therapeutic approaches represent critical challenges to alleviate its socio-economic burden [4–8].

Cellular and molecular mechanisms responsible for the development and progression of COPD are not fully understood. The alteration of

epithelial plasticity is one of the hallmark of the two main features observed in COPD patients: airway obstruction and emphysema [9–11]. Understanding the origin of epithelial remodelling is therefore crucial to propose novel biomarkers and elaborate innovative therapeutics. So far, dysregulation of basal cell differentiation, motile cilia defects and secretory cells dysfunctions have been reported and characterized [12,13], but no association was demonstrated between altered molecular events and cell fate except for BMP signalling [14].

Recent evidence indicate that some actors of HH pathway are present in adult lung epithelia and may play a role in respiratory diseases [15–17]. Canonical HH signalling refers to the activation of the pathway via binding of the ligand (Shh, Dhh or Ihh) to its receptor Ptch to release Smo receptor and relay Gli family transcription factors activity. Non-canonical HH signalling includes three modalities: (i) ligand-dependent/Smo-independent activation; (ii) ligand-dependent/Gli-independent

* Corresponding author at: Inserm UMR-S 1250, University of Reims Champagne-Ardenne, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, Reims 51092, France.

E-mail address: valerian.dormoy@univ-reims.fr (V. Dormoy).

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.033>

2352-3964/© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Research in context

Evidence before this study

Hedgehog signalling is essential during lung development and it has been associated with COPD pathogenesis in GWAS. In addition, it was recently shown that components of Hedgehog pathway were present in lung ciliated cells and the receptor *Ptch1* was found altered in COPD airway epithelia. However, it is not known how the core components of Hedgehog pathway take part in airway epithelial cell fate determinism and what the level of activation in COPD patients is.

Added value of this study

This is the first study to analyse all the five core components of Hedgehog pathway activation during airway epithelial cell differentiation *in vitro* and in the airways of patients. We identified the cells producing the ligand Sonic Hedgehog and we demonstrated that Hedgehog pathway activation is necessary for the establishment of a fully functional epithelium. We observed that the transcription factor *Gli2* was partially responsible for the lack of ciliogenesis upon Hedgehog pathway inhibition. Furthermore, we provided the first evidence of *Gli2* and the receptor *Smo* as key markers in COPD pathogenesis.

Implications of all available evidence

There is now accumulating evidence that Hedgehog pathway is involved in respiratory diseases.

Our findings suggest possibilities of making use of Hedgehog pathway elements as COPD markers as well as potential targets to manipulate airway epithelial cell differentiation.

Further studies are warranted to fully characterize the mechanisms associating Hedgehog pathway activation and epithelial cell fate or remodelling in respiratory dysfunctions.

activation; (iii) *Gli*-only activation [18–24]. Thus, HH signalling is required in early and postnatal lung development [15,22,23] and orchestrates adult lung repair and regeneration [24,25]. In addition, genome-wide association studies performed in COPD and non-COPD patients identified genetic alterations of HH-linked molecular actors [26–28]. Furthermore, HH signalling elements were recently observed in adult airways motile cilia [29] while *Ptch1* was found to be associated with an increase of mucus production in severe COPD patients [30]. To date, the activation of the signalling cascade has not been linked to AEC differentiation and epithelial remodelling as seen in chronic lung disease pathology. Here we hypothesize that HH signalling orientates cell fate during differentiation and its alteration participates to respiratory disease.

We report that progenitors of airway epithelial cells produced *Shh* ligand to activate HH signalling during the course of differentiation *in vitro*. Aiming to suppress canonical and non-canonical HH signalling, an antibody against *Shh* was used in air-liquid interface cultures. We characterized the involvement of *Shh* signalling via the transcription factor *Gli2* in the determinism of basal cells towards ciliated cells. Finally, we identified crucial differential localizations of *Gli2* and *Smo* in non-COPD and COPD bronchial epithelium unveiling a potential innovative biomarker.

1. Materials and methods

1.1. Human subjects

Patients scheduled for lung resection for cancer (University Hospital of Reims, France) were prospectively recruited (*n* = 40) following

standards established and approved by the institutional review board of the University Hospital of Reims, France (IRB Reims-CHU 20110612). In addition, 20 patients who underwent a routine fiberoptic bronchoscopy with bronchial brushings under local anaesthesia according to international guidelines were also recruited [31]. Informed consent was obtained from all the patients. Patients with asthma, cystic fibrosis, bronchiectasis or pulmonary fibrosis were excluded. At inclusion, age, sex, smoking history, and pulmonary function tests results were recorded. Ex-smokers were considered for a withdrawal longer than 6 months. COPD was defined by post-bronchodilator FEV₁/FVC < 70% [32]. The severity of COPD was determined by spirometric classification (GOLD 1: FEV₁ ≥ 80% predicted, GOLD 2: 50% ≤ FEV₁ < 80% predicted, GOLD 3: 30% ≤ FEV₁ < 50% predicted, GOLD 4: FEV₁ < 30% predicted).

1.2. Human primary airway epithelial cell cultures

Human primary airway epithelial cells (AEC) were obtained from nasal polyps resected from non-COPD patients (11 donors) at the University Hospital of Reims to establish air-liquid interface (ALI) cultures as described by us and others [33–38]. Cells were dissociated by overnight pronase incubation (0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich) and counted with ADAM (NanoEnTek) according to NanoEnTek instructions. 200,000 cells were seeded on 12-well plates containing 0.4 mm Transwells (Corning, Fisher Scientific) coated with 0.3 mg/mL collagen type IV from human placenta (Sigma-Aldrich). PneumaCult-EX (PnC-Ex) media (StemCell) was used for initial proliferation in apical and basal chambers. Upon reaching cell confluency, the apical medium was removed and PneumaCult-ALI (PnC-ALI, StemCell) medium was used in basal chamber. Culture medium was changed three times a week and cells kept in incubators at 37 °C, 5% CO₂. Cells and supernatants were collected every 7 days to generate kinetic analysis. No heterogeneity was observed in terms of initiation of ALI (less than 10 days after seeding) and establishment of ciliogenesis (coverage of the apical surface with cilia above 75%). Inhibition of Sonic Hedgehog signalling was achieved upon AB5E1 (AB_2188307, Interchim, 1 µg/mL, diluted in sterile water) addition to the culture medium as indicated in the following figures. Experimental design was extrapolated from pharmacological binding studies [39–43], as well as previously published reports resorting to AB5E1 in order to capture *Shh* [44–49]. Cell morphological changes were weekly evaluated under a microscope.

1.3. TEER measurements

Transepithelial electrical resistance (TEER) was evaluated at ALI-35 using an EVOM2 resistance meter with an STX2 electrode (World Precision Instruments Hitchin) at room temperature. The electrode was equilibrated in PnC-ALI during 1 h at room temperature before measurement. One mL PnC-ALI was added to the apical compartment and triplicate measurements were performed per sample. Data were corrected for blank values and area. Average resistance was subtracted from the measured value of every well according to data acquired on cell-free permeable supports and results are presented as resistance per surface (√ x cm²).

1.4. RT-qPCR analyses

Total RNA from AEC (ALI cultures or bronchial brushings) was isolated by High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics) and 250 ng were reverse-transcribed into cDNA by Transcriptor First Stand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics). Quantitative PCR reactions were performed with fast Start Universal Probe Master kit and UPL-probe system in a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) as recommended by the manufacturer. Specific primers (Eurogentec) were: SHH forward 5'-GCTTCGACTGGGTGACTACG-3',

reverse 5'-GCCACCGAGTTCTCTGCT-3'; GLI1 forward 5'-CCAGCCA-GAGAGACCAACAG-3', reverse 5'-CCCCTTCTTGGTCAACTT-3'; GLI2 forward 5'-CTACCTCAACCCCGTGGAC-3', reverse: 5'-CTGA-GAGTGGGGAGATGGAC-3'; GLI3 forward 5'-ACATGGAATATCTT-CATGCTATGG-3', reverse 5'-GGTGATATGGACAGTGTACGTTT-3'; CK5 forward 5'-TTCATGAAGATGTTCTTTGATGC-3', reverse 5'-AGGTTGGCGTTGTTGTC-3'; FOXJ1 forward 5'-CAGATCCCACCTGG-CAGA-3', reverse 5'-CGTACTGGGGTCAATGC-3', MUC5AC forward 5'-CACGTCCCCTCAATATCCA-3', reverse 5'-GGCCCAGGTCTCACCTT-3'; MUC5B forward 5'-GTACAATGGCACCTTCTACGG-3', reverse 5'-CTGA-CATTGCACCGTTGG-3'; SMO forward 5'-ATGGCACCATGAGGCTT-3', reverse 5'-GGGCGTAGTACAGTACAGACA-3'; PTC1 forward 5'-GGCCTGGCAGAGGACATA-3', reverse 5'-GAAAGCACCTTTGAGTGG-3'. Results for all expression data regarding transcripts were normalized to the expression of the house-keeping gene GAPDH amplified with the following primers: forward 5'-ACCAGGTGGTCTCTCTGAC-3', reverse 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'. Relative gene expression was assessed by the $\Delta\Delta$ Ct method [14] and expressed as fold change (\log_2 , AB5E1 vs control) when indicated.

1.1. Immunofluorescent staining and analyses

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lung tissues distant from the tumour as previously described [50] and frozen tissues. Five 5 μ m sections were processed for H&E staining and observed on microscope (x20) to confirm the presence of bronchi. Bronchial epithelium was analysed on the entire slide including 2 to 7 bronchi per patient. FFPE lung tissues sections slides were deparaffinised and blocked with 10% BSA in PBS for 30 min at room temperature. Tissue sections were then incubated with the following primary antibodies for one night at 4 °C in 3% BSA in PBS: rabbit anti-Arl13b (17711-1-ap, ProteinTech, 1:200); mouse anti-Muc5ac (NBP2-15196, Novus Biologicals, 1:100); rabbit anti-Muc5B (E-AB-15988, Elabscience, 1:100); mouse anti-Acetylated- α -tubulin (T6793, Sigma Aldrich, 1:1000); goat anti-P63 (AF1916, R&D systems, 1:100); rabbit anti-Gli1 (HPA065172, Sigma Aldrich, 1 μ g/mL); rabbit anti-Gli2 (HPA074275, Sigma Aldrich, 0,4 μ g/mL); rabbit anti-Gli3 (HPA005534, Sigma, 0,6 μ g/mL); goat anti-Shh (AF464, R&D Systems); rabbit anti-Smoothened (E-AB-12925, Elabscience, 1:50) and rabbit anti-Patched1 (E-AB-10571, Elabscience, 1:100). Sections were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies in 3% BSA in PBS for 1 h at room temperature. DNA was stained with DAPI during incubation with the secondary antibodies. Micrographs were acquired by AxioImage Z1 (Zeiss (20x Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ (National Institutes of Health) for analysis. For each patient, five random fields per section containing bronchi were taken to evaluate the localization of Gli2 and Smo on epithelial cells. Total epithelium length was measured by ImageJ and the presence of the protein of interest was assessed in 5 sub-compartments: cilia, sub-cilia, cytoplasm, cytoplasmic membrane, and nuclei.

1.2. Whole-mount immunofluorescent immunostaining

Methanol fixed AEC from ALI cultures were rehydrated by decreasing methanol concentration before a post fixation with acetone. Cells were then blocked with 10% BSA in PBS for 2 h at room temperature and incubated with previous primary antibodies for one night at 4 °C in 3% BSA in PBS. Cells were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies in PBS for 2 h at room temperature. DNA was stained with DAPI during incubation with the secondary antibodies. Clarification of cells was achieved by a glycerol gradient (25%/50%/75%) before mounting the slides. Micrographs were acquired by Confocal Zeiss LSM710 microscope

(20X/0.8) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ for max-intensity z-stack projections.

1.3. Immunoblot analyses

AEC were lysed on ice in RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Igepal, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 5 mM iodoacetamide and 0,1% (v/v) SDS) supplemented with protease inhibitor cocktail inhibitor (Roche diagnostics), then lysates were clarified by centrifugation (13,000 \times g for 10 min at 4 °C). Ten μ g of total proteins quantified by Biorad DC protein Assay Reagent Package (Biorad) were submitted to electrophoresis. Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Scientific) was used to resolve proteins according to their subcellular localizations following the manufacturer's instructions.

Primary antibodies were anti-Gli1 (AF3455, R&D Systems), anti-Gli2 (HPA074275, Sigma Aldrich), anti-Gli3 (HPA005534, Sigma Aldrich), anti-Patched1 (E-AB-10571, Elabscience), anti-Smoothened (NBP2-24543, Novus Biologicals), anti-Ck5 (AB24647, Abcam, Cambridge), anti-GAPDH (clone 6C5, Chemicon, Millipore), anti-Foxj1 (14-9965-82, Ebioscience, ThermoFisher Scientific). Membranes were incubated with appropriate dilutions of primary antibody followed by the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad Laboratories). Final detection was obtained by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). Detected signals were digitally compared using ImageJ.

1.4. Immunoprecipitation assays

Complexation of AB5E1 to Shh was evaluated by 24 h incubation of 2 mL of medium supplemented with different concentrations of mouse IgG1 negative control (clone 1E2.2, CBL610, Millipore) or AB5E1 at 37 °C, 5% CO₂ and subsequent overnight incubation with G Sepharose proteins (P3296, Sigma Aldrich) at 4 °C. Immunocomplexes were isolated by series of centrifugation (13,000 \times g for 10 min at 4 °C), washed with PBS, resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (PerkinElmer). Remaining steps were performed as described in immunoblot analyses.

1.5. ELISA

Concentrations of Shh proteins in apical and basal chambers supernatants (100 μ L) were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the RayBiotech instructions (ELH-ShhN-001). The detection threshold for the assay was 8pg/mL.

1.6. Statistics

Quantitative variables were described with whisker plots as median \pm interquartile range and clinical parameters were represented with dot plot and median. Qualitative variables were compared using Chi-square test or Fisher exact test as appropriate. Parametric tests were used after normal distributions and variance equality hypothesis verified respectively by Fisher's and Shapiro-Wilk tests. Quantitative data in multiple groups were analysed using repeated measures analysis of variance (ANOVA) following of a Tukey posthoc HSD test while two groups were compared with Student's test. If applications conditions were not filled, non-parametric Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests were preferred. Linear regression was performed using Spearman test. In all exploratory analyses, results with two-sided p-value \leq 0.05 were considered significant. The XLSTAT software (version 2019.1.3, Addinsoft company) was used to analyse and reformat data within Excel for statistical analysis and represented with GraphPad software Inc. Prism Version 8, US.

1. Results

1.1. Shh-Gli pathway is activated during airway epithelial cell differentiation

To determine whether HH pathway participated in the process of differentiation on airway epithelial cells (AEC), we investigated the potential activators of the molecular cascade. Interestingly, secreted Shh but not Dhh and Ihh was found in ALI medium (Fig. 1A). This ligand was also found in cell culture supernatants from AEC and in total protein extracts from human bronchi suggesting the production

of Shh by AEC (Fig. 1A). In addition, we detected Shh by ELISA on the apical side of AEC ALI cultures at the start of differentiation (40.1 § 46 pg/ml of supernatant after ALI switch) and predominantly on the basal side after fourteen days post-ALI (215 § 79 pg/ml, Fig. 1B-D). Immunostainings confirmed the presence of Shh preferentially in non-differentiated cells (Fig. 1E). Thus, basal AEC seemed responsible for Shh secretion.

We next investigated the core components of canonical HH activation on both transcripts and protein levels and localizations during the course of *in vitro* AEC differentiation. First, GLI2, GLI3, SMO and PTCH1 transcripts levels increased concomitantly with the

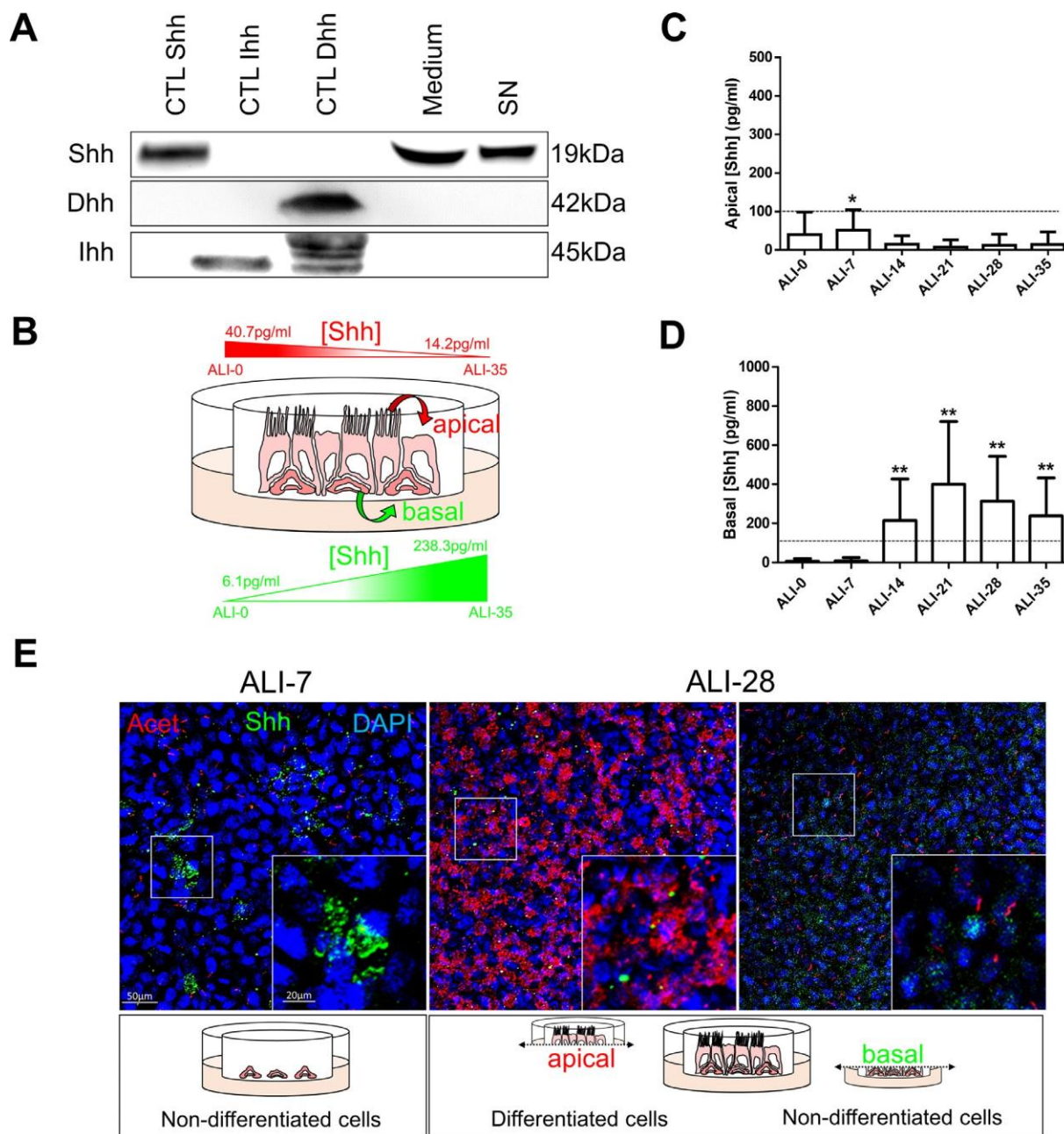


Fig. 1. Shh is produced by AEC. A, Representative immunoblots (n = 3) of Shh, Dhh and Ihh on human bronchi (CTL Shh), murine colon (CTL Ihh) and testis (CTL Dhh), AEC ALI culture medium (Medium), AEC ALI culture supernatants (SN). B, The schematic represents the gradients of Shh on AEC ALI cultures C, Histogram representing the concentration of Shh measured by ELISA in AEC cultures supernatants (n = 11) at the apical side during the process of differentiation (from ALI-0 to ALI-35). Results show mean §SEM, *p < 0.05 from reference value (8pg/ml). D, Histogram representing the concentration of Shh measured by ELISA in AEC cultures supernatants (n = 11) at the basal side during the process of differentiation (from ALI-0 to ALI-35). Results show mean §SEM, **p < 0.01 from reference value (8pg/ml). E, Representative confocal acquisitions from AEC cultures at ALI-7 and ALI-28 for Shh (green); cilia (acetylated tubulin, red) and cell nuclei (DAPI, blue). Merged z-projections are shown with a magnification corresponding to the selected area. Cartoons depict the cell differentiation status at the time of analysis. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

differentiation of the epithelium (Fig. 2A) as detected by CK5 (non-differentiated cells marker), FOXJ1 (ciliated cells marker), MUC5AC and MUC5B (mucus-secreting cells markers). In accordance with the literature, GLI1 and SHH transcripts were not detected [51,52].

We then confirmed these results by western blot (Fig. 2B). Protein levels of Foxj1 and Gli2 relatively increased over time compared to a basal protein synthesis (Gapdh) (Fig. 2C). In addition, Gli2 detection preceded Foxj1 detection at the protein level confirming transcripts analysis and suggesting an early requirement of HH pathway activation to initiate differentiation. Ck5 and the remaining actors of HH signalling were present throughout the kinetic of differentiation and did not show significant modulation in terms of expression (Fig. 2B and Fig. S1).

Finally, we assessed the cellular localization of the main HH actors on AEC (Fig. 2D). We confirmed previous reports showing the expression of the five proteins Gli1, Gli2, Gli3, Ptch1 and Smo in differentiated AEC (ALI-28), but also demonstrated for the first time their expression in the initial steps of differentiation (ALI-14) [16,24,29,53].

1.1. Shh signalling is crucial for airway multiciliogenesis

Since HH pathway is activated during airway epithelial cells differentiation, we tested whether its alteration may impact the process. To abrogate canonical and non-canonical signalling (ligand-induced) and avoid off-target effects, we used an antibody directed against Shh (AB5E1) in our *in vitro* experiments. Even though it has been already used successfully in the literature to interfere with Shh signalling [39,54,55], we first checked its ability to capture the activator of the pathway in our experimental conditions. One μ g/ml of AB5E1 was efficient to deplete free Shh in the medium (Fig. 3A). To fully address the extent of HH pathway inhibition during AEC differentiation, we focused on proliferation, ciliogenesis, mucus production and epithelial barrier integrity (Fig. 3B).

Firstly, we evaluated the proliferative index of AEC to distinguish the process of cell division in regards to proliferation or differentiation. Interestingly, AB5E1 did not influence AEC proliferation before ALI switch (0.86 \pm 0.05 vs 0.86 \pm 0.04, Fig. S2A and B) but induced a decrease of proliferation in basal cells after ALI switch (65.5 \pm 11.6% of Ki67+ cells in CTL vs 38.5 \pm 2.5% in AB5E1-treated cells at ALI-14) (Fig. S2C and D) while the proportion of this population remained high instead of progressively reducing as in non-treated cultures (61.6 \pm 8.1% of p63+ cells in CTL vs 80.2 \pm 6.1% in AB5E1-treated cells) (Fig. 3C and D). Ciliogenesis was also altered with a significant reduction of ciliated cells from ALI-21 (5132.4 \pm 1235.3 ciliated cells/mm² in CTL vs 2897.7 \pm 1879.3 in AB5E1-treated cells) (Fig. S3) that persisted at ALI-28 (1.5-fold decrease) (Fig. 3E and F). Mucous secreting cell fate was not significantly altered considering Muc5ac and Muc5b independently (Fig. S4) but the ratios Muc5ac/Muc5b tended towards an inversion during the course of differentiation (Fig. 3G and H). This is of particular interest when considering that total mucins abundance is altered in COPD patients and the balance between Muc5ac and Muc5b production is essential to warrant optimal muco-ciliary clearance [56–58]. In addition, Muc5ac production is a feature of goblet cells in airways while Muc5b is mainly associated with club-like cells consequently impacting progenitor cell fate is more likely to affect the production of Muc5b than Muc5ac on epithelial cells. Finally, TEER was ultimately reduced (477.8 \pm 110.9V/cm² in CTL vs 314.6 \pm 54.8V/cm² in AB5E1-treated cells) suggesting an alteration of epithelial integrity (Fig. 3I), although no cytotoxicity was observed until ALI-35. Altogether, those results indicate that HH pathway inhibition favoured the maintenance of non-differentiated cells while preventing ciliogenesis (Fig. 3J).

We then assessed the molecular mechanisms involved in the alteration of HH pathway. FOXJ1 transcripts were significantly reduced (4.5-fold decrease of FOXJ1 expression at ALI-14) (Fig. 4A) confirming a potential impact on ciliogenesis. MUC5AC and MUC5B

transcripts were also significantly reduced at ALI-14 (1.8-fold and 2.8-fold decrease respectively). Regarding to the HH components, GLI2 transcript levels were also reduced upon AB5E1 treatment throughout differentiation (2.1-fold decrease of GLI2 expression at ALI-14) (Fig. 4A). Since the activation of the HH pathway is depicted as a balance between GLI2 and GLI3 [22,59–61], HH pathway inhibition through Gli2 was also confirmed by the reduction of the GLI2/GLI3 ratio from ALI-7 to ALI-35 (Fig. 4B). In addition, Gli2 and Foxj1 protein levels were significantly reduced from ALI-7 in comparison to CTL (Fig. 4C). Furthermore, Gli2 nuclear localization was dramatically reduced upon AB5E1 treatment (Fig. 4D and E) while it was systematically detected in progenitors and ciliated cells (Fig. S5) demonstrating that optimal AEC differentiation required Gli2.

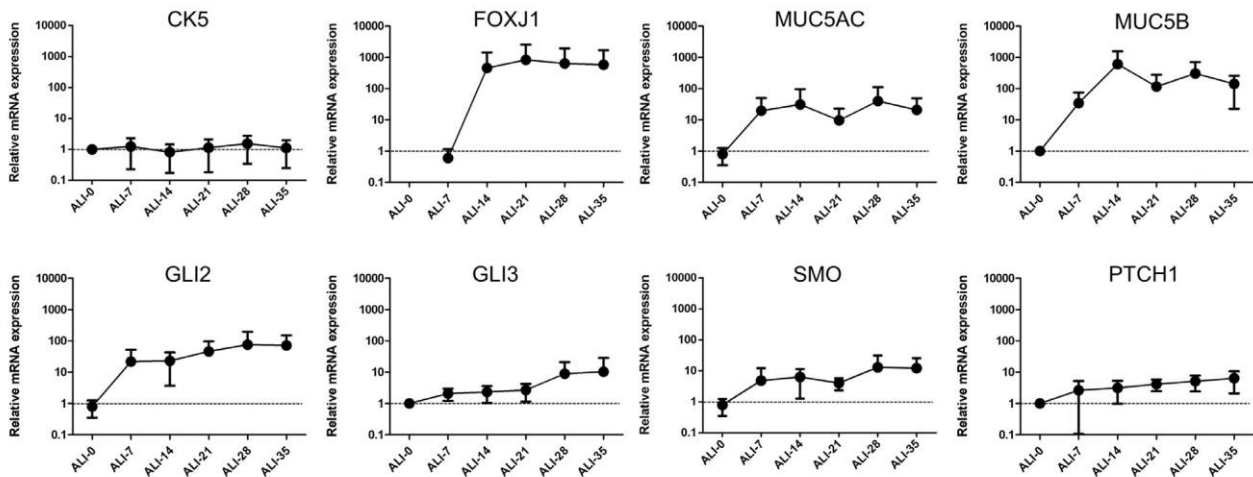
1.2. Shh signalling is altered in COPD patients

Since HH pathway inhibition impacted AEC differentiation *in vitro*, we questioned the *Human Lung Atlas* [62–64] to identify the cell populations where the transcripts of the main actors of the signalling cascade would predominantly be expressed. We confirmed that GLIs, SMO and PTCH1 transcripts were mainly found in progenitors (Fig. 5A and Fig. S6). Because COPD patients were not yet included in the Atlas and large publicly available data sets focused on whole tissue or small airways, we then collected AEC from 10 non-COPD and 10 COPD patients from bronchial brushings of large airways to evaluate HH pathway alteration on a transcriptional level (Table S1). Interestingly, GLI2 transcripts (Fig. 5B) were significantly reduced in COPD AEC (2.3 fold decrease in COPD patients compared to non-COPD) and SMO was not detected (Fig. S7A). Finally, we investigated HH core components localizations in lung tissues obtained from 20 non-COPD and 20 COPD subjects (Table 1).

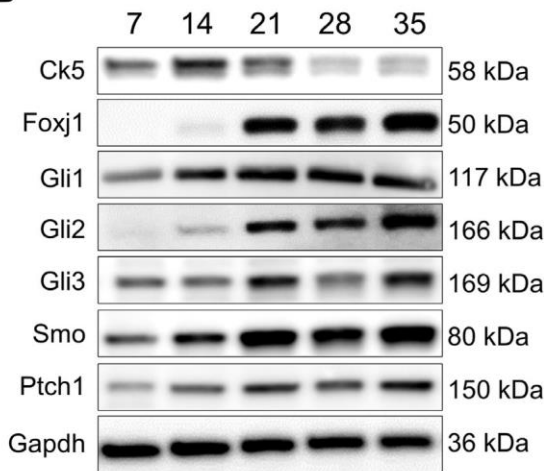
As recently shown by others, some actors were present in ciliated cells of the airways [29,30] but investigating the five necessary proteins to activate HH targets, we noticed an interesting differential expression between non-COPD and COPD patients on FFPE and frozen lung tissues (Fig. 5C). Strikingly, Gli2 was lost in cilia and nuclei in bronchi (Fig. 5C). Specifically, 66 \pm 17.4% of epithelial cells displayed Gli2 in cilia in non-COPD patients compared to 8.9 \pm 8.9% in COPD patients, and 87.8 \pm 5.1% of epithelial cells presented a nuclear staining of Gli2 in non-COPD patients compared to 37.1 \pm 36% in COPD patients (Fig. 5D). We did not observe a significant modification regarding a potential differential localization of Gli1, Gli3 or Ptch1 between non-COPD and COPD patients but the presence of Smo at the cilia and membrane was also affected in COPD patients (Fig. 5C). In particular, Smo localization was lacking in epithelia of patients with COPD: 59.9 \pm 25.5% of epithelial cells displayed Smo in cilia in non-COPD patients compared to 5.78 \pm 4.8% in COPD patients, and 98 \pm 3% of epithelial cells presented membrane-bound Smo in non-COPD patients compared to 32.1 \pm 7% in COPD patients (Fig. S7B). In addition, we did not observe any heterogeneity among non-COPD or COPD donors with regard to expression of HH pathway core components.

Because HH pathway activation is mainly appreciated by the addressing of its activating transcription factors to the cell nucleus, we tested the clinical association of nuclear Gli2 in basal AEC with clinical and functional parameters. COPD status was significantly associated with a lower proportion of nuclear Gli2 positive cells (37.1 \pm vs 77 \pm 2%). With a retrospective logistic regression, a 25% nuclear Gli2 positive cell threshold allowed to define a significant cut-off, managing to discriminate COPD from non-COPD patients (AUC 0.686, OR=12.833, IC95 =1.738 – 94.784, p = 0.015). Gli2 nuclear positive epithelial cells percentage was further correlated with FEV₁/FVC in a linear regression model (Fig. 5E). Patients with a lower FEV₁/FVC were associated with lower rate of Gli2 nuclear positive epithelial cell. Interestingly, the analysis of Smo localization provided similar conclusions: membrane-bound Smo positive epithelial cells percentage was correlated with FEV₁/FVC in a linear regression model (Fig. S7C).

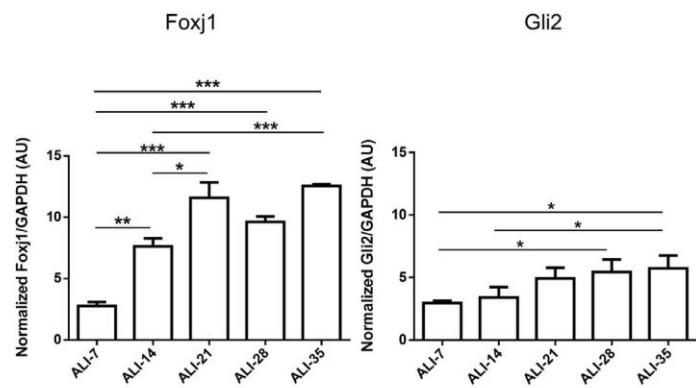
A



B



C



D

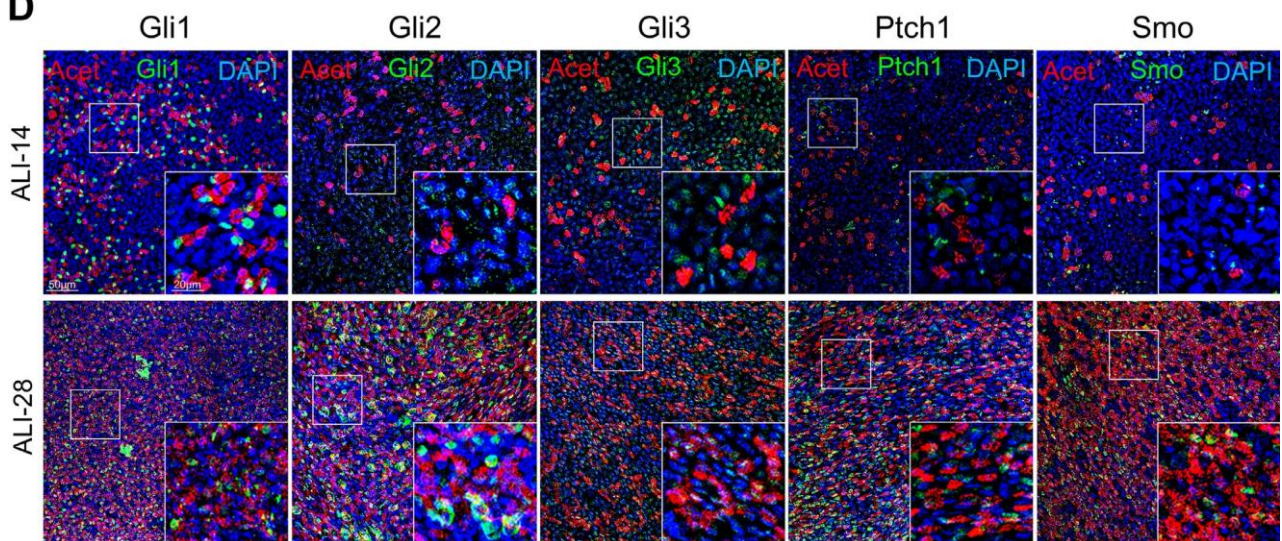


Fig. 2. HH pathway is activated during AEC differentiation. A, Curves representing the relative mRNAs levels normalized to GAPDH obtained during the course of ALI cultures by RT-qPCR ($n = 5$) for differentiation markers (CK5, non-differentiated cells; FOXJ1, ciliated cells; and MUC5AC/MUC5B, mucous-secreting cells) and HH pathway elements (GLI2/3; SMO and PTCH1). Means \pm SEM of 2-^{DD}ct are shown for each ALI time point. B, Representative immunoblots of total proteins extracted from ALI AEC cultures from ALI-7 to ALI-35 for the differentiation markers (Ck5 and Foxj1), HH pathway elements (Gli1/2/3; Smo; Ptch1) and Gapdh ($n = 3$). C, Histograms showing the relative increased expressions of Foxj1 and Gli2 protein levels as evaluated by western blot analysis after processing on ImageJ (Gapdh normalized ratios) during the course of AEC differentiation (in arbitrary units, AU). Results show mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. D, Representative confocal acquisitions from AEC cultures at ALI-14 and ALI-28 for the core HH pathway components Gli1, Gli2, Gli3, Ptch1 and Smo (all green); cilia (acetylated tubulin, red) and cell nuclei (DAPI, blue). Merged z-projections are shown with a magnification corresponding to the selected area. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

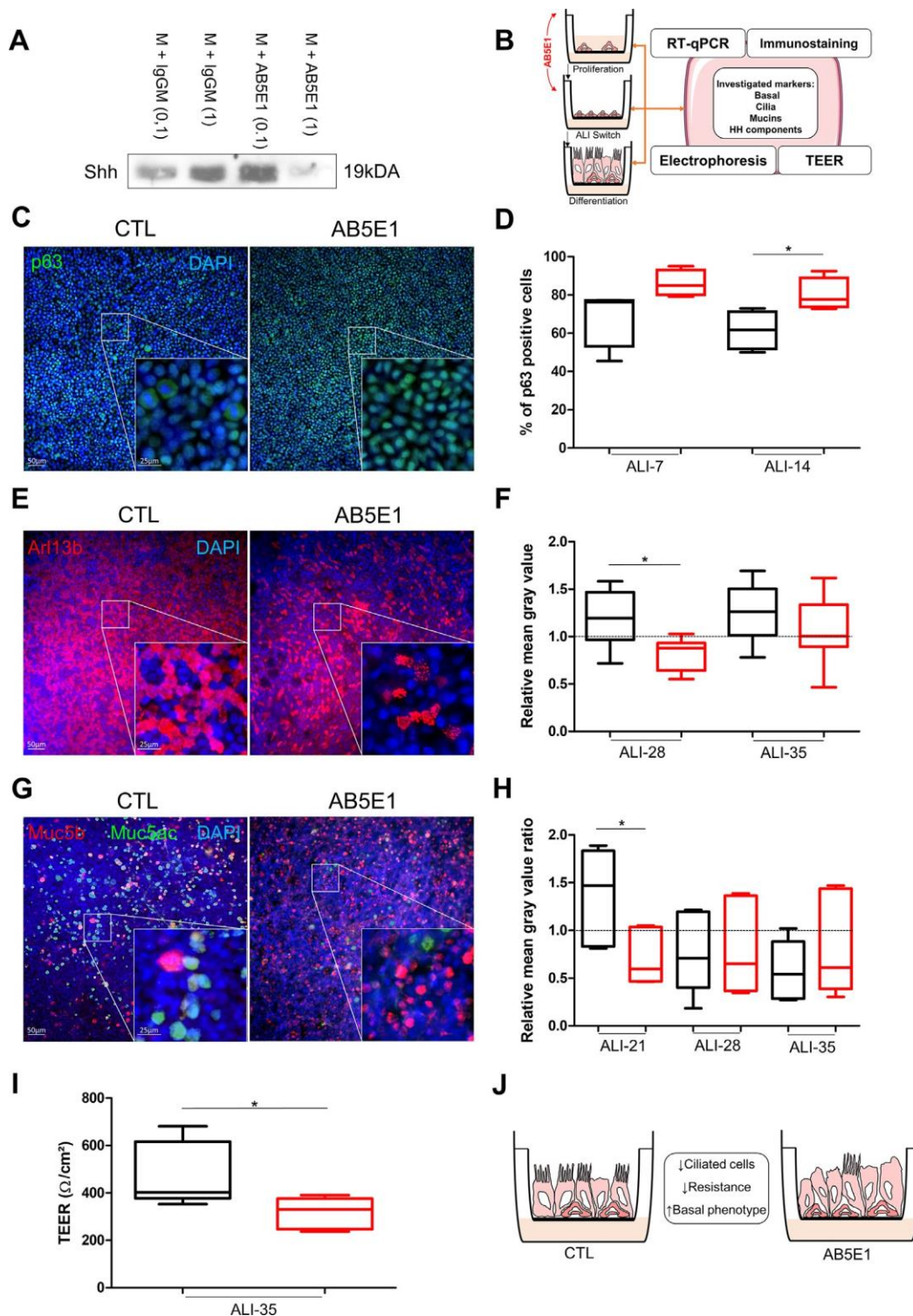


Fig. 3. HH pathway inhibition induced AEC remodelling. A, Representative immunoblots from Shh immunoprecipitations in AEC culture medium ($n = 3$) with control IgGM (0.1 μ g/ml and 1 μ g/ml) and AB5E1 (0.1 μ g/ml and 1 μ g/ml). B, Schema depicting AEC cultures in the ALI model and AB5E1 treatment in culture medium to investigate transcript levels, protein levels and localizations, and TEER during the process of differentiation. C, Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-14 showing basal cells (p63, green). Nuclei are stained in blue (DAPI). D, Box and whiskers plot (median with IQR) represents the percentage of p63+ cells ($n = 5$) on total cell population (evaluated on DAPI-stained cells count) at ALI-7 and ALI-14 in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red). $*p < 0.05$ CTL vs AB5E1. E, Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-28 showing cilia (Arl13b, red). Nuclei are stained in blue (DAPI). F, Box and whiskers plot (median with IQR) represents the relative mean grey values of cilia-associated fluorescence ($n = 8$) at ALI-28 and ALI-35 (the baseline is given by the average value obtained from ALI-21 in normal condition) in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red). $*p < 0.05$ CTL vs AB5E1. G, Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-21 showing mucins (Muc5b, red; Muc5ac, green). Nuclei are stained in blue (DAPI). H, Box and whiskers plot (median with IQR) represents the relative mean grey values of the mucins associated fluorescence ratios Muc5ac/Muc5b ($n = 6$) at ALI-21, ALI-28 and ALI-35 (the baseline is given by the average value obtained from ALI-14 in normal condition for each mucin) in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red). $*p < 0.05$ CTL vs AB5E1. I, Box and whiskers plots (median with IQR) represent the TEER of AEC ($n = 5$) at ALI-35 in control condition (black) or treated with AB5E1 (red). $*p < 0.05$ CTL vs AB5E1. J, Schema summarizing Shh inhibition impact on cell differentiation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

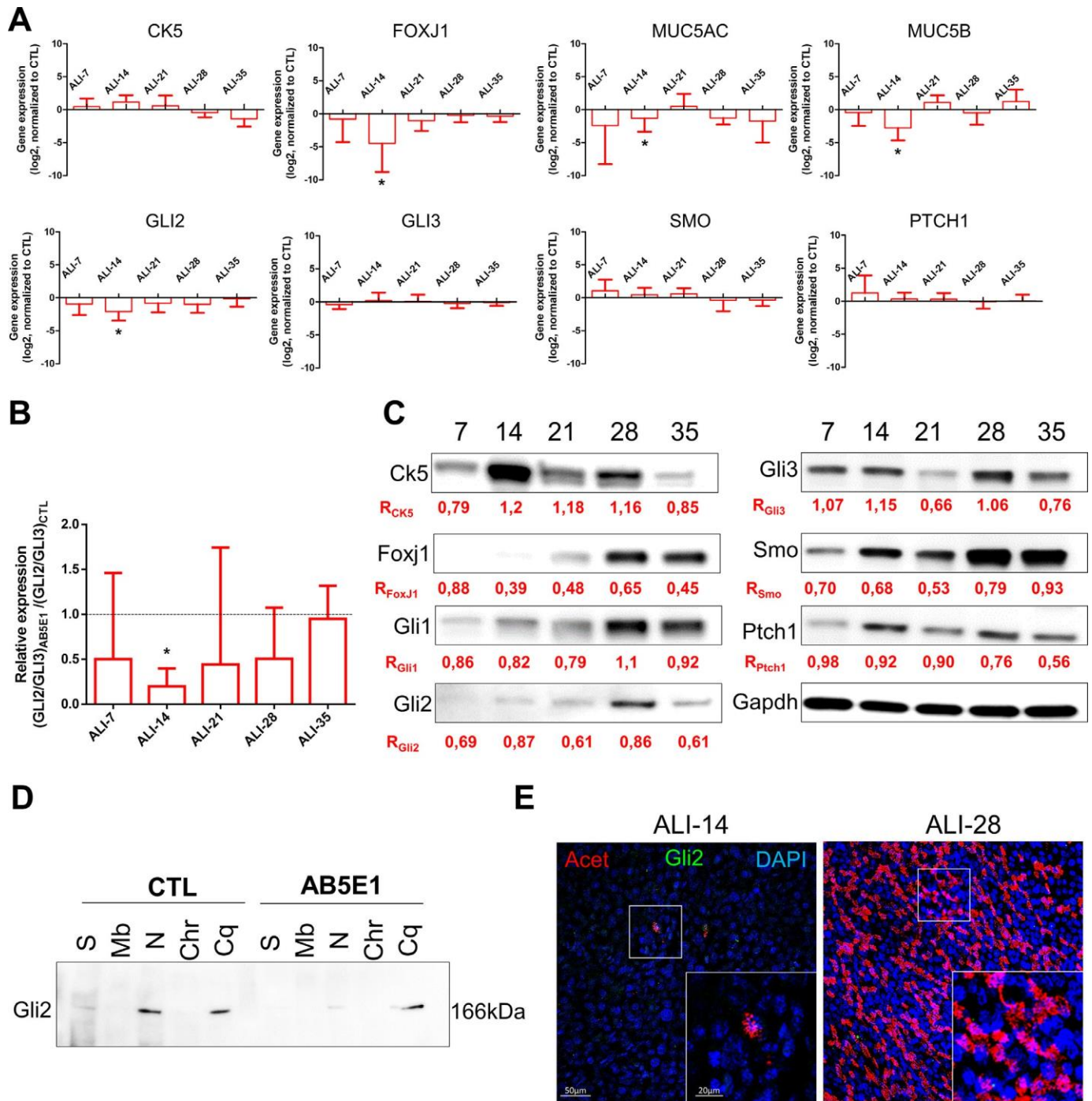


Fig. 4. Shh depletion decreased Gli2 expression and prevented its nuclear translocation. A, Histograms representing the assessment of fold-change (log₂) in the normalized expression to GAPDH of genes during the course of ALI cultures by RT-qPCR (*n* = 5) for differentiation markers (CK5, non-differentiated cells; FOXJ1, ciliated cells; and MUC5AC/MUC5B, mucous-secreting cells) and HH pathway elements (GLI2/3; SMO and PTCH1). Results show mean \pm SEM, **p* < 0.05 AB5E1 vs CTL. B, Histogram of the ratios of the transcripts levels of GLI2/GLI3 normalized to GAPDH in AB5E1-treated cells in comparison to CTL (median \pm SEM are shown). **p* < 0.05 AB5E1-treated cells vs CTL. C, Representative immunoblots of total proteins extracted from ALI AEC cultures treated with AB5E1 from ALI-0 to ALI-35 for the differentiation markers (Ck5 and Foxj1), HH pathway elements (Gli1/2/3; Smo; Ptch1) and Gapdh (*n* = 3). Ratios (R) indicate the normalized quantitative analysis of the expression of each protein compared to CTL. D, Representative Immunoblot of the fractionated protein extractions on CTL and AB5E1 treated-cells at ALI-7. The fractions are in order: S, soluble proteins; Mb, membrane-bound proteins; N, nuclear proteins; Chr, chromatin-bound proteins; Cq, cytoskeleton-bound proteins. E, Representative confocal acquisitions from AEC cultures AB5E1-treated at ALI-14 and ALI-28 for Gli2 (green), cilia (acetylated tubulin, red) and cell nuclei (DAPI, blue). Merged z-projections are shown with a magnification corresponding to the selected area. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

1. Discussion

An outstanding question in respiratory research is what are the molecular actors involved in epithelial remodelling largely responsible for airways obstruction and emphysema. In this study, we identified HH pathway and particularly Gli2 as an essential actor during

AEC differentiation and we identified Gli2 and Smo as potential markers of epithelial remodelling in COPD patients.

This report provided the first evidences for the secretion of the ligand Shh by progenitors of airway epithelial cells confirming and supporting previous observations showing Shh localization at the apical side of ciliated AEC on adult lung tissues [29]. To our

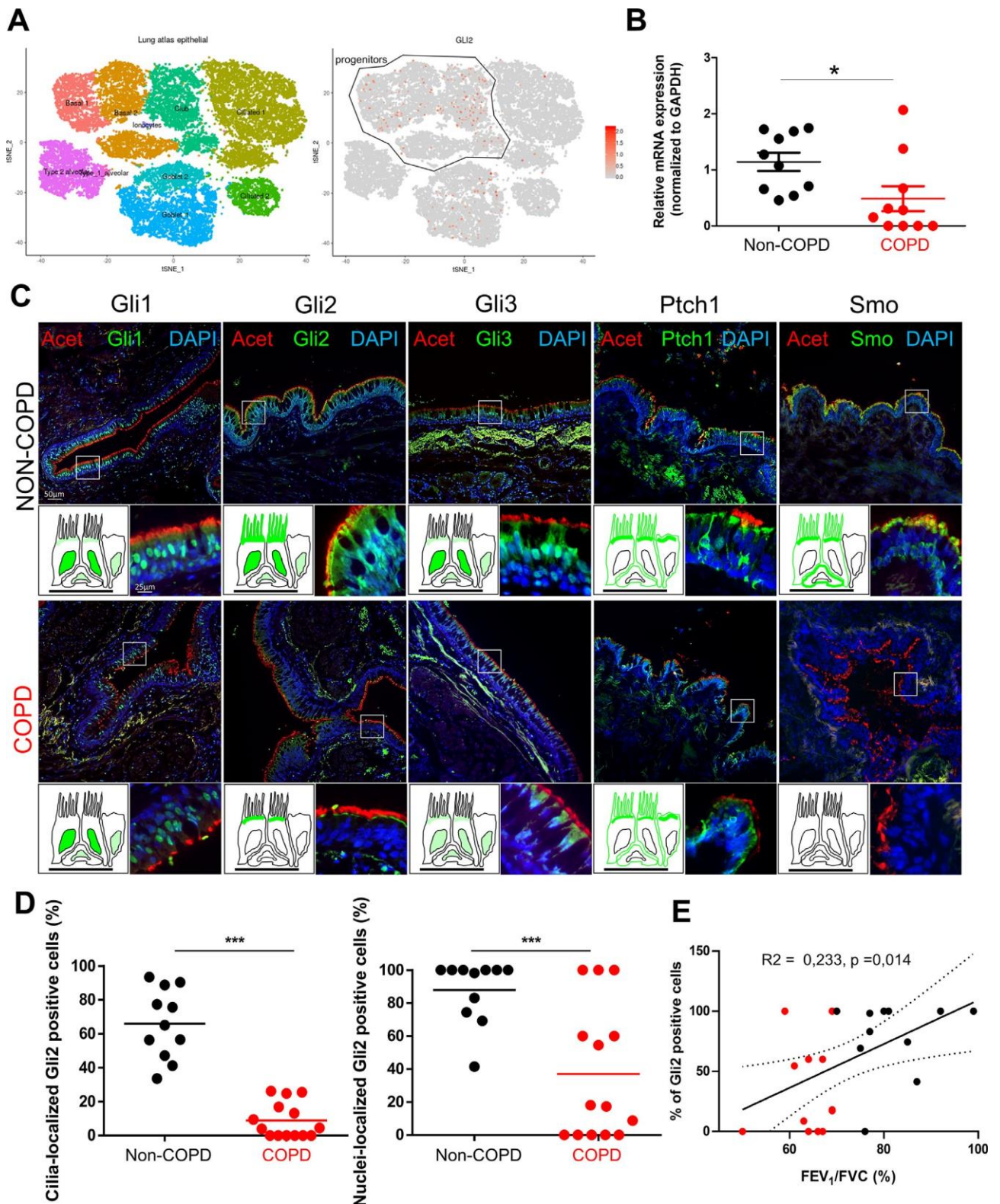


Fig. 5. Alteration of Gli2 localization in AEC is associated with COPD. A, Data extracted from the *Human Lung Atlas*. Left, cellular landscape along the airways in human lung analysed by single-cell RNA sequencing from 26154 cells collected from 17 donors to display specific cluster assignment of epithelial cells; right, identification of GLI2-expressing cells by t-distributed Stochastic Neighbour Embedding (tSNE). A progenitor cluster encompassing basal and club-like cells was added. B, Dot plot (mean) presenting the relative mRNAs levels normalized to GAPDH obtained on isolated AEC from bronchial brushings by RT-qPCR ($n = 20$ non-COPD and COPD patients) for GLI2. Means \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta C_t}$; $*p < 0.05$ non-COPD vs COPD patients. C, Representative micrographs showing the bronchi epithelia of non-COPD and COPD patients stained for the core HH pathway components Gli1, Gli2, Gli3, Ptch1 and Smo (all green); cilia (acetylated tubulin, red) and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification corresponding to the selected area is shown. Cartoons depict the localization of each HH pathway element (in green). D, Dot plots (mean) showing the percentages of Gli2 positive cells in cilia (left panel) and nuclei (right panel) in non-COPD (black) and COPD patients (red). $***p < 0.001$ non-COPD vs COPD. E, Linear regression of the percentages of nuclear Gli2 positive cells according to the FEV₁/FVC (%) for non-COPD (black) and COPD patients (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Characteristics of patients (lung tissues).

	Non-COPD (n = 20)	COPD (n = 20)	p
Sex ratio H/F	16/4	18/2	NS
Age, years	68.6 § 10 [51–86]	66.7 § 10 [52–84]	NS
Smoking history			
Never smokers	9 (45)	0	< 0.0001*
Current-smokers	4 (20)	13 (65)	0.004*
Former-smokers	7 (35)	7 (35)	NS
Pack-years	16.7 § 23.4 [0–80]	51 § 19.3 [20–100]	< 0.0001*
Spirometry			
FEV ₁ ,% of predicted value	97.9 § 22.6	77.6 § 16.0	0.003*
FVC,% of predicted value	92.3 § 21.7	95.2 § 19.5	NS
FEV ₁ /FVC%	80.3 § 7.5	61.5 § 6.2	< 0.0001*
Spirometric GOLD	NA	9/11/0	NS
1/2/3–4			

Data are expressed as mean § SD or number (%).

FEV₁: Forced Expiratory Volume in one second; FVC: Forced Vital Capacity.

NA: Not applicable, NS: Not significant, *: significant p-value.

knowledge, we assembled for the first time evidence at the level of transcripts, protein expression and localization regarding to the five core elements of the HH pathway (Gli1, Gli2, Gli3, Smo and Ptch1) in the context of airway epithelial cell differentiation and in adult bronchi. We confirmed previous observations of HH pathway actors in ciliated cells but we moved further in the understanding of its role via an *in vitro* experimental approach allowing HH inhibition at the level of the ligand. HH pathway was commonly modulated by pharmacologic inhibitors but their toxicity and off-targets effects were often an issue to interpret results [65–69]. Thus, we resorted to ligand trap with a Shh antibody to abrogate HH activation [39,54]. HH inhibitors are particularly investigated in the context of cancer research because of its overexpression in most of cancers [18,66], and if AB5E1 has not yet reached human trials, it was a strong candidate to safely interfere with HH signalling in a clinical setting [55].

Basal AEC identity and establishment of ciliated cells were particularly impacted upon HH pathway inhibition in the course of *in vitro* differentiation. Evaluating the consequences of AB5E1 presence at the beginning of AEC cultures establishment suggested that HH pathway inhibition was not sufficient to alter proliferation; but epithelial remodelling was observed upon AB5E1 treatment when cells reached confluency to initiate ALI-switch differentiation. Therefore, a distinct role of HH pathway as a driver of non-differentiated cell fate in the context of the lung epithelia was identified. This was in accordance with previous investigations unveiling the importance of HH signalling in regulating the balance between repair and quiescence [24].

The most striking effect of HH pathway inhibition during AEC differentiation was observed on ciliated cells. A strong reduction of cilia was observed from ALI-14 and persisted until ALI-35 although the comparative analysis was not systematically significant. It may be seen as a delay in differentiation related to the availability of the ligand Shh but further molecular characterization will be required to propose a complete mechanical pathway of HH effectors involved in the establishment of a functional epithelium. Alterations of the presence, structure and function of cilia on differentiated AEC were not completely elucidated while the mucociliary clearance was often seen as a readout of normal lung function [70,71]. Mucins secretion was not significantly impacted although there was a trend favouring Muc5b producing cells despite the reduction of MUC5AC and MUC5B transcripts at the beginning of differentiation, therefore it will be interesting to fully characterize cilia and goblet cells alterations upon HH inhibition to understand the molecular events leading to epithelial remodelling particularly since we also observed primary cilia defects in COPD patients [50].

Of particular interest, we unveiled that blocking HH signalling pathway essentially involved Gli2: first, mRNA and protein levels were particularly reduced during the first steps of differentiation indicating that HH pathway inhibition mainly impacted progenitors; second, Gli2 translocation in the nucleus was lost during AEC differentiation. The presence of this transcription factor in nuclei could be used as a tool to evaluate HH pathway activation in homeostasis and pathologic situations. In contrast with a recent report focused on Ptch1 in airways [30], we did not see an overexpression of this receptor in lung tissues but we only included early to moderate COPD patients while the alteration of Ptch1 was shown in moderate to severe COPD tissues. In addition, we performed our immunostaining analysis via immunofluorescence microscopy processing to reduce tissue alteration and we used frozen tissues to better characterize the localization of receptors since FFPE techniques are known to alter membrane-bound proteins [72,73]. The protein

levels of Smo were also reduced upon HH inhibition. Interestingly COPD patients were characterized by a strong alteration of this receptor responsible for the binding of the ligand. Thus, the link between these two actors of the signalling cascade will require further evaluation to address the origin of the dysfunction considering the pathway as a whole.

There are four main limitations to this study. Firstly, not all the known elements of HH pathway were investigated. We focused on the three main transcription factors Glis and the two receptors Ptch1 and Smo but of particular interest would be also Suppressor of Fused Homolog (SuFu) which is part of a regulating complex allowing the activation of HH pathway [74]; HH Interacting Protein (HHIP) acting as a ligand receptor and associated with COPD [75–77]; Ptch2, Gas1, Cdo and Boc, all identified as HH receptorsome but not fully characterized in any physiological context [75,78–80]. The second limitation is the experimental approach with AB5E1: maintaining efficient silencing through si/shRNA or selecting clones with CRISPR-Cas9 would improve the robustness of the results but it would be particularly challenging in the context of lung research with primary cells originating from patients where cell differentiation is monitored during several weeks or months [81–83]. Thus we chose to interfere with HH pathway with an antibody directed against the ligand Shh allowing us to act upstream in the signalling cascade and avoiding off-target effects. The third limitation is the source of AEC. Although the primary cells were not directly isolated from bronchi mainly because it did not provide sufficient cells to test all the necessary conditions and collect sufficient materials to analyse, human primary epithelial cells isolated from nasal polyps were a great surrogate to study airway epithelial cell differentiation *in vitro* [13,52,84]. In addition, our data focused on large airways, it would be interesting to repeat the experimental approaches on small airways to complement the observations. The fourth limitation was the source of lung tissues. Patients were all scheduled for lung resection for cancer; we took only in consideration early to moderate COPD patients as we attempted to identify epithelial alterations at the origin of the disease; and finally we focused our observations solely on bronchi to explore potential modifications in the first divisions of the lung airways. Therefore it will be crucial in future research to obtain biological materials devoid of a cancer component and to take into account severe COPD patients and small airways in the analysis.

Our findings highlight the importance of HH signalling in the process of epithelial cell differentiation in the airways. We described Gli2 as a novel important regulator of basal cell fate to emphasize the utmost significance of understanding progenitor cell homeostasis [85]. In addition, we provided the first analysis of HH pathway core components in COPD. Evaluation of Gli2 localization in airways may provide a useful tool to characterize COPD patients and help designing innovative therapeutics to oppose epithelial remodelling and thus improve respiratory functions.

Declaration of competing interest

Dr. Deslee reports personal fees from Nuvaira, personal fees from BTG/PneumRx, personal fees from Chiesi, personal fees from Boehringer, personal fees from Astra Zeneca, outside the submitted work.

Acknowledgments

We thank the members of the Inserm UMR-S 1250 unit and our collaborators for their helpful comments and insights. We thank the Platform of Cell and Tissue Imaging (PICT) for technical assistance. We thank Clinic *La Sagesse* for their collaboration in sample collection.

Funding sources

This work was supported by Funding from University of Reims Champagne-Ardenne (URCA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm). It was carried out in the framework of the Federative Research Structure *CAP-Sante*, and benefited from the Project Research and Innovation in Inflammatory Respiratory Diseases (RINNOPARI).

Author contributions

RB, MP, GaD and VD designed the research. JA, JMP, PB, XD, JCM, GoD and GaD provided the human samples and clinical characterization. RB, EL, ZD, AG, NL and VD performed experiments. RB, JA, JMP, PB, GaD and VD analysed data. RB, JA, GaD and VD wrote the paper. All authors approved the submitted version of the manuscript.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.033.

References

[1] Criner RN, Han MK. COPD care in the 21st century: a public health priority. *Respir Care* 2018;63:591–600. doi: 10.4187/respcare.06276.

[2] Miravittles M, Roche N, Cardoso J, Halpin D, Aisanov Z, Kankaanranta H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease guidelines in Europe: a look into the future. *Respir Res* 2018;19:11. doi: 10.1186/s12931-018-0715-1.

[3] Singh D, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the gold science committee report 2019. *Eur Respir J* 2019;1900164. doi: 10.1183/13993003.00164-2019.

[4] Hangaard S, Helle T, Nielsen C, Hejlesen OK. Causes of misdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic scoping review. *Respir Med* 2017;129:63–84. doi: 10.1016/j.rmed.2017.05.015.

[5] Stockley JA, Cooper BG, Stockley RA, Sapey E. Small airways disease: time for a revisit? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017;12:2343–53. doi: 10.2147/COPD.S138540.

[6] Roche N. Stable COPD treatment: where are we? *COPD* 2018;15:123–9. doi: 10.1080/15412555.2018.1445214.

[7] Wechsler ME. Current and emerging biologic therapies for asthma and COPD. *Respir Care* 2018;63:699–707. doi: 10.4187/respcare.06322.

[8] Riley CM, Sciruba FC. Diagnosis and outpatient management of chronic obstructive pulmonary disease: a review. *JAMA* 2019;321:786–97. doi: 10.1001/jama.2019.0131.

[9] Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest* 2013;144:1026–32. doi: 10.1378/chest.12-3073.

[10] Higham A, Quinn AM, Cançado JED, Singh D. The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions. *Respir Res* 2019;20:49. doi: 10.1186/s12931-019-1017-y.

[11] Sohal SS. Epithelial and endothelial cell plasticity in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Investig* 2017;55:104–13. doi: 10.1016/j.res-inv.2016.11.006.

[12] Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu Rev Physiol* 2015;77:379–406. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071931.

[13] Yaghi A, Zaman A, Cox G, Dolovich MB. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respir Med* 2012;106:1139–47. doi: 10.1016/j.rmed.2012.04.001.

[14] Zuo W-L, Yang J, Strulovici-Barel Y, Salit J, Rostami M, Mezey JG, et al. Exaggerated BMP4 signalling alters human airway basal progenitor cell differentiation to

cigarette smoking-related phenotypes. *Eur Respir J* 2019;53. doi: 10.1183/13993003.02553-2017.

[15] Kugler MC, Joyner AL, Loomis CA, Munger JS. Sonic hedgehog signaling in the lung from development to disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;52:1–13. doi: 10.1165/rcmb.2014-0132TR.

[16] Bolaños AL, Milla CM, Lira JC, Ramírez R, Checa M, Barrera L, et al. Role of sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L978–90. doi: 10.1152/ajplung.00184.2012.

[17] Wang C, de Mochel NSR, Christenson SA, Cassandras M, Moon R, Brumwell AN, et al. Expansion of hedgehog disrupts mesenchymal identity and induces emphysema phenotype. *J Clin Invest* 2018;128:4343–58. doi: 10.1172/JCI99435.

[18] Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL, de SE. A highlight on sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal* 2018;16:11. doi: 10.1186/s12964-018-0220-7.

[19] Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development* 2019;146. doi: 10.1242/dev.166892.

[20] Regan JL, Schumacher D, Staudte S, Steffen A, Haybaeck J, Keilholz U, et al. Non-canonical hedgehog signaling is a positive regulator of the WNT pathway and is required for the survival of colon cancer stem cells. *Cell Rep* 2017;21:2813–28. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.025.

[21] Brennan D, Chen X, Cheng L, Mahoney M, Riobo NA. Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam Horm* 2012;88:55–72. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00003-1.

[22] Fernandes-Silva H, Correia-Pinto J, Moura RS. Canonical sonic hedgehog signaling in early lung development. *J Dev Biol* 2017;5. doi: 10.3390/jdb5010003.

[23] Kugler MC, Loomis CA, Zhao Z, Cushman JC, Liu L, Munger JS. Sonic hedgehog signaling regulates myofibroblast function during alveolar septum formation in murine postnatal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;57:280–93. doi: 10.1165/rcmb.2016-02680C.

[24] Peng T, Frank DB, Kadzik RS, Morley MP, Rathi KS, Wang T, et al. Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature* 2015;526:578–82. doi: 10.1038/nature14984.

[25] Sriperumbudur A, Breitzig M, Lockey R, Kolliputi N. Hedgehog: the key to maintaining adult lung repair and regeneration. *J Cell Commun Signal* 2017;11:95–6. doi: 10.1007/s12079-016-0365-3.

[26] Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, et al. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet* 2009;5:e1000421. doi: 10.1371/journal.pgen.1000421.

[27] Kim WJ, Lee SD. Candidate genes for COPD: current evidence and research. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015;10:2249–55. doi: 10.2147/COPD.S80227.

[28] Li Y, Cho MH, Zhou X. What do polymorphisms tell us about the mechanisms of COPD? *Clin Sci* 2017;131:2847–63. doi: 10.1042/CS20160718.

[29] Mao S, Shah AS, Moninger TO, Ostedgaard LS, Lu L, Tang XX, et al. Motile cilia of human airway epithelia contain hedgehog signaling components that mediate noncanonical hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115:1370–5. doi: 10.1073/pnas.1719177115.

[30] Tam A, Hughes M, McNagny KM, Obeidat M, Hackett TL, Leung JM, et al. Hedgehog signaling in the airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 2019;9:3353. doi: 10.1038/s41598-019-40045-3.

[31] Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, et al. British thoracic society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by nice. *Thorax* 2013;68:11–44. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203618.

[32] Ho T, Cusack RP, Chaudhary N, Satia I, Kurmi OP. Under- and over-diagnosis of COPD: a global perspective. *Breathe (Sheff)* 2019;15:24–35. doi: 10.1183/20734735.0346-2018.

[33] Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, Bonnomet A, Lesage J, Merol J-C, et al. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. *J Pathol* 2015;235:408–19. doi: 10.1002/path.4471.

[34] Jiang D, Schaefer N, Chu HW. Air-liquid interface culture of human and mouse airway epithelial cells. *Methods Mol Biol* 2018;1809:91–109. doi: 10.1007/978-1-4939-8570-8_8.

[35] Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Sci Rep* 2015;5:8163. doi: 10.1038/srep08163.

[36] Müller L, Brighton LE, Carson JL, Fischer WA, Jaspers I. Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *J Vis Exp* 2013. doi: 10.3791/50646.

[37] 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;300:L25–31. doi: 10.1152/ajplung.00256.2010.

[38] Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavaud A, Paquet A, Arguel M-J, et al. Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development* 2019. doi: 10.1242/dev.177428.

[39] Maun HR, Wen X, Lingel A, de Sauvage FJ, Lazarus RA, Scales SJ, et al. Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J Biol Chem* 2010;285:26570–80. doi: 10.1074/jbc.M110.112284.

[40] Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. Two critical periods of sonic hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996;87:661–73. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81386-0.

[41] Wang LC, Liu ZY, Gambardella L, Delacour A, Shapiro R, Yang J, et al. Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *J Invest Dermatol* 2000;114:901–8. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00951.x.

[42] Pepinsky RB, Rayhorn P, Day ES, Dergay A, Williams KP, Galdes A, et al. Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. *J Biol Chem* 2000;275:10995–1001. doi: 10.1074/jbc.275.15.10995.

- [1] Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998;273:14037–45. doi: [10.1074/jbc.273.22.14037](#).
- [2] Chaudary N, Pintilie M, Hedley D, Hill RP, Milosevic M, Mackay H. Hedgehog inhibition enhances efficacy of radiation and cisplatin in orthotopic cervical cancer xenografts. *Br J Cancer* 2017;116:50–7. doi: [10.1038/bjc.2016.383](#).
- [3] Donnelly JM, Chawla A, Houghton J, Zavros Y. Sonic hedgehog mediates the proliferation and recruitment of transformed mesenchymal stem cells to the stomach. *PLoS One* 2013;8:e75225. doi: [10.1371/journal.pone.0075225](#).
- [4] Alfaro AC, Roberts B, Kwong L, Bijlsma MF, Roelink H. Ptc2 mediates the Shh response in Ptc1^{-/-} cells. *Development* 2014;141:3331–9. doi: [10.1242/dev.110056](#).
- [5] Xiao C, Ogle SA, Schumacher MA, Schilling N, Tokhunts RA, Orr-Asman MA, et al. Hedgehog signaling regulates E-cadherin expression for the maintenance of the actin cytoskeleton and tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G1252–65. doi: [10.1152/ajpgi.00512.2009](#).
- [6] Bailey JM, Swanson BJ, Hamada T, Eggers JP, Singh PK, Caffery T, et al. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:5995–6004. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-08-0291](#).
- [7] Pascual O, Traiffort E, Baker DP, Galdes A, Ruat M, Champagnat J. Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *Eur J Neurosci* 2005;22:389–96. doi: [10.1111/j.1460-9568.2005.04223.x](#).
- [8] Perotin J-M, Coraux C, Lagonotte E, Birembaut P, Delepine G, Polette M, et al. Alteration of primary cilia in COPD. *Eur Respir J* 2018;52. doi: [10.1183/13993003.00122-2018](#).
- [9] Katoh Y, Katoh M. Integrative genomic analyses on GLI1: positive regulation of GLI1 by Hedgehog-GLI, TGFbeta-Smads, and RTK-PI3K-AKT signals, and negative regulation of GLI1 by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-Gs-PKA signals. *Int J Oncol* 2009;35:187–92. doi: [10.3892/ijo.00000328](#).
- [10] Giovannini-Chami L, Paquet A, Sanfiorenzo C, Pons N, Cazareth J, Magnone V, et al. The “one airway, one disease” concept in light of Th2 inflammation. *Eur Respir J* 2018;52. doi: [10.1183/13993003.00437-2018](#).
- [11] Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wemeau-Stervinou L, Fabre A, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- β -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2012;181:2126–37. doi: [10.1016/j.ajpath.2012.08.019](#).
- [12] Kugler MC, Yie T-A, Cai Y, Berger JZ, Loomis CA, Munger JS. The Hedgehog target GLI1 is not required for bleomycin-induced lung fibrosis. *Exp Lung Res* 2019;45:22–9. doi: [10.1080/01902148.2019.1601795](#).
- [13] Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo H-W. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothed and GLI inhibitors. *Cancers (Basel)* 2016;8. doi: [10.3390/cancers8020022](#).
- [14] Kesimer M, Ford AA, Ceppe A, Radicioni G, Cao R, Davis CW, et al. Airway mucin concentration as a marker of chronic bronchitis. *N Engl J Med* 2017;377:911–22. doi: [10.1056/NEJMoa1701632](#).
- [15] Ma J, Rubin BK, Voynov JA. Mucins, mucus, and goblet cells. *Chest* 2018;154:169–76. doi: [10.1016/j.chest.2017.11.008](#).
- [16] Ostedgaard LS, Moninger TO, McMenimen JD, Sawin NM, Parker CP, Thornell IM, et al. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:6842–7. doi: [10.1073/pnas.1703228114](#).
- [17] Wu F, Zhang Y, Sun B, McMahon AP, Wang Y. Hedgehog signaling: from basic biology to cancer therapy. *Cell Chem Biol* 2017;24:252–80. doi: [10.1016/j.chembiol.2017.02.010](#).
- [18] Falkenstein KN, Vokes SA. Transcriptional regulation of graded Hedgehog signaling. *Semin Cell Dev Biol* 2014;33:73–80. doi: [10.1016/j.semcdb.2014.05.010](#).
- [19] Niewiadomski P, Niedzioka SM, Markiewicz σ , Uspienski T, Baran B, Chojnowska K. Gli proteins: regulation in development and cancer. *Cells* 2019;8. doi: [10.3390/cells8020147](#).
- [20] Schiller HB, Montoro DT, Simon LM, Rawlins EL, Meyer KB, Strunz M, et al. The human lung cell atlas: a high-resolution reference map of the human lung in health and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019;61:31–41. doi: [10.1165/rcmb.2018-0416TR](#).
- [21] Reyfman PA, Walter JM, Joshi N, Anekalla KR, McQuattie-Pimentel AC, Chiu S, et al. Single-cell transcriptomic analysis of human lung provides insights into the pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:1517–36. doi: [10.1164/rccm.201712-2410OC](#).
- [22] Ordovas-Montanes J, Dwyer DF, Nyquist SK, Buchheit KM, Vukovic M, Deb C, et al. Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. *Nature* 2018;560:649–54. doi: [10.1038/s41586-018-0449-8](#).
- [23] Peer E, Tesanovic S, Aberger F. Next-generation Hedgehog/GLI pathway inhibitors for cancer therapy. *Cancers (Basel)* 2019;11. doi: [10.3390/cancers11040538](#).
- [24] Xie H, Paradise BD, Ma WW, Fernandez-Zapico ME. Recent advances in the clinical targeting of Hedgehog/GLI signaling in cancer. *Cells* 2019;8. doi: [10.3390/cells8050394](#).
- [25] Girardi D, Barrichello A, Fernandes G, Pereira A. Targeting the Hedgehog pathway in cancer: current evidence and future perspectives. *Cells* 2019;8. doi: [10.3390/cells8020153](#).
- [26] Salaritabar A, Berindan-Neagoe I, Darvish B, Hadjiakhoondi F, Manayi A, Devi KP, et al. Targeting Hedgehog signaling pathway: paving the road for cancer therapy. *Pharmacol Res* 2019;141:466–80. doi: [10.1016/j.phrs.2019.01.014](#).
- [27] Sabol M, Trnski D, Musani V, Ozretic P, Levant S. Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets. *Int J Mol Sci* 2018;19. doi: [10.3390/ijms19092562](#).
- [28] Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and mucociliary clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:a028241. doi: [10.1101/cshperspect.a028241](#).
- [29] Whitsett JA. Airway epithelial differentiation and mucociliary clearance. *Ann Am Thorac Soc* 2018;15:S143–8. doi: [10.1513/AnnalsATS.201802-128AW](#).
- [30] Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 2019;1897:289–98. doi: [10.1007/978-1-4939-8935-5_25](#).
- [31] Gandjeva A, Tuder RM. Lung histological methods. *Methods Mol Biol* 2018;1809:315–29. doi: [10.1007/978-1-4939-8570-8_20](#).
- [32] Huang D, Wang Y, Tang J, Luo S. Molecular mechanisms of suppressor of fused in regulating the hedgehog signalling pathway. *Oncol Lett* 2018;15:6077–86. doi: [10.3892/ol.2018.8142](#).
- [33] Holtz AM, Peterson KA, Nishi Y, Morin S, Song JY, Charron F, et al. Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. *Development* 2013;140:3423–34. doi: [10.1242/dev.095083](#).
- [34] Prokopenko D, Sakornsakolpat P, Pier HL, Qiao D, Parker MM, McDonald M-LN, et al. Whole-Genome sequencing in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;59:614–22. doi: [10.1165/rcmb.2018-00880C](#).
- [35] Wan ES, Li Y, Lao T, Qiu W, Jiang Z, Mancini JD, et al. Metabolomic profiling in a hedgehog interacting protein (Hhip) murine model of chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 2017;7:2504. doi: [10.1038/s41598-017-02701-4](#).
- [36] Jeong M-H, Leem Y-E, Kim H-J, Kang K, Cho H, Kang J-S. A Shh coreceptor Cdo is required for efficient cardiomyogenesis of pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2016;93:57–66. doi: [10.1016/j.yjmcc.2016.01.013](#).
- [37] Jin S, Martinelli DC, Zheng X, Tessier-Lavigne M, Fan C-M. Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:E73–80. doi: [10.1073/pnas.1418629112](#).
- [38] Izzi L, Levesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, et al. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptc1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell* 2011;20:788–801. doi: [10.1016/j.devcel.2011.04.017](#).
- [39] Alapati D, Morrisey EE. Gene editing and genetic lung disease: basic research meets therapeutic application. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;56:283–90. doi: [10.1165/rcmb.2016-0301PS](#).
- [40] Dakhama A, Chu HW. The use of CRISPR-Cas9 technology to reveal important aspects of human airway biology. *Methods Mol Biol* 2018;1799:371–80. doi: [10.1007/978-1-4939-7896-0_27](#).
- [41] Rosen BH, Chanson M, Gawenis LR, Liu J, Sofoluwe A, Zoso A, et al. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2018;17:S28–34. doi: [10.1016/j.jcf.2017.09.001](#).
- [42] Brewington JJ, Filbrandt ET, LaRosa FJ, Moncivaiz JD, Ostmann AJ, Strecker LM, et al. Brushed nasal epithelial cells are a surrogate for bronchial epithelial CFTR studies. *JCI Insight* 2018;3. doi: [10.1172/jci.insight.99385](#).
- [43] Crystal RG. Airway basal cells. The “smoking gun” of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1355–62. doi: [10.1164/rccm.201408-1492PP](#).

Supplemental Figure Legends

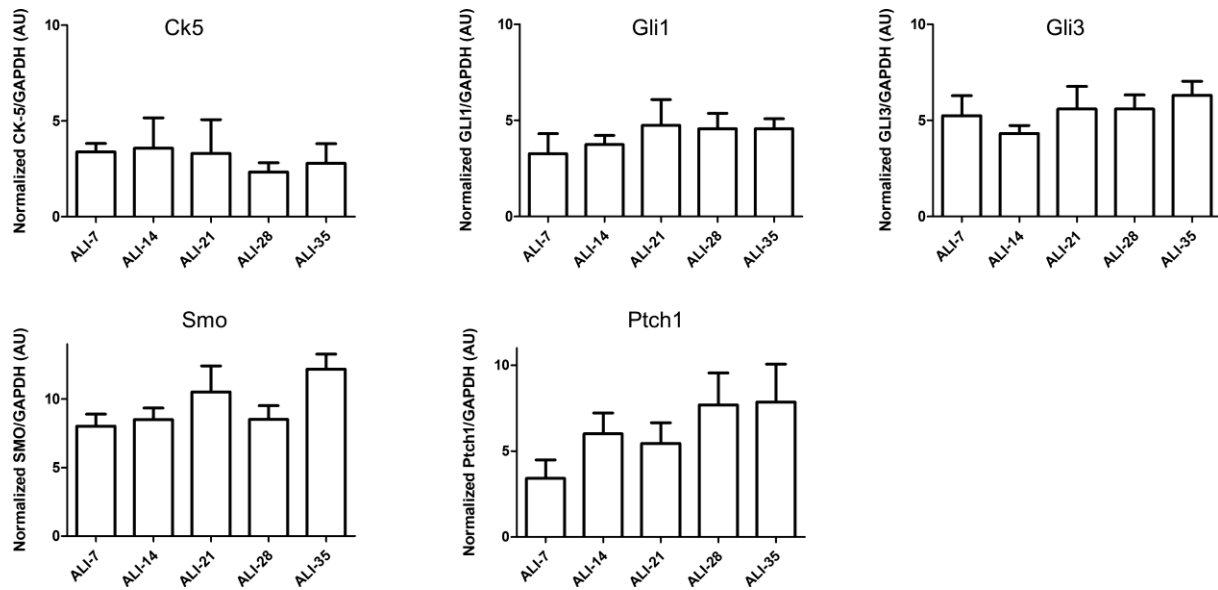


Fig. S1. Protein levels of Ck5, Gli1, Gli3, Smo and Ptch1 are not significantly altered during AEC differentiation. Histograms showing the relative expressions of Ck5, Gli1, Gli3, Smo and Ptch1 protein levels as evaluated by electrophoresis analysis after processing on ImageJ (Gapdh normalized ratios) during the course of AEC differentiation (in arbitrary units, AU). Results show mean±SEM.

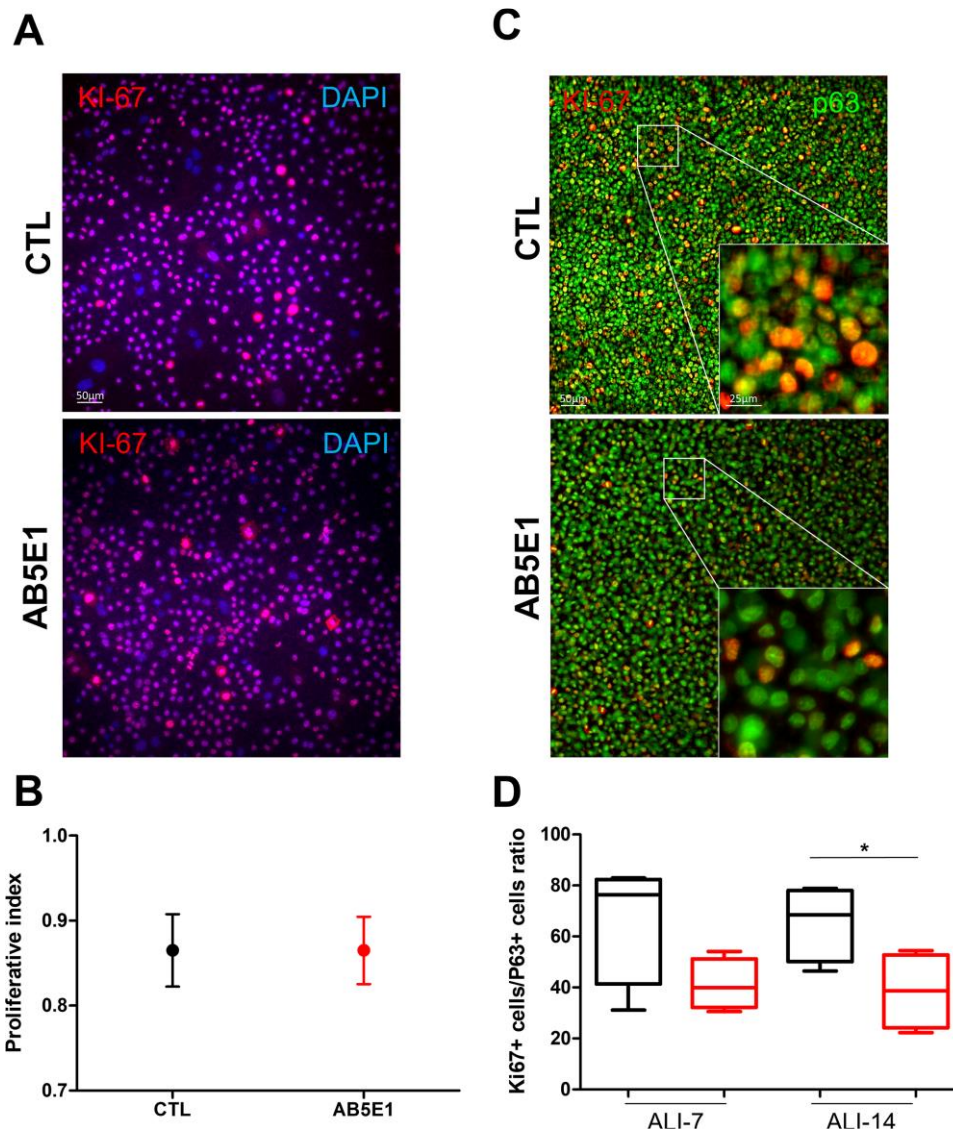


Fig. S2. HH pathway inhibition does not interfere with AEC proliferation before ALI switch. **A**, Examples of micrographs taken from AEC cultures at 50% confluency pre-ALI. Ki67 is shown in red and cell nuclei in blue (DAPI). **B**, Graph representing mean±SEM of proliferative index (n=4) in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red). **C**, Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-14. Ki67 is shown in red, p63 in green. Magnification corresponding to the selected area is shown. **D**, Box and whiskers plot (median with IQR) represents the proportion of Ki67+/p63+ cells (n=4) in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red). *p<0.05 CTL vs AB5E1.

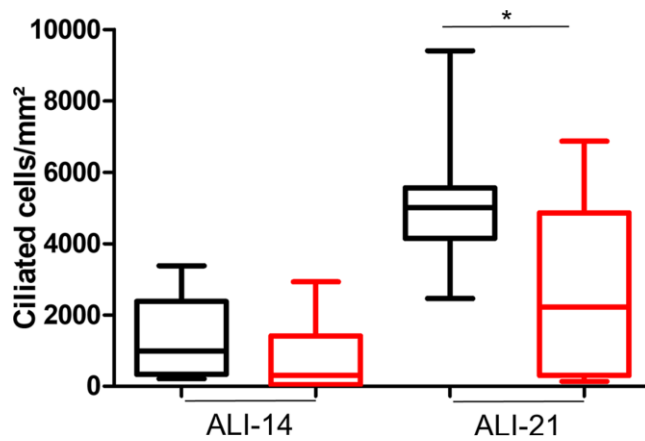


Fig. S3. HH pathway inhibition significantly alters ciliogenesis at the beginning of multi-ciliated cells differentiation. Box and whiskers plot (median with IQR) represents the number of ciliated cells/mm² of culture (n=8) at ALI-14 and ALI-21 in CTL (black) and AB5E1-treated cells (red). *p<0.05 CTL vs AB5E1

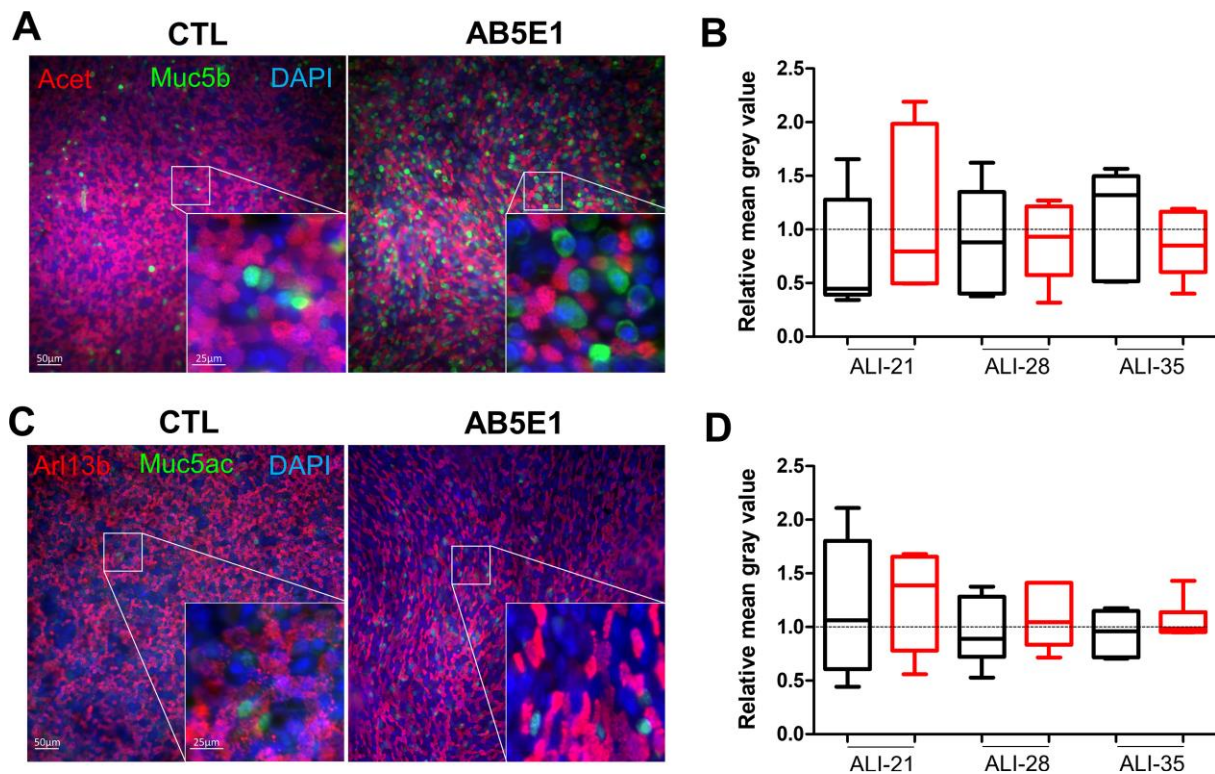


Fig. S4. HH pathway inhibition does not interfere with AEC secretory cell fate. **A**, Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-21 showing mucin Muc5b (green) and cilia (acetylated tubulin, red). Nuclei are stained in blue (DAPI). Magnification corresponding to the selected area is shown. **B**, Box and whiskers plot (median with IQR) represents the relative mean grey values (n=6) of Muc5b-associated fluorescence at ALI-21, ALI28 and ALI-35 (the baseline is given by the average value obtained from ALI-14 in normal condition) in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red). **C**, Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-21 showing mucin Muc5ac (green) and cilia (acetylated tubulin, red). Nuclei are stained in blue (DAPI). Magnification corresponding to the selected area is shown. **D**, Box and whiskers plot (median with IQR) represents the relative mean grey values (n=6) of Muc5ac-associated fluorescence at ALI-21, ALI28 and ALI-35 (the baseline is given by the average value obtained from ALI-14 in normal condition) in normal condition (black) and AB5E1-treated cells (red).

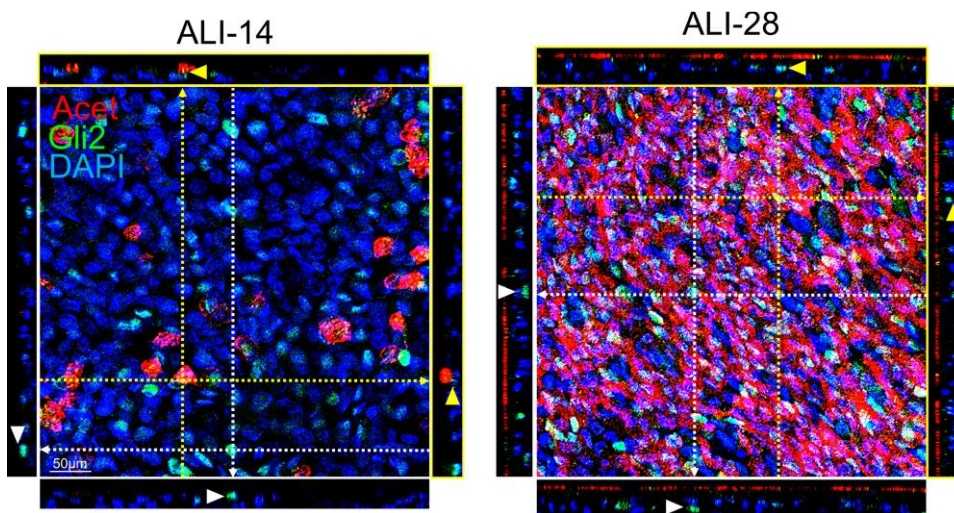


Fig. S5. Gli2 is present in the nuclei of progenitor AEC and ciliated cells during differentiation. Representative confocal acquisitions from AEC cultures at ALI-14 and ALI-28 for Gli2 (green), cilia (acetylated tubulin, red) and cell nuclei (DAPI, blue). Merged z-projections are shown with orthogonal projections on two selected area depicted by yellow or white dashed arrows. Arrowheads show the localization of Gli2 on progenitor cells (white) or ciliated cells (yellow).

Airway Epithelial Cell Differentiation Relies on Deficient Hedgehog Signalling in COPD

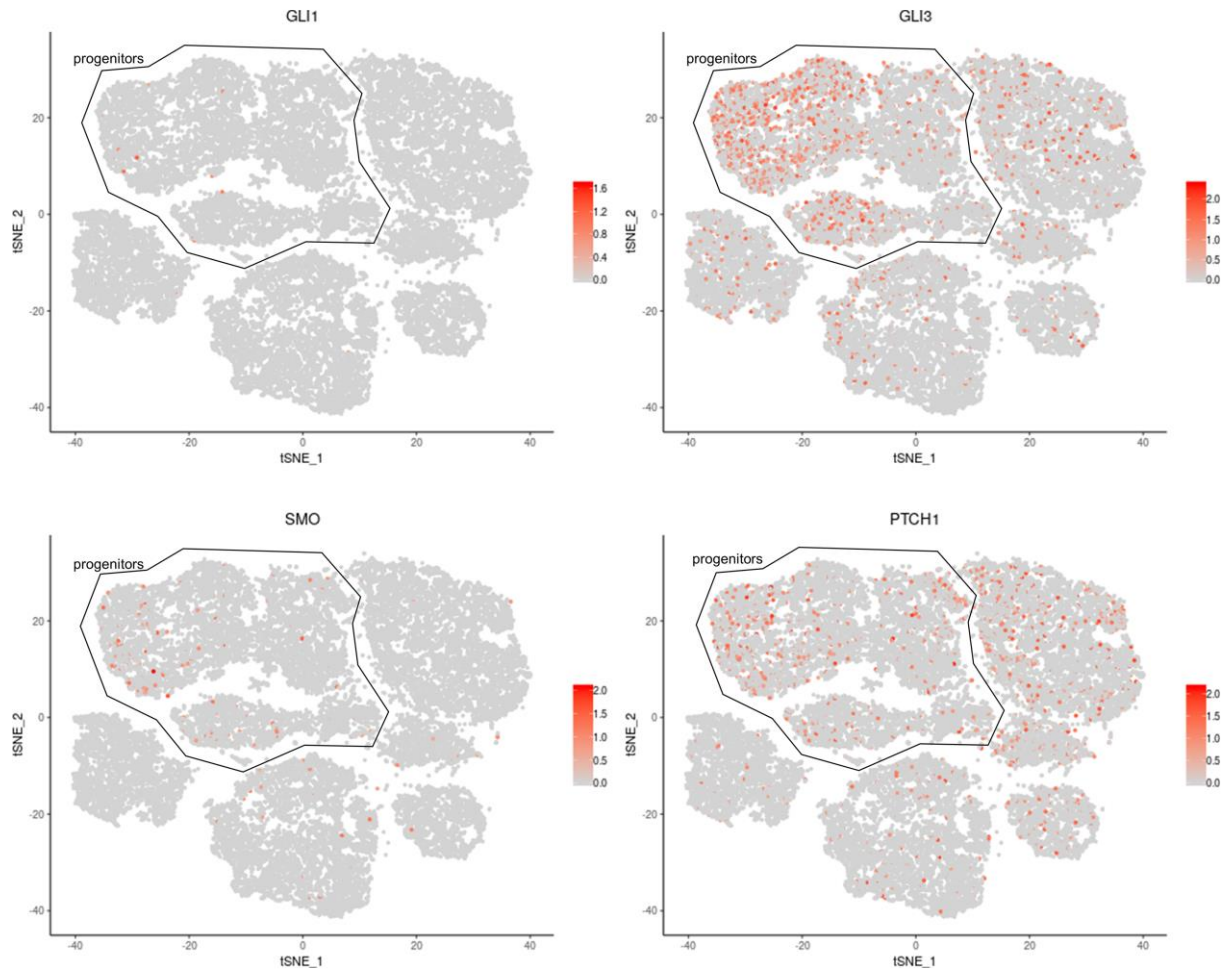


Fig. S6. GLI1/3, SMO and PTCH1 transcripts are identified on lung epithelial cells. Data extracted from the *Human Lung Atlas*. Identification of GLI1/3-, SMO- and PTCH1-expressing cells by t-distributed Stochastic Neighbour Embedding (tSNE). A progenitor cluster encompassing basal and club-like cells was added.

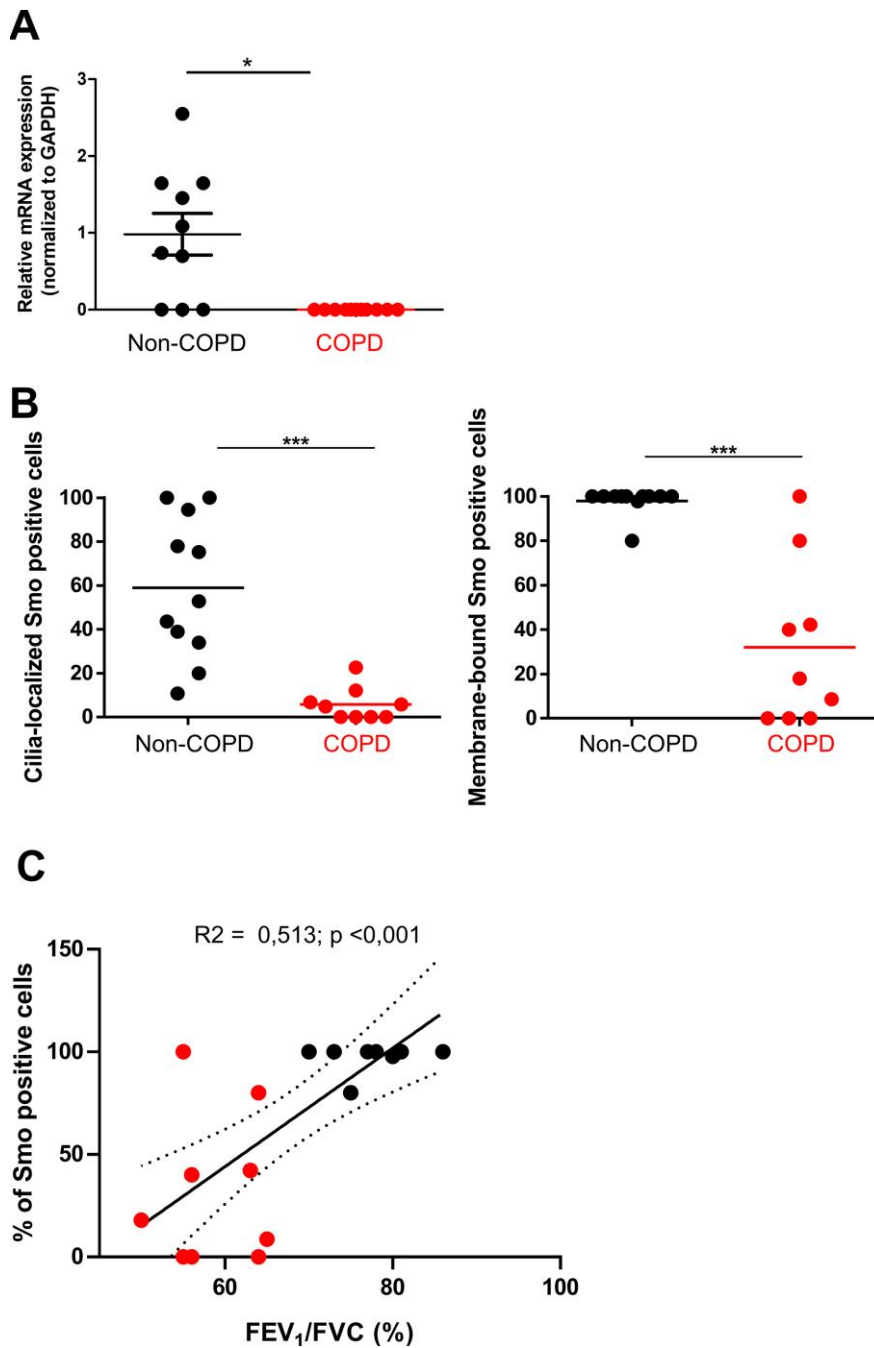


Fig. S7. Smo expression and localization are significantly altered in COPD patients. A, Dot plot (mean) presenting the relative mRNAs levels normalized to GAPDH obtained on isolated AEC from bronchial brushes by RT-qPCR (n=20 non-COPD and COPD patients) for SMO. Means \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$, *p<0.05 non-COPD vs COPD patients. **B,** Dot plots (mean) showing the percentages of cilia-localized Smo in epithelial cells (left panel) and membrane-bound (right panel) in non-COPD (black) and COPD patients (red). ***, p<0.001 non-COPD vs COPD. **C,** Linear regression of the percentages of membrane-bound Smo positive cells according to the FEV₁/FVC (%) for non-COPD (black) and COPD patients (red).

Table S1: Characteristics of patients (bronchial brushings from fiberoptic bronchoscopy)

	Non-COPD (n=10)	COPD (n=10)	p
Sex ratio H/F	5/5	7/3	NS
Age, years	57.1± 14 [26-76]	60.5± 13 [33-83]	NS
Smoking history			
Never smokers	2 (20)	0	NS
Current-smokers	3 (30)	4 (40)	NS
Former-smokers	5 (50)	6 (60)	NS
Pack-years	19 ± 20 [0-50]	46 ± 27 [10-90]	0.017*
Spirometry			
FEV1, % of predicted value	98 ± 24.6	57 ± 22	< 0.0001*
FVC, % of predicted value	99 ± 13	85 ± 22	NS
FEV1/FVC %	79 ± 7	51 ± 11	< 0.0001*
Spirometric GOLD 1/2/3-4	NA	3/3/4	
GOLD A/B/C/D	NA	5/1/1/3	

Data are expressed as mean ± SD or number (%) FEV1: Forced Expiratory Volume in one second;

FVC: Forced Vital Capacity

NA: Not applicable, *: significant p-value.

2. Voie Hedgehog, potentiel biomarqueur de la BPCO

2.1. Publication

Sonic Hedgehog signalling as a potential endobronchial biomarker in COPD

(Ancel et al., 2020)

Manuscrit en révision dans *Respiratory Research*.

2.2. Résumé

Des études pangénomiques ont associé la voie Hedgehog (HH) à la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et des études récentes suggèrent que la signalisation HH pourrait être modifiée dans la BPCO. Ainsi, nous avons évalué par des procédures de fibroscopies bronchiques mini-invasives l'activation de la voie HH, notamment son principal facteur de transcription Gli2 et le ligand Sonic HH (Shh).

Pour notre étude nous avons inclus 30 patients non-BPCO et 28 BPCO. Par technique de fibroscopie à fibre optique nous avons obtenu des brossages bronchiques, des liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA) et des biopsies bronchiques. La caractérisation des populations cellulaires et leur localisation a été effectuée par immunomarquage. Des analyses ELISA ont été effectuées pour identifier la protéine Shh dans les LBA. Le niveau d'expression transcriptomique des éléments de la voie HH dans le tissu pulmonaire des patients BPCO et non-BPCO a été étudié par RT-qPCR. Une validation des données a été effectuée en utilisant une cohorte externe et indépendante.

Les données indiquent que les brossages bronchiques des patients BPCO présentent une plus grande proportion de cellules basales en comparaison aux non-BPCO ($26 \pm 11\%$ vs $13 \pm 6\%$; $p < 0,0001$). Parmi les cellules basales des brossages bronchiques et biopsies, ceux des sujets atteints de BPCO présentent un marquage plus faible des noyaux pour Gli2 ($p < 0,05$). Les LBA des patients BPCO contiennent des concentrations de Shh plus faibles que ceux des patients non-BPCO ($12,5$ vs $40,9$ pg/mL ; $p = 0,002$). Enfin, l'étude de la cohorte de validation indique une diminution des transcrits SHH dans les poumons BPCO ($p = 0,0001$).

En conclusion, cette étude démontre la possibilité d'évaluer l'activation de la voie HH dans des échantillons respiratoires prélevés par fibroscopie et identifie une altération de la signalisation HH dans l'épithélium bronchique chez les patients BPCO.

**Sonic Hedgehog signalling as a potential endobronchial biomarker in
COPD**

Julien Ancel^{1,2}, Randa Belgacemi¹, Jeanne-Marie Perotin^{1,2}, Zania Diabasana¹,
Sandra Dury², Maxime Dewolf², Arnaud Bonnomet^{1,3}, Nathalie Lalun¹, Philippe
Birembaut^{1,4}, Myriam Polette^{1,4}, Gaëtan Deslée^{1,2} and Valérian Dormoy¹.

¹Université de Reims Champagne Ardenne, INSERM, P3Cell UMR-S1250, SFR CAP-SANTE, 51097 Reims, France

²CHU de Reims, Hôpital Maison Blanche, Service de pneumologie, 51092 Reims, France

³Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire PICT-URCA, 51092 Reims, France.

⁴CHU de Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire de biopathologie, 51092 Reims, France

Corresponding author:

Dr Valérian Dormoy

Inserm UMR-S 1250

University of Reims Champagne-Ardenne

CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims

Phone +33 (0)3 10 73 62 28; Fax +33 (0)3 26 06 58 61

e-mail: valerian.dormoy@univ-reims.fr

Abstract

Background: Hedgehog (HH) pathway has been associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in genome-wide association studies and recent studies suggest that HH signalling could be altered in COPD. Thus, we assessed by minimally invasive endobronchial procedures the activation of HH pathway including the main transcription factor Gli2 and the ligand Sonic HH (Shh).

Methods: 30 non-COPD patients and 28 COPD patients were included. Bronchial brushings, broncho-alveolar lavages fluids (BALF) and bronchial biopsies were obtained from fiberoptic bronchoscopy. Characterization of cell populations and sub-cellular localization were evaluated by immunostaining. ELISA and RNAseq analysis were performed to identify Shh proteins in BAL and transcripts on lung tissues from non-COPD and COPD patients with a validation using an external and independent cohort.

Results: Compared to non-COPD patients, COPD patients exhibited a larger proportion of basal cells in bronchial brushings ($26\pm 11\%$ vs $13\pm 6\%$; $p<0.0001$). Among airway basal cells, COPD subjects presented lower nuclei staining for Gli2 in bronchial brushings and biopsies ($p<0.05$). Bronchial BALF from COPD patients contained lower S hh concentrations than non-COPD samples (12.5 vs 40.9 pg/mL; $p=0.002$); SHH transcripts were also reduced in COPD lungs in the validation cohort ($p=0.0001$).

Conclusion: This study demonstrates the feasibility to assess HH pathway activation in respiratory samples collected by bronchoscopy and identifies impaired bronchial epithelial HH signalling in COPD.

Keywords: Chronic Obstructive Respiratory Disease; Hedgehog signalling pathway; Airway epithelial cells; Bronchoscopy.

Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the third cause of death worldwide and represents a major public health issue [1]. Tobacco smoke is known as the main risk factor leading to epithelial and sub-epithelial bronchial remodelling [2], including airway basal cell progenitor alterations [3]. These morphological changes result in chronic non-reversible airflow limitation. The pathophysiology of bronchial epithelial remodelling in COPD is complex, heterogeneous and poorly understood, and its impact on clinical phenotypes remains to be elucidated. Due to the incomplete understanding of the mechanisms leading to epithelial remodelling, there is no available treatment targeting epithelial remodelling in COPD.

Identification of novel pathways involved in COPD pathophysiology are challenging but represent unmet needs to personalize patient's management [4]. A genome-wide association study identified major susceptibility loci in COPD [5]. Among them, an enrichment of genes related to signalling events mediated by the HH family was observed [6]. Sonic HH signalling is essential for embryonic lung development, regulating epithelial/mesenchymal cell interactions in airways and parenchyma [7,8]. HH signalling occurs upon Shh ligand binding and lead to Gli2 nuclei translocation, mainly described as an activator of transcription [9]. HH pathway signalling alterations were observed in respiratory diseases such as pulmonary fibrosis [10,11], asthma [12,13] and lung cancer [14]. We recently demonstrated that HH pathway was inextricably linked to AEC differentiation in adulthood [15]. Interestingly, interfering in vitro with HH induced a COPD-like epithelial remodelling suggesting that Shh signalling may be deficient in COPD. However, the assessment of the HH pathway in clinical practice is challenging.

Using minimally invasive endobronchial procedures, we assessed the HH pathway in COPD and non-COPD patients and demonstrates a significant impairment of the HH pathway in COPD.

Methods

Study population

COPD and non-COPD control subjects (Figure 1A.) were prospectively recruited from the Department of pulmonary medicine, University Hospital of Reims (France). Non-COPD patients (n=30) were recruited to investigate infectious or inflammatory components in the department of pulmonary medicine in the absence of diagnosis of respiratory disease. COPD patients (n=28) were enrolled on the basis of clinical and functional assessments with a forced expiratory volume in 1-second (FEV₁)/forced vital capacity (FVC) <0.7 after bronchodilation. At inclusion, all patients were stable with no acute exacerbation of COPD for 4 weeks. Patients with asthma, cystic fibrosis, tuberculosis, cancer, or other chronic respiratory disease were excluded. Characteristics of the patients including demographic, medical history, treatments, respiratory symptoms and PFT were collected using a pre-specified case report form. Ex-smokers were considered for a withdrawal longer than 6 months. The severity of COPD was determined according to spirometric classification (GOLD 1: FEV₁ ≥ 80% predicted, GOLD 2: 50% ≤ FEV₁ < 80% predicted, GOLD 3: 30% ≤ FEV₁ < 50% predicted, GOLD 4: FEV₁ < 30% predicted) [16]. Frequent exacerbations were defined as at least 2 exacerbations in the past 12 months [16,17]. All subjects gave written informed consent to the study (Research and Innovation in Chronic Inflammatory Respiratory Diseases-RINNOPARI, NCT02924818).

All subjects underwent fiberoptic bronchoscopy with bronchial brushings, biopsies and/or broncho-alveolar lavage (BAL) in routine clinical conditions according to international guidelines [18].

Samples processing

Fresh airway epithelial cells (AEC) obtained from bronchial brushings (right lower lobe) were suspended within 30 minutes in RPMI (1% penicillin/streptomycin+ 10% BSA) before centrifugation (12,500 rpm x2 times). Cell pellet was dissociated in 1mL of Trypsine Versène® and centrifuged (12,500 rpm x2 times). Cells were counted using a haemocytometer. Microscopy slides were coated with 100 µL of PBS-BSA 3% via centrifugation (10,000 RPM for 10 min) and then 25,000 AEC were centrifuged (750 RPM for 8min). Cells were immediately fixed with ice-cold methanol and stored at 4°C until immunofluorescence analysis.

Bronchial biopsies (3rd to 5th order) were fixed in formalin 4% for 24h. Three µm sections were cut from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) blocks and processed for

H&E staining and observed on microscope (x20) to confirm the presence of epithelium. Suitable FFPE bronchial sections slides were deparaffinised before immunofluorescence staining.

BALF were sampled by fractionating aliquots of bronchial (first 50mL) and alveolar samples (100mL) centrifuged 2 times at 1,300 RPM for 5 min [19]. Supernatants were collected and stored at -80°C until ELISA analysis.

Immunofluorescence staining

Samples were rehydrated with PBS and blocked with 10% BSA in PBS for 30 min at room temperature before incubation with the following primary antibodies overnight at 4°C in 3% BSA in PBS: rabbit anti-Arl13b (17711-1-ap, ProteinTech, 1:200); mouse anti-Muc5ac (NBP2-15196, Novus Biologicals, 1:100); mouse anti-Acetylated- α -tubulin (T6793, Sigma Aldrich, 1:1000); goat anti-p63 (AF1916, R&D systems, 1:100); rabbit anti-Gli2 (HPA074275, Sigma Aldrich, 0,4 μ g/mL); goat anti-Shh (AF464, R&D systems, 1:100). Samples were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies in 3% BSA in PBS for 1 h at room temperature. DNA was stained with DAPI (1:1000) during incubation with the secondary antibodies. Negative controls were performed by omitting the primary antibody or incubating with a corresponding IgG isotype.

Virtual Slides Images (VSI) were acquired by AxioImageur Zeiss (20x Ph) with ZEN blue 2.0 (NA 0.75) and consulted with OLIVIA™ Reader. Three regions of interest (1000*1000 pixels by ROI) were randomly extracted by BIOP VSI reader export plug-in (https://biop.epfl.ch/TOOL_VSI_Reader.html) and processed with ImageJ (National Institutes of Health) for analysis. 450 cells were counted per slide.

Shh Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

Concentrations of Shh protein in BALF were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to RayBiotech instructions (ELH-ShhN-001). The detection threshold for the assay was 8pg/mL.

Validation cohort

To validate our observations, we analysed human whole lung gene expression from an independent cohort (GSE47460) dataset including 145 COPD subjects and 91 control subjects [20,21].

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SEM). All continuous variables are represented with dot-plot and median. Associations between features were studied using Chi-square or Fisher exact test as appropriate. Non-parametric Mann-Whitney test was used to analyse differences between experimental conditions and linear regression was performed with Spearman process. Multiples groups were analysed using Kruskal-Wallis procedure followed by Conover and Iman test. To evaluate differences in expression levels between candidate genes, we used the Mann-Whitney U test for independent samples of the normalized log₂-transformed microarray expression values. In all exploratory analyses, results with two-sided p-value ≤ 0.05 were considered significant. The XLSTAT software (Addinsoft Company, Paris, France) was used to analyse and format data.

Results

Patients' Characteristics

We included 30 non-COPD patients and 28 COPD patients to investigate HH pathway alterations in bronchial brushings, biopsies and BALF (Figure 1A). Groups did not differ in terms of age or sex (Table 1). As expected, COPD patients were more frequently current smokers and characterized by higher smoking exposure, dyspnoea and airflow limitation.

Percentages of ciliated and basal AEC populations are altered in COPD patients

Epithelial cell populations collected by bronchial brushes were characterized by immunostaining for ciliated- (Arl13b+), goblet- (Muc5ac+) and basal- (p63+) cells markers (Supplemental Table 1 and Figure 1B). Compared to non-COPD subjects, COPD subjects had reduced percentages of ciliated cells ($37\pm 5\%$ vs $48\pm 10\%$; $p=0.045$) and increased percentages of basal cells ($26\pm 11\%$ vs $13\pm 6\%$; $p<0.0001$). The percentage of goblet cells was not modified in COPD group ($15\pm 3\%$ vs $17\pm 5\%$; $p=0.154$) (Figure 1C).

Gli2 is reduced in nuclear basal cells progenitors from COPD patients

Considering both total AEC and basal cells only from bronchial brushes, the number of Gli2-positive nuclei was reduced in COPD compared to non-COPD group: 39% vs 49% of total AEC; $p=0.017$ (Figure 2A and B); 44% vs 91% of basal cells; $p<0.0001$ (Figure 3A and 3B). We identified two different patterns of cellular Gli2 location in COPD subjects: either a total loss of the transcription factor or a cytoplasmic-restricted location (Supplemental Figure 1).

Lower Gli2 nucleus staining in basal cells was associated with lower FEV1 ($\rho=0.645$, $p=0.0001$, Figure 3C) and FEV1/FVC ratio ($\rho=0.737$, $p<0.0001$, Supplemental Figure 2A). No association was found between Gli2 nuclear staining and inhaled treatments, smoking history or clinical features (Supplemental Figure 2B).

Gli2 is deficient in bronchial epithelium from COPD patients

To complete our approach and confront HH components in a proximal and organized tissue, we next analysed Gli2 immunostainings in bronchial biopsies (Supplemental Table 2). There was a 2-fold decrease of Gli2 staining of AEC in bronchial epithelium in COPD group compared to non-COPD group ($p=0.008$, Figure 4A and B). As observed in AEC obtained from bronchial brushes, Gli2 staining in bronchial epithelium was associated with FEV1 ($\rho=0.413$, $p=0.022$; Figure 4C) and FEV1/FVC ratio ($\rho=0.411$, $p=0.022$; Supplemental Figure 3).

Shh ligand is deficient in COPD bronchial washings

To identify a potential mechanism involved in Shh pathway dysregulation observed in COPD, we characterized Shh localization in bronchial brushings (Figure 5A). Shh seemed predominantly present at the apical side of ciliated cells. Then we separated bronchial and alveolar BALF (Figure 5B) from 15 COPD and 15 non-COPD subjects (Supplemental Table 3) and quantified the SHH pathway activating ligand Shh by ELISA. We observed a dramatic reduction of Shh protein concentration in bronchial samples from COPD patients compared to non-COPD subjects (12.5 vs 40.9 pg/mL; $p=0.002$; Figure 5B). Shh protein was not detectable in 67% ($n=10$) of COPD samples patients and 20% ($n=3$) of non-COPD samples.

Analysis of alveolar samples of BALF did not reveal any differences in Shh protein concentrations between COPD and non-COPD groups (17.6 vs 28.5 pg/mL respectively, $p=0.228$; Supplemental Figure 4A). In addition, there was no significant difference in terms of Shh concentrations among COPD patients according to inhaled corticosteroid treatment (Supplemental Figure 4B).

Shh ligand is deficient in COPD lung tissues

To validate our results in an independent cohort, we next analysed transcriptomic dataset obtained by RNA sequencing of lung tissue in COPD and non-COPD subjects (GSE47460). We confirmed a significant reduction in SHH gene expression in COPD group when compared to non-COPD group (3.666 vs 3.883, \log_2 relative expression, $p=0.0001$; Figure 6). SHH gene expression was not associated with smoking history, inhaled treatment or clinical features.

Discussion

In this prospective translational study, we demonstrated a marked dysregulation of HH pathway in COPD based on minimally invasive endobronchial procedures allowing the collection and analysis of several complementary biological samples. This approach allowed us to gain access to patients devoid of cancers, avoiding a major confounding bias in HH evaluation and to categorize patients in mild to very-severe COPD with a representative range of severity.

Using this approach, we confirmed alterations of AEC proportions in COPD including increase in basal cells and dramatic reduction of the number of ciliated cells as previously described [3] suggesting impaired differentiation process in airway basal cell progenitor [22]. Our recently published results suggested a role of HH pathway in the dysregulation of basal cell differentiation that could result in epithelial remodelling, a key feature of COPD [15].

To explore further this hypothesis, we then focused on the two critical molecular actors responsible for HH pathway biological effects: the activator ligand Shh and its main transcription factor Gli2 while previous studies exclusively focused on the analysis of the receptor of the ligand Ptch1 [23]. We first identified a marked decrease in Gli2 nuclear location of basal cells and Gli2 protein levels in bronchial epithelium, highlighting a defect in HH signalling in COPD. We next analysed the SHH pathway-activating ligand Shh in bronchial samples from BAL and identified decreased concentrations of this ligand in COPD subjects, suggesting an upstream dysregulation of SHH pathway in COPD.

This result was confirmed using the lung transcriptome dataset from of an independent COPD cohort. Although significant, the small differences in gene expression levels observed may be due to sample collection technique, related to the extraction of mRNA from both epithelium and sub-epithelial compartments with enriched HH actors such as fibroblasts [24].

Our results are consistent with our previous observations showing that preventing the ligand-induced HH activation led to the establishment of a remodelled epithelium with increased number of basal cells and reduced ciliogenesis [15], therefore mimicking remodelling features of COPD observed in endobronchial samples in our study.

HH signalling has been associated with several respiratory diseases, including exacerbation of pulmonary fibrosis [10,25], asthma [13,26] or pulmonary arterial hypertension [27]. SHH signalling activation has also been associated with cigarette smoke [28,29]. In our

study, SHH pathway markers were not associated with smoking history or inhaled corticosteroids treatments. A previous study reported a SHH modification mediated by corticosteroids in a high content screening [30]. Budesonide inhibited HH signalling while other compounds failed to trigger pathway activation increasing cells sensibility to Hh ligand and impairing pathway inhibition by co-administered pharmacological antagonists of Smo signalling. Inhaled corticoids heterogeneity and variable glucocorticoid concentrations in airways [31] SUcould explain the absence of corticoids-associated impact on HH activity in our study.

We confirmed that HH pathway is clearly deficient in bronchial epithelium from COPD patients. Importantly, HH dysregulations were detected on a wide range of respiratory specimens: isolated AEC from bronchial brushes, bronchial biopsies, BAL and lung tissues. We also demonstrated for the first time, that HH pathway inactivation is associated with the absence of its canonical activator ligand Shh. Investigating the molecular mechanisms involved in Shh-associated epithelial remodelling may pave the way towards the characterization of novel markers to improve COPD patient's management.

Conclusions

Our study based on endobronchial samplings confirmed a dysregulation of Sonic HH signalling in COPD through Gli2 transcription factor. More importantly, we demonstrated that HH impairment was related to Shh ligand deficiency in bronchial samples. These results highlight the major implication of HH in COPD. However, the relevance of these findings in terms of phenotyping and potential innovative therapeutic target need to be further evaluated.

Abbreviations

COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

HH: Hedgehog

SHH: Sonic Hedgehog

RINNOPARI: Research and Innovation in Chronic Inflammatory Respiratory Diseases.

ROI: Region Of Interest

PFT: Pulmonary Function Tests

FEV1: Forced Expiratory Volume in 1-second

FVC: Forced Vital Capacity

GOLD: Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease

BSA: Bovine Serum Albumin

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin Embedded

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CAT: COPD Assessment Test

mMRC: modified Medical Research Council

LABA: Long-acting β 2-agonist

LAMA: Long-acting muscarinic-antagonist

ICS: Inhaled corticosteroid

Gli2: Glioma associated oncogene 2

Ptch1: Patched 1

Figure legends

Figure 1. Airway progenitor basal cell population is enriched in COPD. A. Study flow chart B. Representative micrograph showing a Region of Interest (ROI) containing AEC from bronchial brushing stained for cilia (Arl13b, green); Mucins (Muc5ac, red); basal cell (p63, white) and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification corresponding to the selected area is shown. C. Dot plots with median showing the percentage of ciliated, goblet and basal cells both in non-COPD (n=15) (black circle) and COPD patients (n=15) (red circle). *, p<0.05 and ***, p<0.0001; non-COPD vs COPD.

Figure 2. Gli2 is reduced in COPD AEC from COPD patients. A. Representative micrograph showing a ROI of a bronchial brushing stained for Gli2 (Gli2, red) and cell nuclei (DAPI, blue) both in non-COPD (upper panel) and COPD patients (lower panel). Magnification corresponding to the selected area is shown. B. Dot plots with median showing the percentage of Gli2 positive total cells in non-COPD (n=15) and COPD patients (n=15). *, p<0.05

Figure 3. Gli2 is absent in airway progenitor basal cell nuclei from COPD patients. A. Representative micrograph showing a ROI of a bronchial brushing stained for cilia (Acetylated tubulin, green); Gli2 (Gli2, red); basal cell (p63, white) and cell nuclei (DAPI, blue) both in non-COPD (upper panel) and COPD patients (lower panel). Magnification corresponding to the selected area is shown. Cartoons depict the localization of Gli2 transcription factor. B. Dot plots with median showing the percentage of nuclei-localized Gli2 positive basal cells in non-COPD (n=15) and COPD patients (n=15). ***, p<0.0001. C. Linear regression of the percentages of nuclear Gli2 positive basal cells according to the FEV1 (% of predicted value) for non-COPD (n=15) and COPD patients (n=15). Non-COPD patients are represented with black circles and COPD patients with red circles.

Figure 4. Gli2 transcription factor is reduced in whole bronchial epithelium from COPD patients. A. Representative micrograph showing a ROI of a bronchial biopsy stained for cilia (Acetylated tubulin, green); Gli2 (Gli2, red); basal cell (p63, white) and cell nuclei (DAPI, blue) both in non-COPD (upper panel) and COPD patients (lower panel). Magnification corresponding to the selected area is shown. Cartoons depict the localization of Gli2 transcription factor. B. Dot plots with median showing the intensity of Gli2 mean grey value (Arbitrary units, AU) in whole bronchial epithelium of non-COPD (n=12) and COPD patients (n=19). **, p<0.001 C. Linear regression of the intensity of Gli2 mean grey value according to

the FEV1 (% of predicted value) for non-COPD (n=12) and COPD patients (n=19). Non-COPD patients are represented with black circles and COPD patients with red circles.

Figure 5. Shh activator ligand is deficient in COPD bronchi. A. Representative micrograph showing a ROI containing AEC from bronchial brushing stained for cilia (Arl13b, green); Shh (red) and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification corresponding to the selected area is shown. B. Dot plot with median representing the Shh concentrations measured by ELISA in bronchial BALF from non-COPD (n=15) and COPD patients (n=15). **, p<0.001.

Figure 6. Shh transcript levels are reduced in COPD lung tissues.

Dot plots with median showing normalized expression of Log2-transformed SHH expression in Lung tissue from non-COPD (n=91) and COPD patients (n=145). ***, p<0.0001. Transcripts expression microarrays were extracted from the GSE47460 dataset available at (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>). Non-COPD patients are represented with black circles and COPD patients with red circles.

Supplemental Figure 1. Gli2 localization pattern is heterogeneous in COPD disease in airway progenitor basal cell nuclei from COPD patients. Representative micrograph showing a Region of Interest of a bronchial brushing stained for cilia (Acetylated tubulin, green); Gli2 (Gli2, red); basal cell (p63, white) and cell nuclei (DAPI, blue) both in COPD. Magnification corresponding to the selected area is shown. Cartoons depict the localization of Gli2 transcription factor.

Supplemental Figure 2. Nuclei-localized Gli2 is associated with FEV1/FVC but not with ICS. A. Linear regression of the percentages of nuclear Gli2 positive basal cells according to the FEV1/FVC (% of predicted value) for non-COPD (n=15) and COPD patients (n=15). B. Dot plots with median showing no association of the percentage of nuclei-localized Gli2 positive basal cells in COPD patients according to inhaled corticosteroid treatment (ICS). Non-COPD patients are represented with black circles and COPD patients with red circles.

Supplemental Figure 3. Gli2 transcription factor in whole bronchial epithelium is associated to FEV1/FVC ratio. A. Linear regression of the intensity of Gli2 mean grey value (Arbitrary units, AU) in whole bronchial according to the FEV1/FVC ratio (% of predicted value) for non-COPD (n=12) and COPD patients (n=19). Non-COPD patients are represented with black circles and COPD patients with red circles.

Supplemental Figure 4. Shh activator ligand concentrations in alveolar BALF is not altered. A. Dot plot with median representing the Shh concentrations measured by ELISA in alveolar

BALF from non-COPD (n=15) and COPD patients (n=15). B. Dot plots with median showing Shh concentrations in COPD patients according to inhaled corticosteroid treatment (ICS).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Non-COPD and COPD patients were recruited from the Department of pulmonary medicine at university hospital of Reims (France) and included in the cohort for Research and Innovation in Chronic Inflammatory Respiratory Diseases (RINNOPARI, NCT02924818). The study was approved by the ethics committee for the protection of human beings involved in biomedical research (CCP Dijon EST I, N°2016-A00242-49) and was conducted in accordance with the ethical guideline of Declaration of Helsinki.

Consent for publication

All subjects gave their written informed consent prior to inclusion in the study.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

Dr. Deslée reports personal fees from Nuvaira, personal fees from BTG/PneumRx, personal fees from Chiesi, personal fees from Boehringer, personal fees from Astra Zeneca, outside the submitted work. Dr. Dormoy reports personal fees from Chiesi outside the submitted work.

Funding

This work was supported by Funding from University of Reims Champagne-Ardenne (URCA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm). It was carried out in the framework of the Federative Research Structure CAP-Santé.

Authors' contributions

Concept and design: JA, GD, VD; Sample collection: JA, JMP, SD, PB, MD; Performed the experiments and data analysis: JA, RB, JMP, ZD, AB, NL, GD, VD; Preparation of manuscript and figures: JA, RB, JMP, MP, GD, VD. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the members of the Inserm UMR-S 1250 unit and our collaborators for their helpful comments and insights. We thank the Platform of Cell and Tissue Imaging (PICT) for technical assistance.

References

1. Diaz-Guzman E, Mannino DM. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2014;35:7–16.
2. Jones RL, Noble PB, Elliot JG, James AL. Airway remodelling in COPD: It's not asthma! *Respirol Carlton Vic*. 2016;21:1347–56.
3. Ghosh M, Miller YE, Nakachi I, Kwon JB, Barón AE, Brantley AE, et al. Exhaustion of Airway Basal Progenitor Cells in Early and Established Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197:885–96.
4. Siafakas N, Corlateanu A, Fouka E. Phenotyping Before Starting Treatment in COPD? *COPD*. 2017;14:367–74.
5. Wain LV, Shrine N, Artigas MS, Erzurumluoglu AM, Noyvert B, Bossini-Castillo L, et al. Genome-wide association analyses for lung function and chronic obstructive pulmonary disease identify new loci and potential druggable targets. *Nat Genet*. 2017;49:416–25.
6. Obeidat M, Hao K, Bossé Y, Nickle DC, Nie Y, Postma DS, et al. Molecular mechanisms underlying variations in lung function: a systems genetics analysis. *Lancet Respir Med*. 2015;3:782–95.
7. Kugler MC, Joyner AL, Loomis CA, Munger JS. Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;52:1–13.
8. Wang C, Cassandras M, Peng T. The Role of Hedgehog Signaling in Adult Lung Regeneration and Maintenance. *J Dev Biol*. 2019;7.
9. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL de S e. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal CCS [Internet]*. 2018;16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5861627/>
10. Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wémeau-Stervinou L, Fabre A, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- β -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2012;181:2126–37.
11. Bolaños AL, Milla CM, Lira JC, Ramírez R, Checa M, Barrera L, et al. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303:L978-990.
12. Xu C, Zou C, Hussain M, Shi W, Shao Y, Jiang Z, et al. High expression of Sonic hedgehog in allergic airway epithelia contributes to goblet cell metaplasia. *Mucosal Immunol*. 2018;11:1306–15.
13. Li X, Howard TD, Moore WC, Ampleford EJ, Li H, Busse WW, et al. Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1457–65.

14. Giroux Leprieur E, Jablons DM, He B. Old Sonic Hedgehog, new tricks: a new paradigm in thoracic malignancies. *Oncotarget*. 2018;9:14680–91.
15. Belgacemi R, Luczka E, Ancel J, Diabasana Z, Perotin J-M, Germain A, et al. Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. *EBioMedicine*. 2020;51:102572.
16. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:557–82.
17. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010;363:1128–38.
18. Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, et al. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE. *Thorax*. 2013;68 Suppl 1:i1–44.
19. Van Vyve T, Chanez P, Lacoste JY, Bousquet J, Michel FB, Godard P. Comparison between bronchial and alveolar samples of bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Chest*. 1992;102:356–61.
20. Cruz T, López-Giraldo A, Noell G, Casas-Recasens S, Garcia T, Molins L, et al. Multi-level immune response network in mild-moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Respir Res*. 2019;20:152.
21. Scott M, Vallania F, Khatri P. META-ANALYSIS OF CONTINUOUS PHENOTYPES IDENTIFIES A GENE SIGNATURE THAT CORRELATES WITH COPD DISEASE STATUS. *Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput*. 2017;22:266–75.
22. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech*. 2010;3:545–56.
23. Tam A, Hughes M, McNagny KM, Obeidat M, Hackett TL, Leung JM, et al. Hedgehog signaling in the airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*. 2019;9:3353.
24. Zhu ZX, Sun CC, Ting Zhu Y, Wang Y, Wang T, Chi LS, et al. Hedgehog signaling contributes to basic fibroblast growth factor-regulated fibroblast migration. *Exp Cell Res*. 2017;355:83–94.
25. Moshai EF, Wémeau-Stervinou L, Cigna N, Brayer S, Sommé JM, Crestani B, et al. Targeting the hedgehog-glioma-associated oncogene homolog pathway inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51:11–25.
26. Wang X-Z, Zhang H-H, Qian Y-L, Tang L-F. Sonic hedgehog (Shh) and CC chemokine ligand 2 signaling pathways in asthma. *J Chin Med Assoc JCMA*. 2019;82:343–50.

27. Ghouleh IA, Sahoo S, Meijles DN, Amaral JH, de Jesus DS, Sembrat J, et al. Endothelial Nox1 oxidase assembly in human pulmonary arterial hypertension; driver of Gremlin1-mediated proliferation. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2017;131:2019–35.
28. Guo Y, Shi G, Wan H, Zhou M. Hedgehog signaling regulates the expression levels of inflammatory mediators in cigarette-induced airway inflammation. *Mol Med Rep*. 2018;17:8557–63.
29. Qin Y-X, Yang Z-H, Du X-H, Zhao H, Liu Y-B, Guo Z, et al. Inhibition of the Hedgehog Signaling Pathway Depresses the Cigarette Smoke-Induced Malignant Transformation of 16HBE Cells on a Microfluidic Chip. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131:1191–8.
30. Wang Y, Davidow L, Arvanites AC, Blanchard J, Lam K, Xu K, et al. Glucocorticoid compounds modify smoothed localization and hedgehog pathway activity. *Chem Biol*. 2012;19:972–82.
31. Hübner M, Hochhaus G, Derendorf H. Comparative pharmacology, bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of inhaled glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2005;25:469–88.

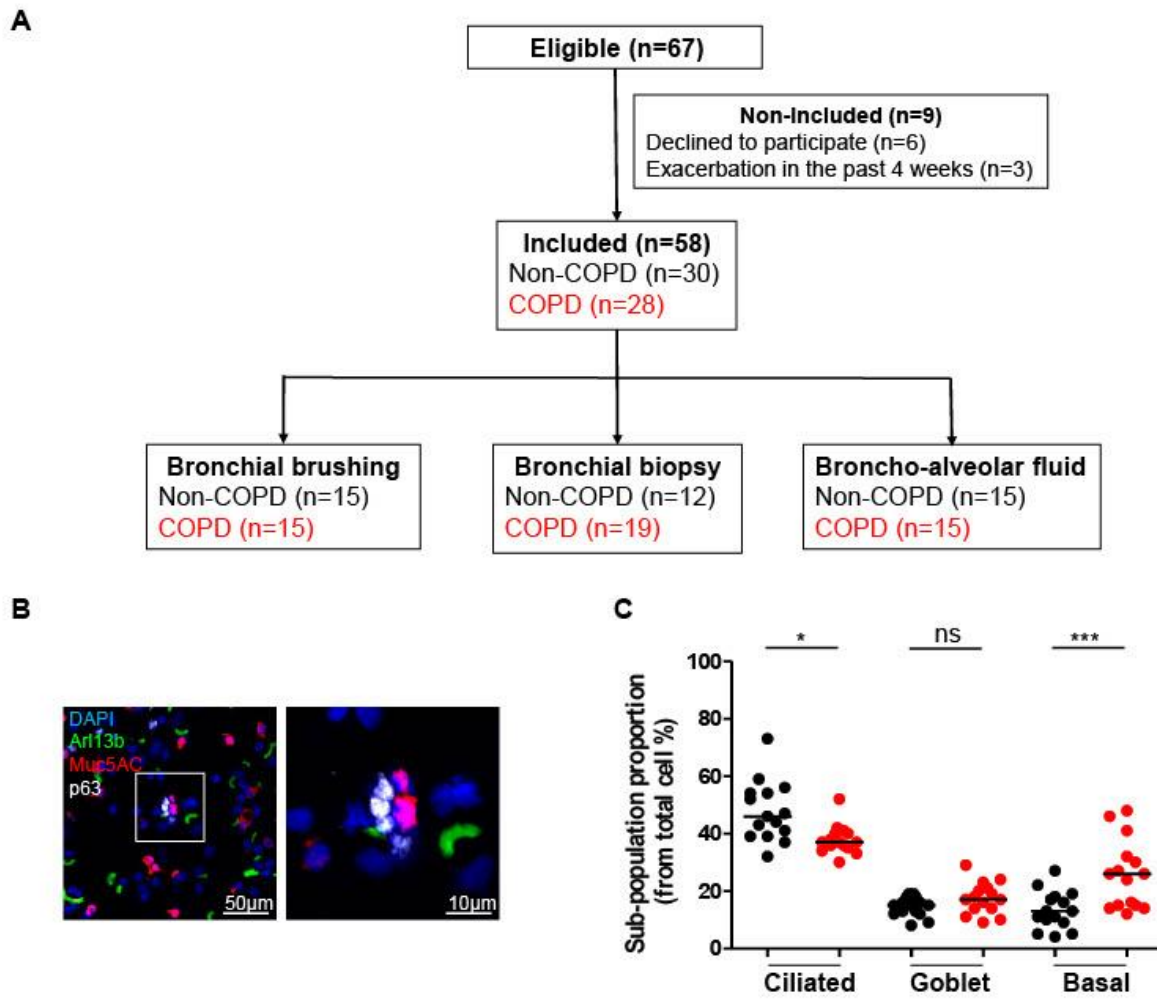


Figure 1

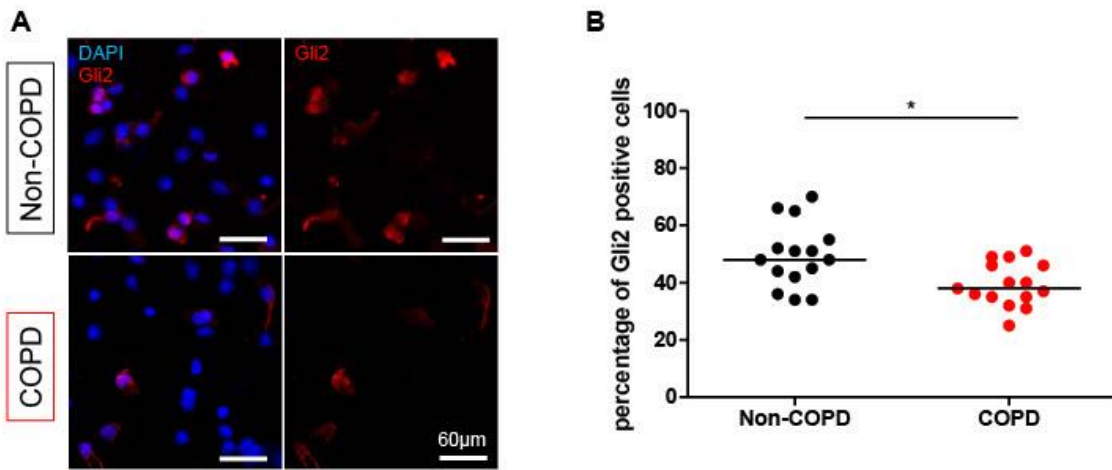


Figure 2

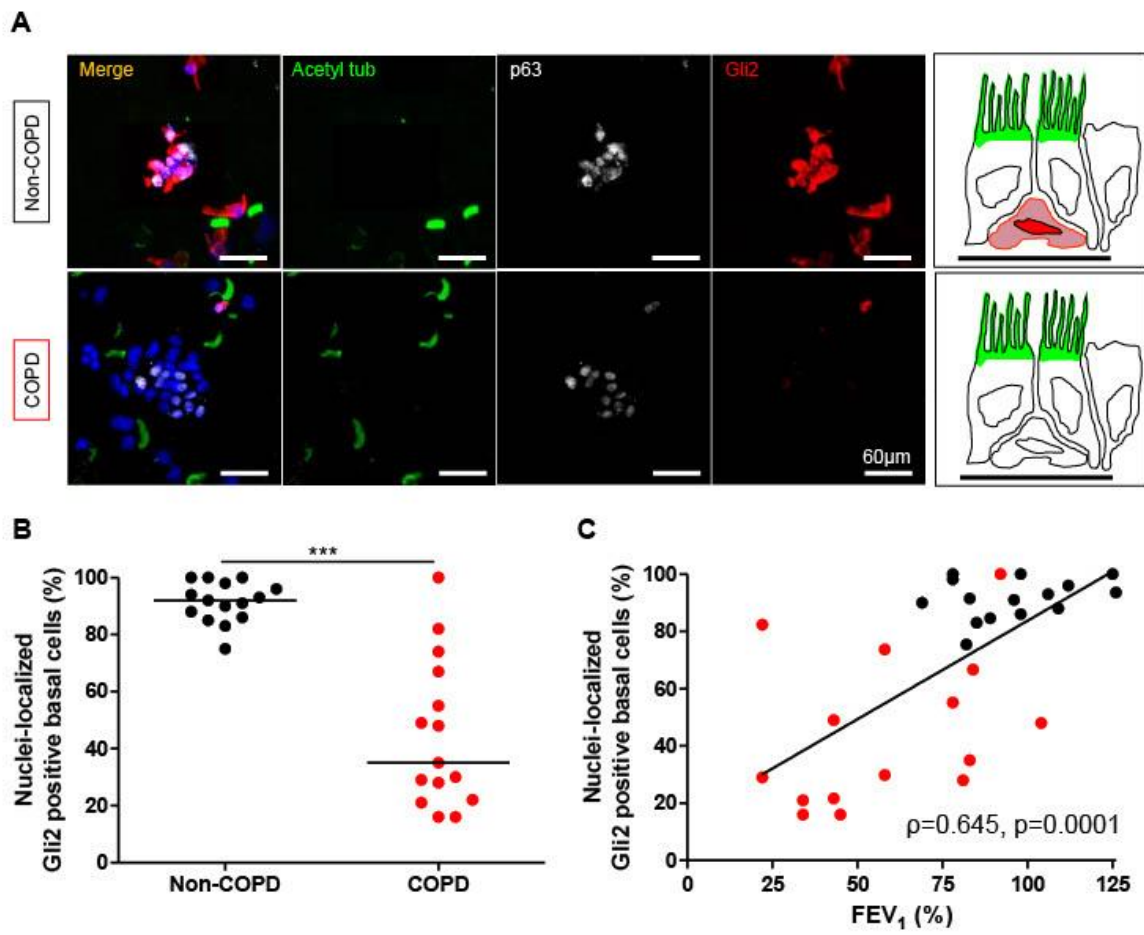


Figure 3

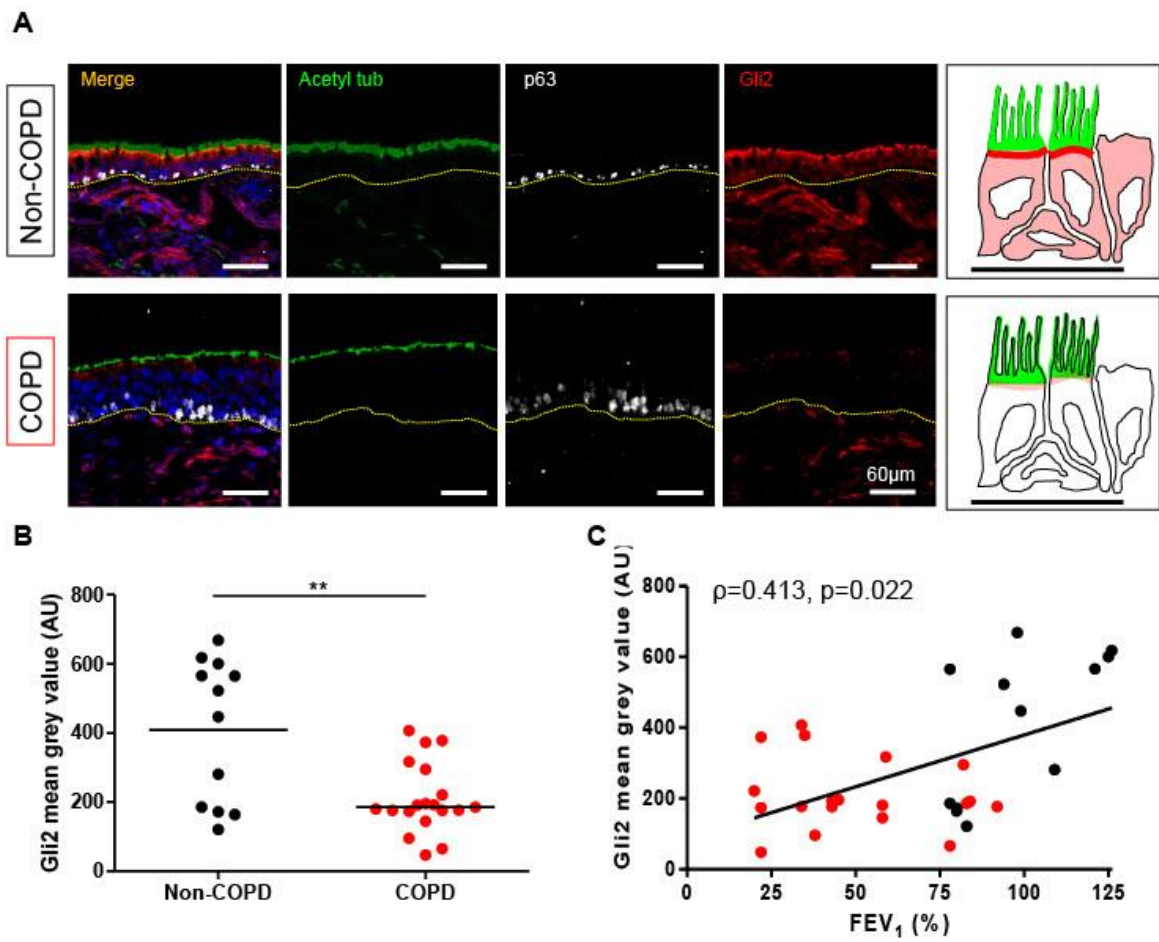


Figure 4

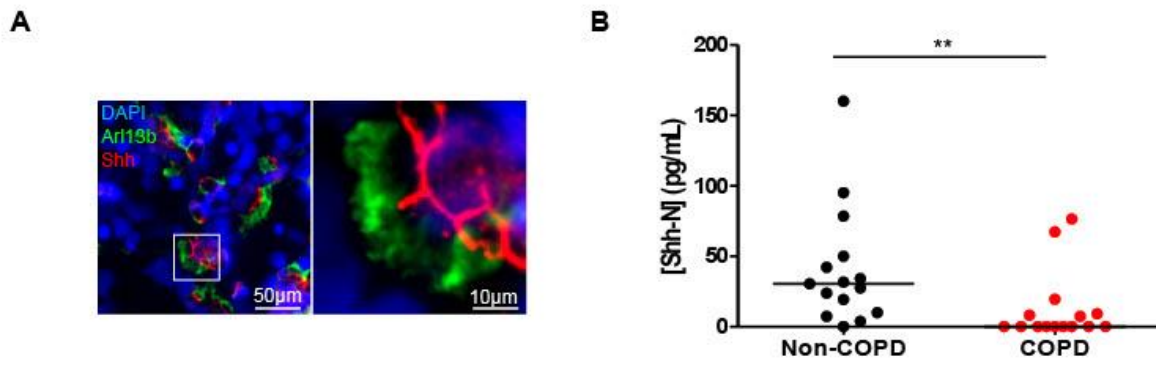


Figure 5

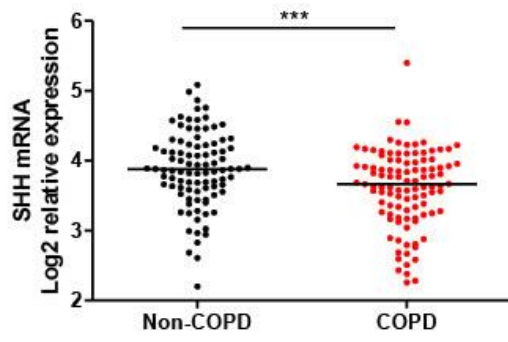
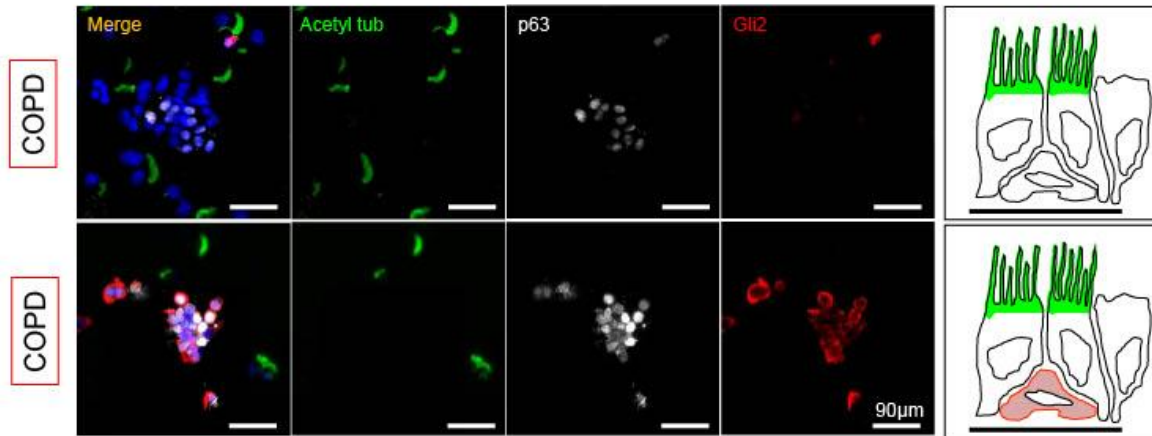
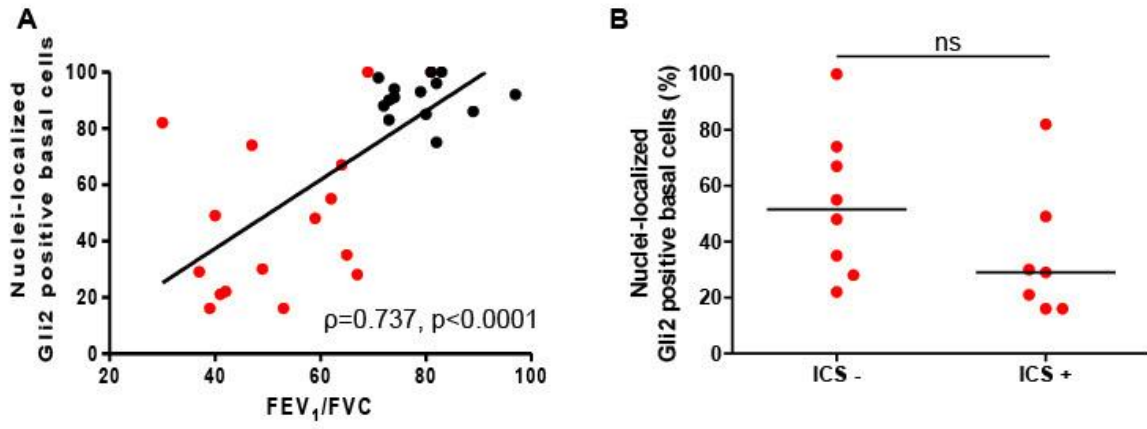


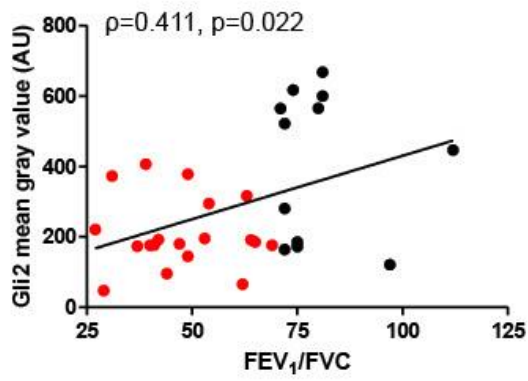
Figure 6



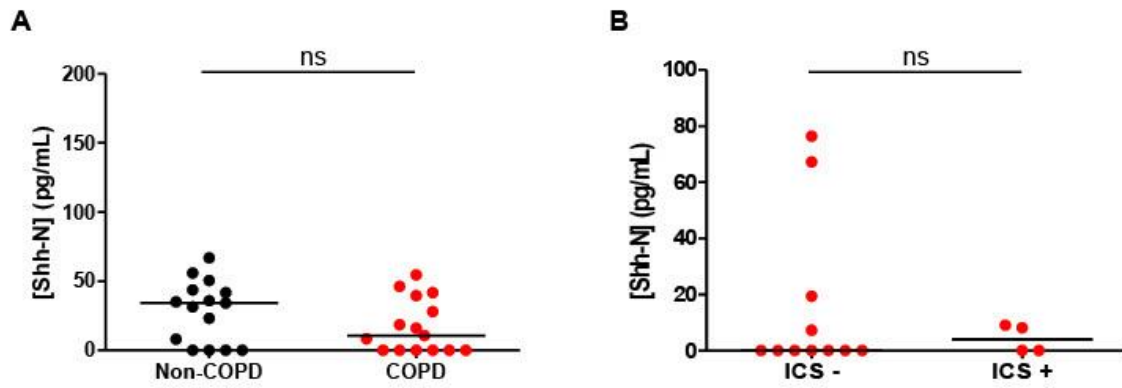
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4

	Non-COPD (n=30)	COPD (n=28)	p-value
Sex ratio H/F	13/17	17/11	ns
Age (years)	53.9±15.3	62.1±10.6	ns
Smoking history			0.009
Never smokers	8 (27%)	0	
Current-smokers	12 (40%)	12 (43%)	
Former-smokers	10 (33%)	16 (57%)	
Pack-years	21±21	41±22	<0.001
Spirometry			
FEV ₁ , % of predicted value	97±19	55±25	<0.0001
FVC, % of predicted value	100±18	82±20	0.003
FEV ₁ /FVC %	81±9	49±12	<0.0001
Spirometric GOLD 1/2/3/4	NA	7/6/9/6	-
GOLD ABCD (mMRC)	NA	8/6/6/8	-
GOLD ABCD (CAT)	NA	7/7/4/10	-
Inhaled treatments			
LABA	4 (13%)	19 (68%)	<0.0001
LAMA	1 (3%)	14 (50%)	<0.0001
ICS	4 (13%)	13 (46%)	0.009
Frequent exacerbation (>1/year)	-	10 (36%)	-
Respiratory symptoms			
Dyspnea (mMRC) 0/1/2/3/4	11/13/2/4/0	2/10/10/5/1	0.006
Cough	25 (83%)	24 (86%)	ns
Sputum	14 (47%)	20 (71%)	ns
Chronic bronchitis	8 (27%)	13 (46%)	ns

Table 1: Baseline characteristics of the population

Data are expressed as mean ± SD or number (%) FEV₁: Forced Expiratory Volume in one second; FVC: Forced Vital Capacity; mMRC: Modified Medical Research Council; CAT: COPD Assessment Test; LABA: Long-acting β₂-agonist; LAMA: Long-acting muscarinic-antagonist; ICS: Inhaled corticosteroid
ns: non-significate.

	Non-COPD (n=15)	COPD (n=15)	p-value
Sex ratio H/F	8/7	11/4	ns
Age (years)	52.4±15.8	61.7±14.0	ns
Smoking history			ns
Never smokers	3 (20%)	0	
Current-smokers	7 (47%)	5 (33%)	
Former-smokers	5 (33%)	10 (66%)	
Pack-years	25±25	37±26	ns
Spirometry			
FEV ₁ , % of predicted value	96±17	58±26	<0.0001
FVC, % of predicted value	99±19	83±22	ns
FEV ₁ /FVC %	79±7	51±12	<0.0001
Spirometric GOLD 1/2/3/4	NA	5/3/5/2	-
GOLD A/B/C/D	NA	5/3/5/2	-
GOLD CAT	NA	3/4/3/5	-
Inhaled treatments			
LABA	1 (7%)	9	0.005
LAMA	0	6	0.017
ICS	1 (7%)	7 (47%)	0.035
Frequent exacerbation (>1/year)	-	5 (33%)	-
Respiratory symptoms			
Dyspnea (mMRC) 0/1/2/3/4	6/7/0/2/0	2/6/5/1/1	ns
Cough	14 (93%)	12 (80%)	ns
Sputum	8 (53%)	9 (60%)	ns
Chronic bronchitis	5 (33%)	6 (40%)	ns

Supplemental table 1: Baseline characteristics of the population who underwent bronchial brushing

Data are expressed as mean ± SD or number (%) FEV₁: Forced Expiratory Volume in one second; FVC: Forced Vital Capacity; mMRC: Modified Medical Research Council; CAT: COPD Assessment Test; LABA: Long-acting β₂-agonist; LAMA: Long-acting muscarinic-antagonist; ICS: Inhaled corticosteroid
ns: non-significate.

	Non-COPD (n=12)	COPD (n=19)	p-value
Sex ratio H/F	4/8	11/8	ns
Age (years)	54.2±18.9	63.5±8.4	ns
Smoking history			ns
Never smokers	2 (17%)	0	
Current-smokers	5 (42%)	7 (37%)	
Former-smokers	5 (42%)	12 (63%)	
Pack-years	19±16	46±21	0.001
Spirometry			
FEV ₁ , % of predicted value	98±18	50±24	<0.0001
FVC, % of predicted value	106±19	78±20	0.002
FEV ₁ /FVC %	80±12	48±13	<0.0001
Spirometric GOLD 1/2/3/4	NA	4/4/7/4	-
GOLD A/B/C/D	NA	5/3/5/6	-
GOLD CAT	NA	3/4/3/9	-
Inhaled treatments			
LABA	3 (25%)	14 (74%)	0.012
LAMA	1 (8%)	11 (58%)	0.008
ICS	3 (25%)	9 (47%)	ns
Frequent exacerbation (>1/year)	-	7 (37%)	-
Respiratory symptoms			
Dyspnea (mMRC) 0/1/2/3/4	6/4/0/2/0	1/8/5/4/1	0.024
Cough	9 (75%)	16 (84%)	ns
Sputum	3 (25%)	13 (68%)	0.008
Chronic bronchitis	0	9 (47%)	0.008

Supplemental table 2: Baseline characteristics of the population who underwent bronchial biopsies

Data are expressed as mean ± SD or number (%) FEV₁: Forced Expiratory Volume in one second; FVC: Forced Vital Capacity; mMRC: Modified Medical Research Council; CAT: COPD Assessment Test; LABA: Long-acting β₂-agonist; LAMA: Long-acting muscarinic-antagonist; ICS: Inhaled corticosteroid
ns: non-significate.

	Non-COPD (n=15)	COPD (n=15)	p-value
Sex ratio H/F	7/8	11/4	ns
Age (years)	53.0±15.9	63.1±12.9	ns
Smoking history			ns
Never smokers	5 (33%)	0	
Current-smokers	4 (27%)	8 (53%)	
Former-smokers	6 (40%)	7 (47%)	
Pack-years	15±16	43±23	0.001
Spirometry			
FEV ₁ , % of predicted value	100±23	68±24	0.001
FVC, % of predicted value	103±22	91±21	ns
FEV ₁ /FVC %	82±7	55±10	<0.0001
Spirometric GOLD 1/2/3/4	NA	6/5/3/1	-
GOLD A/B/C/D	NA	6/4/3/2	-
GOLD CAT	NA	3/6/1/5	-
Inhaled treatments			
LABA	0	7(47%)	0.006
LAMA	0	6 (40%)	0.017
ICS	0	4 (27%)	ns
Frequent exacerbation (>1/year)	-	5 (33%)	-
Respiratory symptoms			
Dyspnea (mMRC) 0/1/2/3/4	4/6/2/3/0	1/6/5/2/1	ns
Cough	12 (80%)	13 (87%)	ns
Sputum	7 (47%)	11 (73%)	ns
Chronic bronchitis	5 (33%)	7 (47%)	ns

Supplemental table 3: Baseline characteristics of the population who underwent broncho-alveolar lavages.

Data are expressed as mean ± SD or number (%) FEV₁: Forced Expiratory Volume in one second; FVC: Forced Vital Capacity; mMRC: Modified Medical Research Council; CAT: COPD Assessment Test; LABA: Long-acting β₂-agonist; LAMA: Long-acting muscarinic-antagonist; ICS: Inhaled corticosteroid
ns: non-significate.

**DISCUSSION,
PERSPECTIVES ET
CONCLUSIONS**

1. Synthèse des travaux et discussion

La BPCO est une pathologie affectant la vie de millions de personnes, si les principaux facteurs de risques sont clairement identifiés, la caractérisation des phénotypes cliniques, la détection précoce et l'identification d'approches thérapeutiques nouvelles représentent des défis importants pour alléger la charge socio-économique. En effet, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du développement de la pathologie et de sa progression ne sont pas entièrement élucidés. La BPCO est caractérisée par deux principaux éléments : l'obstruction bronchique et l'emphysème, associés dans les deux cas à une altération de la plasticité épithéliale. La compréhension de la mise en place du mécanisme de remodelage permettra de proposer de nouveaux biomarqueurs de la BPCO mais aussi d'élaborer des thérapies innovantes.

Ainsi durant cette thèse nous nous sommes intéressés à la voie HH durant la différenciation épithéliale et son impact sur le remodelage caractéristique de la BPCO. Aucun lien n'avait jusque-là été fait entre la signalisation HH, le remodelage et la pathologie. Nous avons émis l'hypothèse que la voie HH oriente le destin des cellules épithéliales des voies aériennes lors de la différenciation et que son altération participe à la genèse ou à l'évolution de maladies respiratoires.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'épithélium des voies aériennes produit le ligand Shh, activateur de la voie HH. En utilisant le modèle *in vitro* de culture en IAL à partir de prélèvements humains nous avons collecté les surnageants cellulaires ainsi que les cellules sur l'ensemble de la cinétique de différenciation cellulaire. Par immunomarquage et ELISA nous avons constaté que la cellule basale (cellule progénitrice) est responsable de la sécrétion de Shh. L'étude des transcrits et des protéines a montré une augmentation des acteurs de la voie HH en concomitance avec la différenciation de l'épithélium. La voie HH est donc activée en fin de différenciation comme déjà évoquée dans la littérature (Mao et al., 2018) mais également dans les phases d'initiation, supposant ainsi son implication dans l'orientation du devenir cellulaire.

La voie HH étant présente durant la différenciation, nous avons décidé de l'inhiber afin d'élucider son influence sur ce processus. Pour ce faire, l'utilisation de l'anticorps AB5E1 a permis de cibler la voie canonique et non canonique dépendante du ligand de la signalisation HH. L'altération de la voie induit une diminution de la prolifération des cellules basales et une

augmentation du nombre de ces cellules suggérant un arrêt de la différenciation. De plus, la ciliogenèse est altérée. Le nombre de cellules ciliées est fortement diminué, et le rapport entre les mucines Muc5ac/Muc5b est altéré en faveur d'une élévation du Muc5b. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la voie HH favorise le maintien des cellules non différenciées et empêche la ciliogenèse altérant ainsi l'homéostasie épithéliale responsable de la plasticité.

Enfin, dans le but d'investiguer le rôle de la voie HH dans la BPCO, des immunomarquages des acteurs de la voie HH ont été réalisés sur des tissus de patients BPCO ou non. De manière surprenante, le FT Gli2, responsable de l'activation de la voie HH, est absent des noyaux voire de l'ensemble de la cellule chez les BPCO. Cette diminution de Gli2 est fortement corrélée à la fonction respiratoire des patients. De plus, Smo, le récepteur activateur est aussi absent de l'épithélium des sujets BPCO. La signalisation HH semble ainsi être altérée chez les patients présentant une BPCO légère ou modérée.

Les tissus analysés dans cette première étude étaient issus de résection pulmonaire pour cause de cancer. Connaissant le rôle que joue la voie HH dans la cancérogenèse (Giroux-Leprieur et al., 2018; Jiang et al., 2020) et dans le but d'écarter son influence sur notre étude nous avons analysé les transcrits de Gli2 et Smo sur des cellules bronchiques obtenues par brosse fibroscopique chez des patients ne présentant pas d'autres pathologies respiratoires qu'une BPCO. Les résultats confirment nos hypothèses, les transcrits de Gli2 et Smo étaient significativement réduits chez les patients atteints de BPCO en comparaison des patients sans BPCO.

Afin de poursuivre la caractérisation de l'altération de la voie HH dans la BPCO, nous avons poursuivi nos travaux sur les prélèvements biologiques provenant d'endoscopies bronchiques (liquides de lavages, biopsies et brossages) dans une perspective de recherche translationnelle et pour couvrir l'ensemble des stades de la pathologie jusqu'au degré de BPCO sévère sans lien avec le cancer.

L'étude des brossages bronchiques dévoile une altération de la distribution des cellules ciliées et des cellules basales chez le sujet BPCO confirmant nos premiers travaux et suggérant une altération du processus de différenciation au niveau des progéniteurs. De plus, le FT Gli2 est perdu ou réduit dans le cytoplasme et les noyaux des cellules des patients BPCO évoquant ainsi une altération de la voie HH corroborant nos résultats précédents.

L'immunomarquage des biopsies, représentant une population cellulaire plus proximale que celle des brossages bronchiques, dévoile également une diminution du marquage Gli2 avec une forte association avec la fonction respiratoire. La voie HH semble être altérée au niveau des voies aériennes larges des patients BPCO.

En vue de caractériser les mécanismes de cette inhibition nous avons investigué le ligand activateur de la voie, Shh. Dans un premier temps, des immunomarquages ont été réalisés sur les cellules issues des brossages bronchiques. Le ligand est principalement retrouvé au pôle apical des cellules comme indiqué dans la littérature (Mao et al., 2018). Les LBA ont été étudiés afin de caractériser la présence de Shh dans les voies aériennes chez les patients. Les LBA de la fraction bronchique et de la fraction alvéolaire ont été séparés et la quantification par ELISA dévoile une diminution significative des concentrations de Shh chez les patients BPCO comparés aux patients non-BPCO dans les fractions bronchiques. Aucune différence n'a été observée au niveau du compartiment alvéolaire.

Le nombre de patients étant encore faible, l'utilisation d'une cohorte indépendante nous a semblé nécessaire afin de confirmer nos résultats. Les transcrits obtenus par séquençage ARN de tissus pulmonaires montrent une diminution significative du gène SHH chez les sujets BPCO proposant une altération de la voie HH dépendante du ligand.

Nos études ont pour la première fois démontré, d'une part, l'implication de la voie HH dans la dérégulation de la différenciation des cellules basales pouvant entraîner un remodelage caractéristique de la BPCO. D'autre part, l'analyse des prélèvements endobronchiques confirme cette dérégulation de la voie HH dans la BPCO. Cette déficience semble être liée au ligand Shh inhibant l'activation de Gli2. L'évaluation de la voie HH dans la pratique clinique pourrait potentiellement orienter le diagnostic et aider à la mise en place de nouvelles thérapies.

2. Perspectives expérimentales

Nos résultats n'étant qu'une infime partie de la mécanistique liant la voie HH et le remodelage caractéristique de la BPCO, de nombreuses perspectives s'offrent à nous pour élucider cette relation.

La déficience en Shh semble être à l'origine de l'altération de la voie HH dans notre modèle et chez les patients BPCO. La compréhension des mécanismes moléculaires menant à la sécrétion du ligand sont bien documentés (Burke et al., 1999; Stewart et al., 2018; Tukachinsky et al., 2012), cependant il sera nécessaire d'identifier les cellules qui le secrète, qui sont réceptrices ou non dans le contexte pulmonaire. Pour ce faire, des approches de transfection *in vitro* (plasmide GFP-Shh par exemple) permettant l'expression et le suivi d'acteurs clés de la voie HH permettront d'affiner la compréhension des modalités d'activation et d'inhibition de la voie HH au cours de la différenciation de l'épithélium des voies aériennes et lors du remodelage.

Etant donné que nous nous sommes focalisés sur les principaux acteurs de la voie HH, il sera intéressant par la suite de recenser l'ensemble des acteurs moléculaires associés à la transduction du signal de la voie HH incluant Hhip, Patched2, Sufu, Kif7, Cdo, Boc, GPR161, Gas1/8 et les GPC 3/4/6. Leur caractérisation et implication dans la signalisation HH chez l'Homme n'ont pas encore été élucidées. Nous proposons ainsi d'examiner chacun de ces éléments :

- Au cours de la différenciation épithéliale en inhibant ou non la voie HH (immunomarquages, transcriptomique et protéomique),
- Sur des tissus de patients BPCO ou non.

La validation de nos résultats sur des échantillons issus de fibroscopies ou de cohortes indépendantes sera aussi envisagée.

Afin de caractériser les acteurs moléculaires impactés par l'activation ou l'inhibition de la voie HH lors de la différenciation de l'épithélium des voies aériennes, nous proposons de recourir à une approche de séquençage des ARNs par transcriptomique. Dans un premier temps, les transcrits de cultures de cellules épithéliales des voies aériennes non différenciées (IAL précoce) traitées ou non par l'anticorps AB5E1 seront recherchés. Dans notre cas, nous pourrions confirmer ou non la présence d'éléments liés à la voie HH et en explorer d'autres en

lien avec l'altération de la différenciation, du processus de réparation et de l'apparition du remodelage sur des cellules provenant de patients BPCO ou non.

Etant donnée l'observation de l'altération de la ciliogenèse primaire chez les patients BPCO (Perotin et al., 2018) et connaissant l'importance du cil primaire pour la signalisation HH, les études de transcriptomiques permettront d'explorer l'ensemble des protéines associées aux cils avec l'altération de la voie HH. Par ailleurs, afin de valider notre modèle de remodelage de la BPCO en lien avec la voie HH il sera intéressant d'utiliser l'approche complémentaire d'inhibition de la ciliogenèse primaire. Cela permettra d'établir un lien entre la voie HH et la plasticité épithéliale mais aussi entre la ciliogenèse primaire et la ciliogenèse motrice considérant que les cellules multiciliées sont altérées chez les patients BPCO (Brekman et al., 2014; Gohy et al., 2019; Hessel et al., 2014; Yaghi and Dolovich, 2016). Le seul composant pharmacologique actuellement disponible utilisé afin d'inhiber la ciliogenèse primaire et l'hydrate de chloral (Deren et al., 2016; Ma et al., 2015). Les résultats préliminaires obtenus indiquent que l'inhibition de la ciliogenèse primaire inhibe fortement la mise en place de la ciliogenèse secondaire. Par ailleurs, le lien direct avec la voie HH est encore à faire.

Nos données sont exclusivement basées sur l'identification des acteurs de la voie HH au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes larges. Or la seule étude faisant le lien entre la BPCO et la voie HH a été faite au niveau du compartiment alvéolaire (Peng et al., 2015). Il sera donc complémentaire d'investiguer l'ensemble des éléments de la signalisation Shh au niveau des bronchioles mais aussi des alvéoles. Les résultats acquis permettront d'obtenir, pour la première fois, des données sur la voie HH sur l'ensemble de l'arbre bronchique chez l'Homme et apporteront des compléments fondamentaux sur les différences inter-espèces.

Par ailleurs, dans le but de compléter l'exploration de l'impact de la voie HH au niveau pulmonaire dans le contexte de la BPCO, la prise en compte de la composante inflammatoire et des interactions avec le stroma environnant sera nécessaire. Une grande partie de la littérature sur la BPCO traite de l'inflammation et de l'importance qu'elle revêt dans la mise en place et l'entretien de la physiopathologie (Barnes and Celli, 2009; Bar-Shavit et al., 1987; Dicker et al., 2020). De plus, de nombreuses cellules inflammatoires tels que les macrophages ou encore les cellules dendritiques expriment ou répondent à la voie HH (Chan et al., 2006; Fan et al., 2018; Sacedón et al., 2005; Valverde et al., 2016).

De plus, le premier lien effectué entre la voie HH et la BPCO est le corécepteur inhibiteur Hhip (Chan et al., 2006; Zhou et al., 2012). Néanmoins, nos expérimentations n'ont pas pu révéler sa présence au niveau de l'épithélium des voies aériennes. Cependant d'autres études, effectuées dans le cadre du développement évoque son expression au niveau des cellules du stroma environnant notamment dans les cellules musculaires lisses. (Danopoulos et al., 2020) Le lien entre l'expression et la localisation de Hhip et l'inhibition de la voie HH pourra être exploré.

Ainsi, considérant le rôle de la voie HH dans les interactions épithélio-mésenchymateuses l'étude de la transduction du signal entre les cellules épithéliales et les cellules du stroma fournira des indices cruciaux pour comprendre l'homéostasie pulmonaire adulte et son altération dans les maladies respiratoires (Peng et al., 2015; Shannon and Hyatt, 2004). L'altération du taux de Shh implique forcément une altération des interactions qu'il entretient avec le stroma comme suggéré par des études réalisées chez la souris (Litingtung et al., 1998; Motoyama et al., 1998; Pepicelli et al., 1998).

Enfin, il a été démontré que seul 20% des fumeurs développe une BPCO (Cho et al., 2019) et qu'il existe un lien entre des évènements moléculaires et cellulaires *in utero* avec la susceptibilité de développer des maladies notamment respiratoires (Bush, 2016; Shi et al., 2009). Par ailleurs, la signalisation HH est primordiale pour le développement normal du poumon (Kugler et al., 2015). Dans ce sens nous proposons l'étude de la voie HH durant le développement chez l'embryon Humain.

L'identification des différents acteurs et leur localisation spatio-temporelle durant le développement pulmonaire pourra être extrapolée à celle retrouvée chez l'adulte. L'inhibiteur AB5E1 pourra par ailleurs être utilisé *ex vivo* pour inhiber la voie et mieux comprendre les interactions entre les acteurs et les différentes sous populations cellulaires. Nos premières données avec l'utilisation du AB5E1 sur des embryons humains à différents stades de développement confirment les éléments de la littérature et dévoilent une altération de la ramification bronchique. Nous pourrons par la suite infirmer ou confirmer les données recueillies sur la voie HH chez la souris et établir le réseau de communication intercellulaire orchestré par la voie HH dans la mise en place de l'organogenèse pulmonaire (Bao and Ma, 2018; Chuang et al., 2003; Pepicelli et al., 1998).

3. Conclusions

En conclusion, nos travaux soulignent pour la première fois l'importance de la voie HH dans la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes chez l'Homme et son altération chez les patients BPCO. La compréhension plus approfondie de la relation entre les acteurs de la voie HH et les cellules épithéliales élucidera une partie de la mise en place du remodelage épithélial et permettra le développement potentiel de nouvelles stratégies thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- (1) Abramyan, J. (2019). Hedgehog Signaling and Embryonic Craniofacial Disorders. *J. Dev. Biol.* *7*.
- (2) Adam, D., Perotin, J.-M., Lebagry, F., Birembaut, P., Deslée, G., and Coraux, C. (2014). [Regeneration of airway epithelium]. *Rev. Mal. Respir.* *31*, 300–311.
- (3) Agrawal, R., Moghtader, S., Ayyala, U., Bandi, V., and Sharafkhaneh, A. (2019). Update on management of stable chronic obstructive pulmonary disease. *J. Thorac. Dis.* *11*, S1800–S1809.
- (4) van Agteren, J.E., Carson, K.V., Tiong, L.U., and Smith, B.J. (2016). Lung volume reduction surgery for diffuse emphysema. *Cochrane Database Syst. Rev.* *10*, CD001001.
- (5) Agusti, A., and Faner, R. (2019). Lung function trajectories in health and disease. *Lancet Respir. Med.* *7*, 358–364.
- (6) Ahn, S., and Joyner, A.L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* *437*, 894–897.
- (7) Akthar, S., Patel, D.F., Beale, R.C., Peiró, T., Xu, X., Gaggar, A., Jackson, P.L., Blalock, J.E., Lloyd, C.M., and Snelgrove, R.J. (2015). Matrikines are key regulators in modulating the amplitude of lung inflammation in acute pulmonary infection. *Nat. Commun.* *6*, 8423.
- (8) Alfaro, A.C., Roberts, B., Kwong, L., Bijlsma, M.F., and Roelink, H. (2014). Ptch2 mediates the Shh response in Ptch1^{-/-} cells. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 3331–3339.
- (9) Allen, B.L., Song, J.Y., Izzi, L., Althaus, I.W., Kang, J.-S., Charron, F., Krauss, R.S., and McMahon, A.P. (2011). Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev. Cell* *20*, 775–787.
- (10) Amano, K., Okuzaki, D., Aikawa, T., and Kogo, M. (2020). Indian hedgehog in craniofacial neural crest cells links to skeletal malocclusion by regulating associated cartilage formation and gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*
- (11) Arbi, M., Pefani, D.-E., Kyrousi, C., Lalioti, M.-E., Kalogeropoulou, A., Papanastasiou, A.D., Taraviras, S., and Lygerou, Z. (2016). GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. *EMBO Rep.* *17*, 400–413.
- (12) Bai, C.B., Auerbach, W., Lee, J.S., Stephen, D., and Joyner, A.L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 4753–4761.
- (13) Bailey, J.M., Swanson, B.J., Hamada, T., Eggers, J.P., Singh, P.K., Caffery, T., Ouellette, M.M., and Hollingsworth, M.A. (2008). Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 5995–6004.
- (14) Bale, A.E., and Yu, K.P. (2001). The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 757–762.

A**B**

-
- (15) Bao, H.-J., and Ma, S.-D. (2018). [Regulatory role of Shh signaling pathway in lung development in fetal mice]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 38, 274–282.
- (16) Bariwal, J., Kumar, V., Dong, Y., and Mahato, R.I. (2019). Design of Hedgehog pathway inhibitors for cancer treatment. *Med. Res. Rev.* 39, 1137–1204.
- (17) Barkauskas, C.E., Crouce, M.J., Rackley, C.R., Bowie, E.J., Keene, D.R., Stripp, B.R., Randell, S.H., Noble, P.W., and Hogan, B.L.M. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 123, 3025–3036.
- (18) Barnes, P.J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 16–27.
- (19) Barnes, P.J., and Celli, B.R. (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur. Respir. J.* 33, 1165–1185.
- (20) Barnes, E.A., Heidtman, K.J., and Donoghue, D.J. (2005). Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC. *Oncogene* 24, 902–915.
- (21) Barrett, A.L., Krueger, S., and Datta, S. (2008). Branchless and Hedgehog operate in a positive feedback loop to regulate the initiation of neuroblast division in the *Drosophila* larval brain. *Dev. Biol.* 317, 234–245.
- (22) Barrios, J., Kho, A.T., Aven, L., Mitchel, J.A., Park, J.-A., Randell, S.H., Miller, L.A., Tantisira, K.G., and Ai, X. (2019). Pulmonary Neuroendocrine Cells Secrete γ -Aminobutyric Acid to Induce Goblet Cell Hyperplasia in Primate Models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 60, 687–694.
- (23) Bar-Shavit, R., Hruska, K.A., Kahn, A.J., and Wilner, G.D. (1987). Thrombin chemotactic stimulation of HL-60 cells: studies on thrombin responsiveness as a function of differentiation. *J. Cell. Physiol.* 131, 255–261.
- (24) Bártholo, T.P., Porto, L.C., Pozzan, R., Nascimento, A., and Da Costa, C.H. (2019). Evaluation Of HHIP Polymorphisms And Their Relationship With Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 14, 2267–2272.
- (25) Beers, M.F., and Morrisey, E.E. (2011). The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J. Clin. Invest.* 121, 2065–2073.
- (26) Behera, S.N., Xian, H., and Balasubramanian, R. (2014). Human health risk associated with exposure to toxic elements in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Sci. Total Environ.* 472, 947–956.
- (27) Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M.G., Henderson, R., Winnier, G., and Hogan, B.L. (1997). Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 124, 53–63.
- (28) Bennett, W.D. (2002). Effect of beta-adrenergic agonists on mucociliary clearance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, S291-297.

-
- (29) Bergdahl, I.A., Torén, K., Eriksson, K., Hedlund, U., Nilsson, T., Flodin, R., and Järholm, B. (2004). Increased mortality in COPD among construction workers exposed to inorganic dust. *Eur. Respir. J.* 23, 402–406.
- (30) Bidet, M., Joubert, O., Lacombe, B., Ciantar, M., Nehmé, R., Mollat, P., Brétilon, L., Faure, H., Bittman, R., Ruat, M., et al. (2011). The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One* 6, e23834.
- (31) Bitgood, M.J., Shen, L., and McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* CB 6, 298–304.
- (32) Boers, J.E., Ambergen, A.W., and Thunnissen, F.B. (1999). Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1585–1591.
- (33) Bolaños, A.L., Milla, C.M., Lira, J.C., Ramírez, R., Checa, M., Barrera, L., García-Alvarez, J., Carbajal, V., Becerril, C., Gaxiola, M., et al. (2012). Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L978-990.
- (34) Bonser, L.R., and Erle, D.J. (2017). Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *J. Clin. Med.* 6.
- (35) Booth, D.R. (1999). The hedgehog signalling pathway and its role in basal cell carcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 261–284.
- (36) Borgerding, M., and Klus, H. (2005). Analysis of complex mixtures--cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* 57 Suppl 1, 43–73.
- (37) Borgerding, M.F., Bodnar, J.A., Curtin, G.M., and Swauger, J.E. (2012). The chemical composition of smokeless tobacco: a survey of products sold in the United States in 2006 and 2007. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 64, 367–387.
- (38) Bosanac, I., Maun, H.R., Scales, S.J., Wen, X., Lingel, A., Bazan, J.F., de Sauvage, F.J., Hymowitz, S.G., and Lazarus, R.A. (2009). The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 691–697.
- (39) Brajer-Luftmann, B., Nowicka, A., Kaczmarek, M., Wyrzykiewicz, M., Yasar, S., Piorunek, T., Sikora, J., and Batura-Gabryel, H. (2019). Damage-Associated Molecular Patterns and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *J. Immunol. Res.* 2019, 9708769.
- (40) Branchfield, K., Nantie, L., Verheyden, J.M., Sui, P., Wienhold, M.D., and Sun, X. (2016). Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science* 351, 707–710.
- (41) Brechbuhl, H.M., Li, B., Smith, R.W., and Reynolds, S.D. (2014). Epidermal growth factor receptor activity is necessary for mouse basal cell proliferation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L800-810.

- (42) Brekman, A., Walters, M.S., Tilley, A.E., and Crystal, R.G. (2014). FOXJ1 prevents cilia growth inhibition by cigarette smoke in human airway epithelium in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *51*, 688–700.
- (43) Briscoe, J., and Théron, P.P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 416–429.
- (44) Brown, L.M., and Duck-Chong, C.G. (1982). Methods of evaluating fetal lung maturity. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *16*, 85–159.
- (45) Bruce, N., Perez-Padilla, R., and Albalak, R. (2000). Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull. World Health Organ.* *78*, 1078–1092.
- (46) Burgess, J.K., and Weckmann, M. (2012). Matrikines and the lungs. *Pharmacol. Ther.* *134*, 317–337.
- (47) Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., and Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* *99*, 803–815.
- (48) Bush, A. (2016). Lung Development and Aging. *Ann. Am. Thorac. Soc.* *13 Suppl 5*, S438–S446.
- (49) Bustamante-Marin, X.M., and Ostrowski, L.E. (2017). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*.
- (50) Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., and Rubinstein, M. (2012a). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* *337*, 937–941.
- (51) Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., and Rubinstein, M. (2012b). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* *337*, 937–941.
- (52) Button, B., Anderson, W.H., and Boucher, R.C. (2016). Mucus Hyperconcentration as a Unifying Aspect of the Chronic Bronchitic Phenotype. *Ann. Am. Thorac. Soc.* *13 Suppl 2*, S156-162.
- (53) Calkovská, A. (2000). [Pulmonary surfactant in the respiratory tract]. *Cesk. Fysiol.* *49*, 145–151.
- (54) Cao, Z., Liu, J., Xie, X., Zhan, S., Song, W., Wu, S., Sun, Z., Dong, Y., Tang, G., Liu, Y., et al. (2020). Lipidomic profiling of amniotic fluid and its application in fetal lung maturity prediction. *J. Clin. Lab. Anal.* *34*, e23109.
- (55) Capurro, M., Shi, W., Izumikawa, T., Kitagawa, H., and Filmus, J. (2015). Processing by convertases is required for glypican-3-induced inhibition of Hedgehog signaling. *J. Biol. Chem.* *290*, 7576–7585.

- (56) Capurro, M.I., Xu, P., Shi, W., Li, F., Jia, A., and Filmus, J. (2008). Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev. Cell* 14, 700–711.
- (57) Caramori, G., Casolari, P., Di Gregorio, C., Saetta, M., Baraldo, S., Boschetto, P., Ito, K., Fabbri, L.M., Barnes, P.J., Adcock, I.M., et al. (2009). MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology* 55, 321–331.
- (58) Carballo, G.B., Honorato, J.R., de Lopes, G.P.F., and Spohr, T.C.L. de S.E. (2018). A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun. Signal. CCS* 16, 11.
- (59) Castaldi, P.J., Cho, M.H., San José Estépar, R., McDonald, M.-L.N., Laird, N., Beaty, T.H., Washko, G., Crapo, J.D., Silverman, E.K., and COPDGene Investigators (2014). Genome-wide association identifies regulatory Loci associated with distinct local histogram emphysema patterns. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 399–409.
- (60) Chan, V.S.F., Chau, S.-Y., Tian, L., Chen, Y., Kwong, S.K.Y., Quackenbush, J., Dallman, M., Lamb, J., and Tam, P.K.H. (2006). Sonic hedgehog promotes CD4+ T lymphocyte proliferation and modulates the expression of a subset of CD28-targeted genes. *Int. Immunol.* 18, 1627–1636.
- (61) Chaudary, N., Pintilie, M., Hedley, D., Hill, R.P., Milosevic, M., and Mackay, H. (2017). Hedgehog inhibition enhances efficacy of radiation and cisplatin in orthotopic cervical cancer xenografts. *Br. J. Cancer* 116, 50–57.
- (62) Chen, M.-H., Li, Y.-J., Kawakami, T., Xu, S.-M., and Chuang, P.-T. (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev.* 18, 641–659.
- (63) Chen, Y., Yue, S., Xie, L., Pu, X., Jin, T., and Cheng, S.Y. (2011). Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J. Biol. Chem.* 286, 13502–13511.
- (64) Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413.
- (65) Cho, W.K., Lee, C.G., and Kim, L.K. (2019). COPD as a Disease of Immunosenescence. *Yonsei Med. J.* 60, 407–413.
- (66) Chuang, P.T., and McMahon, A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617–621.
- (67) Chuang, P.-T., Kawcak, T., and McMahon, A.P. (2003). Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev.* 17, 342–347.
- (68) Chung, M.-I., Bujnis, M., Barkauskas, C.E., Kobayashi, Y., and Hogan, B.L.M. (2018). Niche-mediated BMP/SMAD signaling regulates lung alveolar stem cell proliferation and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 145.

- (69) Cigna, N., Farrokhi Moshai, E., Brayer, S., Marchal-Somme, J., Wémeau-Stervinou, L., Fabre, A., Mal, H., Lesèche, G., Dehoux, M., Soler, P., et al. (2012). The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- β -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* *181*, 2126–2137.
- (70) Clary-Meinesz, C.F., Cosson, J., Huitorel, P., and Blaive, B. (1992). Temperature effect on the ciliary beat frequency of human nasal and tracheal ciliated cells. *Biol. Cell* *76*, 335–338.
- (71) Collins, J.J.P., and Thébaud, B. (2014). Lung mesenchymal stromal cells in development and disease: to serve and protect? *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 1849–1862.
- (72) Coon, D.R., Roberts, D.J., Loscertales, M., and Kradin, R. (2006). Differential epithelial expression of SHH and FOXF1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp. Mol. Pathol.* *80*, 119–123.
- (73) Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* *437*, 1018–1021.
- (74) Cosio, M.G., Saetta, M., and Agusti, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2445–2454.
- (75) Cruz, T., López-Giraldo, A., Noell, G., Casas-Recasens, S., Garcia, T., Molins, L., Juan, M., Fernandez, M.A., Agustí, A., and Faner, R. (2019). Multi-level immune response network in mild-moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Respir. Res.* *20*, 152.
- (76) Dang, H., Wang, S., Yang, L., Fang, F., and Xu, F. (2012). Upregulation of Shh and Ptc1 in hyperoxia-induced acute lung injury in neonatal rats. *Mol. Med. Rep.* *6*, 297–302.
- (77) Danopoulos, S., Thornton, M.E., Grubbs, B.H., Frey, M.R., Warburton, D., Bellusci, S., and Al Alam, D. (2019a). Discordant roles for FGF ligands in lung branching morphogenesis between human and mouse. *J. Pathol.* *247*, 254–265.
- (78) Danopoulos, S., Shiosaki, J., and Al Alam, D. (2019b). FGF Signaling in Lung Development and Disease: Human Versus Mouse. *Front. Genet.* *10*, 170.
- (79) Danopoulos, S., Bhattacharya, S., Mariani, T.J., and Al Alam, D. (2020). Transcriptional characterisation of human lung cells identifies novel mesenchymal lineage markers. *Eur. Respir. J.* *55*.
- (80) De Luca, A., Cerrato, V., Fucà, E., Parmigiani, E., Buffo, A., and Leto, K. (2016). Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 291–303.
- (81) De Rose, V., Molloy, K., Gohy, S., Pilette, C., and Greene, C.M. (2018). Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm.* *2018*, 1309746.

- (82) Deng, X., and Song, J. (2018). Correlation analysis between depression and family fitness in chronic obstructive pulmonary disease inpatients: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* 97, e13946.
- (83) Deren, M.E., Yang, X., Guan, Y., and Chen, Q. (2016). Biological and Chemical Removal of Primary Cilia Affects Mechanical Activation of Chondrogenesis Markers in Chondroprogenitors and Hypertrophic Chondrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 188.
- (84) Diaz-Guzman, E., and Mannino, D.M. (2014). Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Chest Med.* 35, 7–16.
- (85) Dicker, A.J., Huang, J.T., Lonergan, M., Keir, H.R., Fong, C.J., Tan, B., Cassidy, A.J., Finch, S., Mullerova, H., Miller, B.E., et al. (2020). The Sputum Microbiome, Airway Inflammation and Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- (86) Diette, G.B., Accinelli, R.A., Balmes, J.R., Buist, A.S., Checkley, W., Garbe, P., Hansel, N.N., Kapil, V., Gordon, S., Lagat, D.K., et al. (2012). OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE AND EXPOSURE TO BURNING BIOMASS FUEL IN THE INDOOR ENVIRONMENT. *Glob. Heart* 7, 265–270.
- (87) Domyan, E.T., Ferretti, E., Throckmorton, K., Mishina, Y., Nicolis, S.K., and Sun, X. (2011). Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2. *Dev. Camb. Engl.* 138, 971–981.
- (88) Donnelly, J.M., Chawla, A., Houghton, J., and Zavros, Y. (2013). Sonic hedgehog mediates the proliferation and recruitment of transformed mesenchymal stem cells to the stomach. *PloS One* 8, e75225.
- (89) Dormoy, V., Danilin, S., Lindner, V., Thomas, L., Rothhut, S., Coquard, C., Helwig, J.-J., Jacqmin, D., Lang, H., and Massfelder, T. (2009). The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol. Cancer* 8, 123.
- (90) Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S., and David, V. (2007). Holoprosencephaly. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 8.
- (91) Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., and Du, W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 417, 299–304.
- (92) Dutau, H., Deslée, G., Bregeon, F., Astoul, P., and Thomas, P. (2019). Successful Lung Volume Reduction Surgery after Endobronchial Coils Treatment in a Severe Emphysematous Patient. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 98, 174–177.
- (93) Eapen, M.S., Myers, S., Walters, E.H., and Sohal, S.S. (2017). Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a true paradox. *Expert Rev. Respir. Med.* 11, 827–839.
- (94) Edgar, R.G., Patel, M., Bayliss, S., Crossley, D., Sapey, E., and Turner, A.M. (2017). Treatment of lung disease in alpha-1 antitrypsin deficiency: a systematic review. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 12, 1295–1308.

- (95) Endoh-Yamagami, S., Evangelista, M., Wilson, D., Wen, X., Theunissen, J.-W., Phamluong, K., Davis, M., Scales, S.J., Solloway, M.J., de Sauvage, F.J., et al. (2009). The mammalian *Cos2* homolog *Kif7* plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Curr. Biol. CB* 19, 1320–1326.
- (96) Etheridge, L.A., Crawford, T.Q., Zhang, S., and Roelink, H. (2010). Evidence for a role of vertebrate *Disp1* in long-range Shh signaling. *Dev. Camb. Engl.* 137, 133–140.
- (97) Faiz, A., Heijink, I.H., Vermeulen, C.J., Guryev, V., van den Berge, M., Nawijn, M.C., and Pouwels, S.D. (2018). Cigarette smoke exposure decreases CFLAR expression in the bronchial epithelium, augmenting susceptibility for lung epithelial cell death and DAMP release. *Sci. Rep.* 8, 12426.
- (98) Falk, G.A., and Briscoe, W.A. (1970). Alpha-1-antitrypsin deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Intern. Med.* 72, 427–429.
- (99) Fan, F., Wang, R., Boulbes, D.R., Zhang, H., Watowich, S.S., Xia, L., Ye, X., Bhattacharya, R., and Ellis, L.M. (2018). Macrophage conditioned medium promotes colorectal cancer stem cell phenotype via the hedgehog signaling pathway. *PloS One* 13, e0190070.
- (100) Farzan, S.F., Singh, S., Schilling, N.S., and Robbins, D.J. (2008). The adventures of sonic hedgehog in development and repair. III. Hedgehog processing and biological activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G844-849.
- (101) Feghali-Bostwick, C.A., Gadgil, A.S., Otterbein, L.E., Pilewski, J.M., Stoner, M.W., Cszimadia, E., Zhang, Y., Sciruba, F.C., and Duncan, S.R. (2008). Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 156–163.
- (102) Fernandez, I.E., and Eickelberg, O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 380, 680–688.
- (103) Figueiró, L.R., Ziulkoski, A.L., and Dantas, D.C.M. (2016). Thirdhand smoke: when the danger is more than you can see or smell. *Cad. Saude Publica* 32, e00032216.
- (104) Fine, J.D., Eady, R.A., Levy, M.L., Hejtmancik, J.F., Courtney, K.B., Carpenter, R.J., Holbrook, K.A., and Hawkins, H.K. (1988). Prenatal diagnosis of dominant and recessive dystrophic epidermolysis bullosa: application and limitations in the use of KF-1 and LH 7:2 monoclonal antibodies and immunofluorescence mapping technique. *J. Invest. Dermatol.* 91, 465–471.
- (105) Fischer, B.M., Voynow, J.A., and Ghio, A.J. (2015). COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 10, 261–276.
- (106) Fiúza, U.-M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.* 194, 459–474.
- (107) Frank, D.B., Peng, T., Zepp, J.A., Snitow, M., Vincent, T.L., Penkala, I.J., Cui, Z., Herriges, M.J., Morley, M.P., Zhou, S., et al. (2016). Emergence of a Wave of Wnt Signaling that Regulates Lung Alveologenesis by Controlling Epithelial Self-Renewal and Differentiation. *Cell Rep.* 17, 2312–2325.

- (108) Fuhrman, C., Delmas, M.-C., and pour le groupe épidémiologie et recherche clinique de la SPLF (2010). [Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in France]. *Rev. Mal. Respir.* 27, 160–168.
- (109) Gamez, A.S., Gras, D., Petit, A., Knabe, L., Molinari, N., Vachier, I., Chanez, P., and Bourdin, A. (2015). Supplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* 147, 1467–1476.
- (110) Ganesan, S., and Sajjan, U.S. (2013). Repair and Remodeling of airway epithelium after injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr. Respir. Care Rep.* 2.
- (111) Garcia-Caballero, A., Rasmussen, J.E., Gaillard, E., Watson, M.J., Olsen, J.C., Donaldson, S.H., Stutts, M.J., and Tarran, R. (2009). SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11412–11417.
- (112) Ghosh, A., Boucher, R.C., and Tarran, R. (2015). Airway hydration and COPD. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 3637–3652.
- (113) Gilowska, I., Kasper, Ł., Bogacz, K., Szczegielniak, J., Szymasek, T., Kasper, M., Czerwinski, M., Śladek, K., and Majorczyk, E. (2018). Impact of Matrix Metalloproteinase 9 on COPD Development in Polish Patients: Genetic Polymorphism, Protein Level, and Their Relationship with Lung Function. *BioMed Res. Int.* 2018, 6417415.
- (114) Giroux-Leprieur, E., Costantini, A., Ding, V.W., and He, B. (2018). Hedgehog Signaling in Lung Cancer: From Oncogenesis to Cancer Treatment Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- (115) Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Cooper, C., and Thornburg, K.L. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N. Engl. J. Med.* 359, 61–73.
- (116) Gohy, S., Carlier, F.M., Fregimilicka, C., Detry, B., Lecocq, M., Ladjemi, M.Z., Verleden, S., Hoton, D., Weynand, B., Bouzin, C., et al. (2019). Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci. Rep.* 9, 17963.
- (117) Greene, C., and Campbell, M. (2016). Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers* 4, e1138017.
- (118) Greulich, T., and Vogelmeier, C.F. (2016). Alpha-1-antitrypsin deficiency: increasing awareness and improving diagnosis. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 10, 72–84.
- (119) Gross, T.J., and Hunninghake, G.W. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 345, 517–525.
- (120) Guillien, A., Puyraveau, M., Soumagne, T., Guillot, S., Rannou, F., Marquette, D., Berger, P., Jouneau, S., Monnet, E., Mauny, F., et al. (2016). Prevalence and risk factors for COPD in farmers: a cross-sectional controlled study. *Eur. Respir. J.* 47, 95–103.
- (121) Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., Amselem, S., and Clement, A. (2013). Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2568–2573.

- (122) Hardyman, M.A., Wilkinson, E., Martin, E., Jayasekera, N.P., Blume, C., Swindle, E.J., Gozzard, N., Holgate, S.T., Howarth, P.H., Davies, D.E., et al. (2013). TNF- α -mediated bronchial barrier disruption and regulation by src-family kinase activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 665-675.e8.
- (123) Hatayama, M., and Aruga, J. (2012). Gli protein nuclear localization signal. *Vitam. Horm.* *88*, 73–89.
- (124) Hedger, G., Koldsø, H., Chavent, M., Siebold, C., Rohatgi, R., and Sansom, M.S.P. (2019). Cholesterol Interaction Sites on the Transmembrane Domain of the Hedgehog Signal Transducer and Class F G Protein-Coupled Receptor Smoothed. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *27*, 549-559.e2.
- (125) Hegewald, M.J., and Crapo, R.O. (2007). Socioeconomic status and lung function. *Chest* *132*, 1608–1614.
- (126) Herth, F.J.F., Slebos, D.-J., Criner, G.J., Valipour, A., Scieurba, F., and Shah, P.L. (2019). Endoscopic Lung Volume Reduction: An Expert Panel Recommendation - Update 2019. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* *97*, 548–557.
- (127) Hessel, J., Heldrich, J., Fuller, J., Staudt, M.R., Radisch, S., Hollmann, C., Harvey, B.-G., Kaner, R.J., Salit, J., Yee-Levin, J., et al. (2014). Intraflagellar transport gene expression associated with short cilia in smoking and COPD. *PloS One* *9*, e85453.
- (128) Higham, A., Scott, T., Li, J., Gaskell, R., Dikwa, A.B., Shah, R., Montero-Fernandez, M.A., Lea, S., and Singh, D. (2020). Effects of corticosteroids on COPD lung macrophage phenotype and function. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *134*, 751–763.
- (129) Ho, T., Cusack, R.P., Chaudhary, N., Satia, I., and Kurmi, O.P. (2019). Under- and over-diagnosis of COPD: a global perspective. *Breathe Sheff. Engl.* *15*, 24–35.
- (130) Hobbs, C.A., Da Tan, C., and Tarran, R. (2013). Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease? *J. Physiol.* *591*, 4377–4387.
- (131) Hoenderdos, K., and Condliffe, A. (2013). The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *48*, 531–539.
- (132) Horita, N., Goto, A., Shibata, Y., Ota, E., Nakashima, K., Nagai, K., and Kaneko, T. (2017). Long-acting muscarinic antagonist (LAMA) plus long-acting beta-agonist (LABA) versus LABA plus inhaled corticosteroid (ICS) for stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cochrane Database Syst. Rev.* *2*, CD012066.
- (133) Houtmeyers, E., Gosselink, R., Gayan-Ramirez, G., and Decramer, M. (1999). Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur. Respir. J.* *13*, 1177–1188.
- (134) Hovenberg, H.W., Davies, J.R., and Carlstedt, I. (1996). Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem. J.* *318* (Pt 1), 319–324.
- (135) Hu, Y., Chen, B., Yin, Z., Jia, L., Zhou, Y., and Jin, T. (2006). Increased risk of chronic obstructive pulmonary diseases in coke oven workers: interaction between occupational exposure and smoking. *Thorax* *61*, 290–295.

- (136) Huckle, A.W., Fairclough, L.C., and Todd, I. (2018). Prophylactic Antibiotic Use in COPD and the Potential Anti-Inflammatory Activities of Antibiotics. *Respir. Care* 63, 609–619.
- (137) Hung, C.-H., Chen, L.-C., Zhang, Z., Chowdhury, B., Lee, W.-L., Plunkett, B., Chen, C.-H., Myers, A.C., and Huang, S.-K. (2004). Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 664–670.
- (138) Hutchison, D.C., Cook, P.J., Barter, C.E., Harris, H., and Hugh-Jones, P. (1971). Pulmonary emphysema and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Br. Med. J.* 1, 689–694.
- (139) Hylkema, M.N., and Blacquièrre, M.J. (2009). Intrauterine effects of maternal smoking on sensitization, asthma, and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 660–662.
- (140) Ihrie, R.A., Shah, J.K., Harwell, C.C., Levine, J.H., Guinto, C.D., Lezameta, M., Kriegstein, A.R., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 71, 250–262. **I**
- (141) Ishikawa, T. (2017). Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9.
- (142) Itoh, N., and Ohta, H. (2014). Fgf10: a paracrine-signaling molecule in development, disease, and regenerative medicine. *Curr. Mol. Med.* 14, 504–509.
- (143) Jaroenpool, J., Pattanapanyasat, K., Noonin, N., and Prachongsai, I. (2016). Aberrant neutrophil function among heavy smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 34, 278–283. **J**
- (144) Jia, J., Kolterud, A., Zeng, H., Hoover, A., Teglund, S., Toftgård, R., and Liu, A. (2009). Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. *Dev. Biol.* 330, 452–460.
- (145) Jiang, L., Huang, J., Hu, Y., Lu, P., Luo, Q., and Wang, L. (2020). Gli promotes tumor progression through regulating epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer. *J. Cardiothorac. Surg.* 15, 18.
- (146) Johnson, R.L., Laufer, E., Riddle, R.D., and Tabin, C. (1994). Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 79, 1165–1173.
- (147) Karp, S.J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., and McMahon, A.P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Dev. Camb. Engl.* 127, 543–548. **K**
- (148) Katoh, Y., and Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* 9, 873–886.
- (149) Kenney, A.M., Cole, M.D., and Rowitch, D.H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Dev. Camb. Engl.* 130, 15–28.

- (150) Kim, C.S., Ahmad, S., Wu, T., Walton, W.G., Redinbo, M.R., and Tarran, R. (2018). SPLUNC1 is an allosteric modulator of the epithelial sodium channel. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 2478–2491.
- (151) Kim, J., Hsia, E.Y.C., Brigui, A., Plessis, A., Beachy, P.A., and Zheng, X. (2015). The role of ciliary trafficking in Hedgehog receptor signaling. *Sci. Signal.* 8, ra55.
- (152) Kim, W.J., Oh, Y.-M., Lee, J.H., Park, C.-S., Park, S.W., Park, J.S., and Lee, S.D. (2013). Genetic variants in HHIP are associated with FEV1 in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirol. Carlton Vic* 18, 1202–1209.
- (153) Kirkham, P.A., and Barnes, P.J. (2013). Oxidative stress in COPD. *Chest* 144, 266–273.
- (154) Kirkham, S., Kolsum, U., Rousseau, K., Singh, D., Vestbo, J., and Thornton, D.J. (2008). MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1033–1039.
- (155) Kitaoka, H., Burri, P.H., and Weibel, E.R. (1996). Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat. Rec.* 244, 207–213.
- (156) Koleva, M.V., Rothery, S., Spitaler, M., Neil, M.A.A., and Magee, A.I. (2015). Sonic hedgehog multimerization: a self-organizing event driven by post-translational modifications? *Mol. Membr. Biol.* 32, 65–74.
- (157) Kong, J.H., Siebold, C., and Rohatgi, R. (2019). Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Dev. Camb. Engl.* 146.
- (158) Koval, M. (2013). Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 551–567.
- (159) Kowatsch, C., Woolley, R.E., Kinnebrew, M., Rohatgi, R., and Siebold, C. (2019). Structures of vertebrate Patched and Smoothed reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57, 204–214.
- (160) Kugler, M.C., Joyner, A.L., Loomis, C.A., and Munger, J.S. (2015). Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 1–13.
- (161) Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528–1537.
- (162) Lees, C., Howie, S., Sartor, R.B., and Satsangi, J. (2005). The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease. *Gastroenterology* 129, 1696–1710.
- (163) Legrand, C., Gilles, C., Zahm, J.M., Polette, M., Buisson, A.C., Kaplan, H., Birembaut, P., and Tournier, J.M. (1999). Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J. Cell Biol.* 146, 517–529.
- (164) Leung, J.M., Tiew, P.Y., Mac Aogáin, M., Budden, K.F., Yong, V.F.L., Thomas, S.S., Pethe, K., Hansbro, P.M., and Chotirmall, S.H. (2017). The role of acute and chronic

- respiratory colonization and infections in the pathogenesis of COPD. *Respirol. Carlton Vic* 22, 634–650.
- (165) Li, C., Hu, L., Xiao, J., Chen, H., Li, J.T., Bellusci, S., Delanghe, S., and Minoo, P. (2005). *Wnt5a* regulates *Shh* and *Fgf10* signaling during lung development. *Dev. Biol.* 287, 86–97.
- (166) Li, X., Deng, W., Nail, C.D., Bailey, S.K., Kraus, M.H., Ruppert, J.M., and Lobo-Ruppert, S.M. (2006). Snail induction is an early response to *Gli1* that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 25, 609–621.
- (167) Li, X., Howard, T.D., Moore, W.C., Ampleford, E.J., Li, H., Busse, W.W., Calhoun, W.J., Castro, M., Chung, K.F., Erzurum, S.C., et al. (2011). Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 1457–1465.
- (168) Lindskog, C., Fagerberg, L., Hallström, B., Edlund, K., Hellwig, B., Rahnenführer, J., Kampf, C., Uhlén, M., Pontén, F., and Micke, P. (2014). The lung-specific proteome defined by integration of transcriptomics and antibody-based profiling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 5184–5196.
- (169) Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H., and Chiang, C. (1998). Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat. Genet.* 20, 58–61.
- (170) Liu, A. (2019). Proteostasis in the Hedgehog signaling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 93, 153–163.
- (171) Liu, L., Kugler, M.C., Loomis, C.A., Samdani, R., Zhao, Z., Chen, G.J., Brandt, J.P., Brownell, I., Joyner, A.L., Rom, W.N., et al. (2013). Hedgehog signaling in neonatal and adult lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 703–710.
- (172) Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., et al. (2012). 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 Lond. Engl.* 380, 2095–2128.
- (173) Ma, J., Rubin, B.K., and Voynow, J.A. (2018). Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest* 154, 169–176.
- (174) Ma, X., Shi, W., Xie, Y., Ma, H., Ge, B., Zhen, P., and Chen, K. (2015). [Establishment of osteoblast primary cilia model removed by chloral hydrate]. *Zhongguo Gu Shang China J. Orthop. Traumatol.* 28, 547–552.
- (175) Mammen, M.J., and Sethi, S. (2016). COPD and the microbiome. *Respirol. Carlton Vic* 21, 590–599.
- (176) Mao, S., Shah, A.S., Moninger, T.O., Ostedgaard, L.S., Lu, L., Tang, X.X., Thornell, I.M., Reznikov, L.R., Ernst, S.E., Karp, P.H., et al. (2018). Motile cilia of human airway epithelia contain hedgehog signaling components that mediate noncanonical hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 1370–1375.

- (177) Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C., et al. (2011). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* *13*, 693–699.
- (178) Marchetti, N., and Criner, G.J. (2015). Surgical Approaches to Treating Emphysema: Lung Volume Reduction Surgery, Bullectomy, and Lung Transplantation. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *36*, 592–608.
- (179) Marine, W.M., Gurr, D., and Jacobsen, M. (1988). Clinically important respiratory effects of dust exposure and smoking in British coal miners. *Am. Rev. Respir. Dis.* *137*, 106–112.
- (180) Miller, L.-A.D., Wert, S.E., Clark, J.C., Xu, Y., Perl, A.-K.T., and Whitsett, J.A. (2004). Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *231*, 57–71.
- (181) Mims, J.W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. *Int. Forum Allergy Rhinol.* *5 Suppl 1*, S2-6.
- (182) Montoro, D.T., Haber, A.L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S.E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H.M., Villoria, J., et al. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* *560*, 319–324.
- (183) Mori, M., Mahoney, J.E., Stupnikov, M.R., Paez-Cortez, J.R., Szymaniak, A.D., Varelas, X., Herrick, D.B., Schwob, J., Zhang, H., and Cardoso, W.V. (2015). Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 258–267.
- (184) Morimoto, M., Liu, Z., Cheng, H.-T., Winters, N., Bader, D., and Kopan, R. (2010). Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *J. Cell Sci.* *123*, 213–224.
- (185) Morimoto, M., Nishinakamura, R., Saga, Y., and Kopan, R. (2012). Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 4365–4373.
- (186) Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M., and Hui, C.C. (1998). Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat. Genet.* *20*, 54–57.
- (187) Motz, G.T., Eppert, B.L., Sun, G., Wesselkamper, S.C., Linke, M.J., Deka, R., and Borchers, M.T. (2008). Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 8036–8043.
- (188) Mucenski, M.L., Wert, S.E., Nation, J.M., Loudy, D.E., Huelsken, J., Birchmeier, W., Morrisey, E.E., and Whitsett, J.A. (2003). beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *278*, 40231–40238.
- (189) Mullassery, D., and Smith, N.P. (2015). Lung development. *Semin. Pediatr. Surg.* *24*, 152–155.

- (190) Murphy, P.B., Rehal, S., Arbane, G., Bourke, S., Calverley, P.M.A., Crook, A.M., Dowson, L., Duffy, N., Gibson, G.J., Hughes, P.D., et al. (2017). Effect of Home Noninvasive Ventilation With Oxygen Therapy vs Oxygen Therapy Alone on Hospital Readmission or Death After an Acute COPD Exacerbation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 317, 2177–2186.
- (191) Murray, L.A., Dunmore, R., Camelo, A., Da Silva, C.A., Gustavsson, M.J., Habel, D.M., Hackett, T.L., Hogaboam, C.M., Sleeman, M.A., and Knight, D.A. (2017). Acute cigarette smoke exposure activates apoptotic and inflammatory programs but a second stimulus is required to induce epithelial to mesenchymal transition in COPD epithelium. *Respir. Res.* 18, 82.
- (192) Nakajima, T., Nakamura, H., Owen, C.A., Yoshida, S., Tsuduki, K., Chubachi, S., Shirahata, T., Mashimo, S., Nakamura, M., Takahashi, S., et al. (2016). Plasma Cathepsin S and Cathepsin S/Cystatin C Ratios Are Potential Biomarkers for COPD. *Dis. Markers* 2016, 4093870. **N**
- (193) Negewo, N.A., Gibson, P.G., and McDonald, V.M. (2015). COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirol. Carlton Vic* 20, 1160–1171.
- (194) Neofytou, E., Tzortzaki, E.G., Chatziantoniou, A., and Siafakas, N.M. (2012). DNA damage due to oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16853–16864.
- (195) Okubo, T., and Hogan, B.L.M. (2004). Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J. Biol.* 3, 11. **O**
- (196) Overgaard, C.E., Mitchell, L.A., and Koval, M. (2012). Roles for claudins in alveolar epithelial barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 167–174.
- (197) Pan, Y., Wang, C., and Wang, B. (2009). Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev. Biol.* 326, 177–189. **P**
- (198) Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S.S., Chakrabarti, L., McMahon, A.P., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1999). Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23, 713–724.
- (199) Pascual, O., Traiffort, E., Baker, D.P., Galdes, A., Ruat, M., and Champagnat, J. (2005). Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *Eur. J. Neurosci.* 22, 389–396.
- (200) Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., and Williams, K.P. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech. Dev.* 106, 107–117.
- (201) Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 261, 1701–1707.
- (202) Pavord, I.D., Jones, P.W., Burgel, P.-R., and Rabe, K.F. (2016). Exacerbations of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 11 Spec Iss*, 21–30.

- (203) Peng, T., Frank, D.B., Kadzik, R.S., Morley, M.P., Rathi, K.S., Wang, T., Zhou, S., Cheng, L., Lu, M.M., and Morrisey, E.E. (2015). Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature* 526, 578–582.
- (204) Pepicelli, C.V., Lewis, P.M., and McMahon, A.P. (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol. CB* 8, 1083–1086.
- (205) Peres, A., Dorneles, G.P., Dias, A.S., Vianna, P., Chies, J.A.B., and Monteiro, M.B. (2018). T-cell profile and systemic cytokine levels in overweight-obese patients with moderate to very-severe COPD. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 247, 74–79.
- (206) Perotin, J.-M., Coraux, C., Lagonotte, E., Birembaut, P., Delepine, G., Polette, M., Deslée, G., and Dormoy, V. (2018). Alteration of primary cilia in COPD. *Eur. Respir. J.* 52.
- (207) Petrova, R., and Joyner, A.L. (2014). Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Dev. Camb. Engl.* 141, 3445–3457.
- (208) Petrova, R., Garcia, A.D.R., and Joyner, A.L. (2013). Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 17490–17505.
- (209) Pillai, S.G., Ge, D., Zhu, G., Kong, X., Shianna, K.V., Need, A.C., Feng, S., Hersh, C.P., Bakke, P., Gulsvik, A., et al. (2009). A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet.* 5, e1000421.
- (210) van der Plaats, D.A., de Jong, K., Lahousse, L., Faiz, A., Vonk, J.M., van Diemen, C.C., Nedeljkovic, I., Amin, N., Brusselle, G.G., Hofman, A., et al. (2017). Genome-wide association study on the FEV1/FVC ratio in never-smokers identifies HHIP and FAM13A. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 533–540.
- (211) Plasschaert, L.W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A.M., and Jaffe, A.B. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560, 377–381.
- (212) Pongracz, J.E., and Stockley, R.A. (2006). Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir. Res.* 7, 15.
- (213) Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., and Beachy, P.A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363–366.
- (214) Poulsen, J.H., Fischer, H., Illek, B., and Machen, T.E. (1994). Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5340–5344.
- (215) Pouwels, S.D., Heijink, I.H., ten Hacken, N.H.T., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Nawijn, M.C., and van Oosterhout, A.J.M. (2014). DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol.* 7, 215–226.

- (216) Puchelle, E., Zahm, J.-M., Tournier, J.-M., and Coraux, C. (2006). Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* *3*, 726–733.
- (217) Qi, X., Schmiege, P., Coutavas, E., Wang, J., and Li, X. (2018). Structures of human Patched and its complex with native palmitoylated sonic hedgehog. *Nature* *560*, 128–132.
- (218) Rabe, K.F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P.J., Buist, S.A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C., et al. (2007). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *176*, 532–555.
- (219) Rackley, C.R., and Stripp, B.R. (2012). Building and maintaining the epithelium of the lung. *J. Clin. Invest.* *122*, 2724–2730.
- (220) Rafii, S., Butler, J.M., and Ding, B.-S. (2016). Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* *529*, 316–325.
- (221) Ragland, M.F., Benway, C.J., Lutz, S.M., Bowler, R.P., Hecker, J., Hokanson, J.E., Crapo, J.D., Castaldi, P.J., DeMeo, D.L., Hersh, C.P., et al. (2019). Genetic Advances in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Insights from COPDGene. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *200*, 677–690.
- (222) Raherison, C., Biron, E., Nocent-Ejnaini, C., Taillé, C., Tillie-Leblond, I., and Prudhomme, A. (2010). [Are there specific characteristics of COPD in women?]. *Rev. Mal. Respir.* *27*, 611–624.
- (223) Rahman, I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* *1*, 291–315.
- (224) Ramaswamy, A., and Puchalski, J. (2018). Bronchoscopic lung volume reduction: recent updates. *J. Thorac. Dis.* *10*, 2519–2527.
- (225) Rannels, S.R., and Rannels, D.E. (1989). The type II pneumocyte as a model of lung cell interaction with the extracellular matrix. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *21 Suppl 1*, 151–159.
- (226) Ratjen, F., Bell, S.C., Rowe, S.M., Goss, C.H., Quittner, A.L., and Bush, A. (2015). Cystic fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15010.
- (227) Regl, G., Kasper, M., Schnidar, H., Eichberger, T., Neill, G.W., Philpott, M.P., Esterbauer, H., Hauser-Kronberger, C., Frischauf, A.-M., and Aberger, F. (2004). Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res.* *64*, 7724–7731.
- (228) Reynolds, S.D., and Malkinson, A.M. (2010). Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 1–4.
- (229) Ribes, V., and Briscoe, J. (2009). Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a002014.

- (230) Ricard-Blum, S., and Salza, R. (2014). Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.* *23*, 457–463.
- (231) Ridley, C., and Thornton, D.J. (2018). Mucins: the frontline defence of the lung. *Biochem. Soc. Trans.* *46*, 1099–1106.
- (232) Rivera, R.M., Cosio, M.G., Ghezzi, H., Salazar, M., and Pérez-Padilla, R. (2008). Comparison of lung morphology in COPD secondary to cigarette and biomass smoke. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *12*, 972–977.
- (233) Rocha, V., Soares, S., Stringhini, S., and Fraga, S. (2019). Socioeconomic circumstances and respiratory function from childhood to early adulthood: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* *9*, e027528.
- (234) Roche, N., Housset, B., and Huchon, G. (2008). [Should we screen for COPD in the population]. *Rev. Mal. Respir.* *25*, 787–790.
- (235) Roche, N., Chavannes, N.H., and Miravittles, M. (2013). COPD symptoms in the morning: impact, evaluation and management. *Respir. Res.* *14*, 112.
- (236) Rock, J.R., Randell, S.H., and Hogan, B.L.M. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis. Model. Mech.* *3*, 545–556.
- (237) Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C., and Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* *14*, 357–360.
- (238) Rose, M.C., and Voynow, J.A. (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* *86*, 245–278.
- (239) Rosenberg, S.R., Kalhan, R., and Mannino, D.M. (2015). Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Morbidity, Mortality, and Risk Factors. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *36*, 457–469.
- (240) Ruiz García, S., Deprez, M., Lebrigand, K., Cavard, A., Paquet, A., Arguel, M.-J., Magnone, V., Truchi, M., Caballero, I., Leroy, S., et al. (2019). Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Dev. Camb. Engl.* *146*.
- (241) Russell, R.E.K., Culpitt, S.V., DeMatos, C., Donnelly, L., Smith, M., Wiggins, J., and Barnes, P.J. (2002). Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *26*, 602–609.
- (242) Sacedón, R., Díez, B., Nuñez, V., Hernández-López, C., Gutierrez-Frías, C., Cejalvo, T., Outram, S.V., Crompton, T., Zapata, A.G., Vicente, A., et al. (2005). Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1456–1461.

- (243) Safka, K.A., Wald, J., Wang, H., McIvor, L., and McIvor, A. (2016). GOLD Stage and Treatment in COPD: A 500 Patient Point Prevalence Study. *Chronic Obstr. Pulm. Dis. Miami Fla* 4, 45–55.
- (244) Sanial, M., Bécam, I., Hofmann, L., Behague, J., Argüelles, C., Gourhand, V., Bruzzone, L., Holmgren, R.A., and Plessis, A. (2017). Dose-dependent transduction of Hedgehog relies on phosphorylation-based feedback between the G-protein-coupled receptor Smoothed and the kinase Fused. *Dev. Camb. Engl.* 144, 1841–1850.
- (245) Savran, O., and Ulrik, C.S. (2018). Early life insults as determinants of chronic obstructive pulmonary disease in adult life. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 13, 683–693.
- (246) Scales, S.J., and de Sauvage, F.J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 303–312.
- (247) Schauer, G.L., Wheaton, A.G., Malarcher, A.M., and Croft, J.B. (2016). Health-care Provider Screening and Advice for Smoking Cessation Among Smokers With and Without COPD: 2009-2010 National Adult Tobacco Survey. *Chest* 149, 676–684.
- (248) Schittny, J.C. (2017). Development of the lung. *Cell Tissue Res.* 367, 427–444.
- (249) Scott, M., Vallania, F., and Khatri, P. (2017). META-ANALYSIS OF CONTINUOUS PHENOTYPES IDENTIFIES A GENE SIGNATURE THAT CORRELATES WITH COPD DISEASE STATUS. *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.* 22, 266–275.
- (250) Sekiya, T., Adachi, S., Kohu, K., Yamada, T., Higuchi, O., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Nakamura, T., Tashiro, K., Kuhara, S., et al. (2004). Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J. Biol. Chem.* 279, 6840–6846.
- (251) Senoo, M., Pinto, F., Crum, C.P., and McKeon, F. (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 129, 523–536.
- (252) Şerifoğlu, İ., and Ulubay, G. (2019). The methods other than spirometry in the early diagnosis of COPD. *Tuberk. Ve Toraks* 67, 63–70.
- (253) Shah, A.S., Ben-Shahar, Y., Moninger, T.O., Kline, J.N., and Welsh, M.J. (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325, 1131–1134.
- (254) Shannon, J.M., and Hyatt, B.A. (2004). Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 625–645.
- (255) Sharghi-Namini, S., Turmaine, M., Meier, C., Sahni, V., Umehara, F., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2006). The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 6364–6376.

- (256) Shi, W., Chen, F., and Cardoso, W.V. (2009). Mechanisms of lung development: contribution to adult lung disease and relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 558–563.
- (257) Shijubo, N., Kawabata, I., Sato, N., and Itoh, Y. (2003). Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/ uteroglobin (secretoglobin 1A1). *Curr. Pharm. Des.* 9, 1139–1149.
- (258) Shin, K., Lee, J., Guo, N., Kim, J., Lim, A., Qu, L., Mysorekar, I.U., and Beachy, P.A. (2011). Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* 472, 110–114.
- (259) Siddiqui, F.M., and Diamond, J.M. (2018). Lung transplantation for chronic obstructive pulmonary disease: past, present, and future directions. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 24, 199–204.
- (260) Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., and Serman, L. (2018). The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 18, 8–20.
- (261) Slebos, D.-J., Hartman, J.E., Klooster, K., Blaas, S., Deslee, G., Gesierich, W., Hetzel, J., Hetzel, M., McNulty, W., Kemp, S.V., et al. (2015). Bronchoscopic Coil Treatment for Patients with Severe Emphysema: A Meta-Analysis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 90, 136–145.
- (262) Slebos, D.-J., Shah, P.L., Herth, F.J.F., and Valipour, A. (2017). Endobronchial Valves for Endoscopic Lung Volume Reduction: Best Practice Recommendations from Expert Panel on Endoscopic Lung Volume Reduction. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 93, 138–150.
- (263) Slebos, D.-J., Degano, B., Valipour, A., Shah, P.L., Deslée, G., Sciruba, F.C., and AIRFLOW-3 Trial Study Group (2020). Design for a multicenter, randomized, sham-controlled study to evaluate safety and efficacy after treatment with the NuVaira® lung denervation system in subjects with chronic obstructive pulmonary disease (AIRFLOW-3). *BMC Pulm. Med.* 20, 41.
- (264) Snyder, J.C., Reynolds, S.D., Hollingsworth, J.W., Li, Z., Kaminski, N., and Stripp, B.R. (2010). Clara cells attenuate the inflammatory response through regulation of macrophage behavior. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 161–171.
- (265) Song, H., Yao, E., Lin, C., Gacayan, R., Chen, M.-H., and Chuang, P.-T. (2012). Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17531–17536.
- (266) Song, R., Walentek, P., Sponer, N., Klimke, A., Lee, J.S., Dixon, G., Harland, R., Wan, Y., Lishko, P., Lize, M., et al. (2014). miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* 510, 115–120.
- (267) Spassky, N., and Meunier, A. (2017). The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 423–436.
- (268) SPLF. Société de Pneumologie de Langue Française (2003). [Guidelines for the clinical management of COPD. Bronchodilators]. *Rev. Mal. Respir.* 20, S32-35.

- (269) Sriram, K.B., Cox, A.J., Clancy, R.L., Slack, M.P.E., and Cripps, A.W. (2018). Nontypeable *Haemophilus influenzae* and chronic obstructive pulmonary disease: a review for clinicians. *Crit. Rev. Microbiol.* *44*, 125–142.
- (270) Stewart, D.P., Marada, S., Bodeen, W.J., Truong, A., Sakurada, S.M., Pandit, T., Pruett-Miller, S.M., and Ogden, S.K. (2018). Cleavage activates dispatched for Sonic Hedgehog ligand release. *ELife* *7*.
- (271) Stewart, G.A., Hoyne, G.F., Ahmad, S.A., Jarman, E., Wallace, W.A.H., Harrison, D.J., Haslett, C., Lamb, J.R., and Howie, S.E.M. (2003). Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J. Pathol.* *199*, 488–495.
- (272) Stoller, J.K., Panos, R.J., Krachman, S., Doherty, D.E., Make, B., and Long-term Oxygen Treatment Trial Research Group (2010). Oxygen therapy for patients with COPD: current evidence and the long-term oxygen treatment trial. *Chest* *138*, 179–187.
- (273) Sturgill, B.C., Bolton, W.K., and Griffith, K.M. (1985). Congo red-negative amyloidosis-like glomerulopathy. *Hum. Pathol.* *16*, 220–224.
- (274) Sui, P., Wiesner, D.L., Xu, J., Zhang, Y., Lee, J., Van Dyken, S., Lashua, A., Yu, C., Klein, B.S., Locksley, R.M., et al. (2018). Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science* *360*.
- (275) Sutto, Z., Conner, G.E., and Salathe, M. (2004). Regulation of human airway ciliary beat frequency by intracellular pH. *J. Physiol.* *560*, 519–532.
- (276) Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., et al. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev.* *14*, 1741–1749.
- (277) Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* *418*, 892–897.
- (278) Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P., and Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* *8*, 613–628.
- (279) Terré, B., Piergiovanni, G., Segura-Bayona, S., Gil-Gómez, G., Youssef, S.A., Attolini, C.S.-O., Wilsch-Bräuninger, M., Jung, C., Rojas, A.M., Marjanović, M., et al. (2016). GEMC1 is a critical regulator of multiciliated cell differentiation. *EMBO J.* *35*, 942–960.
- (280) Thorley, A.J., and Tetley, T.D. (2007). Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *2*, 409–428.
- (281) Tian, H., Jeong, J., Harfe, B.D., Tabin, C.J., and McMahon, A.P. (2005). Mouse *Disp1* is required in sonic hedgehog-expressing cells for paracrine activity of the cholesterol-modified ligand. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 133–142.
- (282) Tilley, A.E., Harvey, B.-G., Heguy, A., Hackett, N.R., Wang, R., O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2009). Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium in

- association with smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *179*, 457–466.
- (283) Torres, S., Merino, C., Paton, B., Correig, X., and Ramírez, N. (2018). Biomarkers of Exposure to Secondhand and Thirdhand Tobacco Smoke: Recent Advances and Future Perspectives. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *15*.
- (284) Tsao, P.-N., Vasconcelos, M., Izvolsky, K.I., Qian, J., Lu, J., and Cardoso, W.V. (2009). Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 2297–2307.
- (285) Tukachinsky, H., Kuzmickas, R.P., Jao, C.Y., Liu, J., and Salic, A. (2012). Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Rep.* *2*, 308–320.
- (286) Valipour, A., Asadi, S., Pison, C., Jondot, M., Kessler, R., Benneddif, K., Deslee, G., Verdier, M., Slebos, D.-J., and Mayse, M. (2018). Long-term safety of bilateral targeted lung denervation in patients with COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *13*, 2163–2172.
- (287) Valipour, A., Shah, P.L., Pison, C., Ninane, V., Janssens, W., Perez, T., Kessler, R., Deslee, G., Garner, J., Abele, C., et al. (2019). Safety and Dose Study of Targeted Lung Denervation in Moderate/Severe COPD Patients. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* *98*, 329–339.
- (288) Valverde, L. de F., Pereira, T. de A., Dias, R.B., Guimarães, V.S.N., Ramos, E.A.G., Santos, J.N., and Gurgel Rocha, C.A. (2016). Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 9233–9241.
- (289) Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2013). Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers* *1*, e25247.
- (290) Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 157–165.
- (291) Vanfleteren, L., Fabbri, L.M., Papi, A., Petruzzelli, S., and Celli, B. (2018). Triple therapy (ICS/LABA/LAMA) in COPD: time for a reappraisal. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *13*, 3971–3981.
- (292) Varkey, A.B. (2004). Chronic obstructive pulmonary disease in women: exploring gender differences. *Curr. Opin. Pulm. Med.* *10*, 98–103.
- (293) Vladar, E.K., Nayak, J.V., Milla, C.E., and Axelrod, J.D. (2016). Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation. *JCI Insight* *1*.
- (294) Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martínez, F.J., Anzueto, A., Barnes, P.J., Bourbeau, J., Celli, B.R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L.M., et al. (2017a). Erratum to “Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary” [*Arch Bronconeumol.* 2017;53:128-49]. *Arch. Bronconeumol.* *53*, 411–412.

- (295) Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martínez, F.J., Anzueto, A., Barnes, P.J., Bourbeau, J., Celli, B.R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L.M., et al. (2017b). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Arch. Bronconeumol.* 53, 128–149.
- (296) Voynow, J.A., and Rubin, B.K. (2009). Mucins, Mucus, and Sputum. *Chest* 135, 505–512.
- (297) Wallace, A.M., Loy, L.B., Abboud, R.T., D’Armiento, J.M., Coxson, H.O., Muller, N.L., Kalloger, S., Li, X., Mark Elliott, W., English, J.C., et al. (2014). Expression of matrix metalloproteinase-1 in alveolar macrophages, type II pneumocytes, and airways in smokers: relationship to lung function and emphysema. *Lung* 192, 467–472.
- (298) Wang, Y., and Price, M.A. (2008). A unique protection signal in *Cubitus interruptus* prevents its complete proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5555–5568.
- (299) Wang, C., de Mochel, N.S.R., Christenson, S.A., Cassandras, M., Moon, R., Brumwell, A.N., Byrnes, L.E., Li, A., Yokosaki, Y., Shan, P., et al. (2018). Expansion of hedgehog disrupts mesenchymal identity and induces emphysema phenotype. *J. Clin. Invest.* 128, 4343–4358.
- (300) Wang, X., Xu, C., Ji, J., Cai, Y., Shu, Y., Chao, Y., Wu, X., Zou, C., Wu, X., and Tang, L. (2020). IL-4/IL-13 upregulates Sonic hedgehog expression to induce allergic airway epithelial remodeling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 318, L888–L899.
- (301) Wang, X.-Z., Zhang, H.-H., Qian, Y.-L., and Tang, L.-F. (2019). Sonic hedgehog (Shh) and CC chemokine ligand 2 signaling pathways in asthma. *J. Chin. Med. Assoc. JCMA* 82, 343–350.
- (302) Wang, Y., Zhou, Z., Walsh, C.T., and McMahon, A.P. (2009). Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2623–2628.
- (303) Wells, J.M., Gaggari, A., and Blalock, J.E. (2015). MMP generated matrikines. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 44–46, 122–129.
- (304) Welte, T., Vogelmeier, C., and Papi, A. (2015). COPD: early diagnosis and treatment to slow disease progression. *Int. J. Clin. Pract.* 69, 336–349.
- (305) White, E.S. (2015). Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12 Suppl 1, S30–33.
- (306) Whitsett, J.A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 15, S143–S148.
- (307) Whitsett, J.A., and Weaver, T.E. (2015). Alveolar development and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53, 1–7.
- (308) Wickström, C., Davies, J.R., Eriksen, G.V., Veerman, E.C., and Carlstedt, I. (1998). MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem. J.* 334 (Pt 3), 685–693.

- (309) Widdicombe, J.H., and Wine, J.J. (2015). Airway Gland Structure and Function. *Physiol. Rev.* 95, 1241–1319.
- (310) Wieschaus, E., and Nüsslein-Volhard, C. (2016). The Heidelberg Screen for Pattern Mutants of *Drosophila*: A Personal Account. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 1–46.
- (311) Wittekindt, O.H. (2017). Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflugers Arch.* 469, 135–147.
- (312) Woik, N., and Kroll, J. (2015). Regulation of lung development and regeneration by the vascular system. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 2709–2718.
- (313) Wort, S.J., Ito, M., Chou, P.-C., Mc Master, S.K., Badiger, R., Jazrawi, E., de Souza, P., Evans, T.W., Mitchell, J.A., Pinhu, L., et al. (2009). Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites. *J. Biol. Chem.* 284, 24297–24305.
- (314) Wyatt, T.A. (2015). Cyclic GMP and Cilia Motility. *Cells* 4, 315–330.
- (315) Xiao, C., Ogle, S.A., Schumacher, M.A., Schilling, N., Tokhunts, R.A., Orr-Asman, M.A., Miller, M.L., Robbins, D.J., Hollande, F., and Zavros, Y. (2010). Hedgehog signaling regulates E-cadherin expression for the maintenance of the actin cytoskeleton and tight junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G1252-1265. **X**
- (316) Xu, C., Zou, C., Hussain, M., Shi, W., Shao, Y., Jiang, Z., Wu, X., Lu, M., Wu, J., Xie, Q., et al. (2018). High expression of Sonic hedgehog in allergic airway epithelia contributes to goblet cell metaplasia. *Mucosal Immunol.* 11, 1306–1315.
- (317) Xu, J., Shang, Y., Cai, F., Zhang, S., Xiao, Z., Wang, H., Fan, Y., Li, T., Sheng, S., Fu, Y., et al. (2019). Correlation between lung cancer and the HHIP polymorphisms of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the Chinese Han population. *Genes Immun.* 20, 273–280.
- (318) Yaghi, A., and Dolovich, M.B. (2016). Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells* 5. **Y**
- (319) Yamasaki, K., and Eeden, S.F. van (2018). Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- (320) Yang, Y., and Niswander, L. (1995). Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80, 939–947.
- (321) Yang, J., Hernandez, B.J., Martinez Alanis, D., Narvaez del Pilar, O., Vila-Ellis, L., Akiyama, H., Evans, S.E., Ostrin, E.J., and Chen, J. (2016). The development and plasticity of alveolar type 1 cells. *Dev. Camb. Engl.* 143, 54–65.
- (322) Yang, J., Wang, Y., Liu, H., Bi, J., and Lu, Y. (2017). C2-ceramide influences alveolar epithelial barrier function by downregulating Zo-1, occludin and claudin-4 expression. *Toxicol. Mech. Methods* 27, 293–297.

- (323) Young, A.L., Bragman, F.J.S., Rangelov, B., Han, M.K., Galbán, C.J., Lynch, D.A., Hawkes, D.J., Alexander, D.C., Hurst, J.R., and COPDGene Investigators (2020). Disease Progression Modeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201, 294–302.
- (324) Zeng, X., and Ju, D. (2018). Hedgehog Signaling Pathway and Autophagy in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- (325) Zhang, M., Wang, H., Teng, H., Shi, J., and Zhang, Y. (2010). Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung. *Histochem. Cell Biol.* 134, 327–335.
- (326) Zhang, X., Tian, Y., Yang, Y., and Hao, J. (2017). Development of anticancer agents targeting the Hedgehog signaling. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2773–2782.
- (327) Zhou, X., Baron, R.M., Hardin, M., Cho, M.H., Zielinski, J., Hawrylkiewicz, I., Sliwinski, P., Hersh, C.P., Mancini, J.D., Lu, K., et al. (2012). Identification of a chronic obstructive pulmonary disease genetic determinant that regulates HHIP. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1325–1335.
- (328) Zuo, W., Zhang, T., Wu, D.Z., Guan, S.P., Liew, A.-A., Yamamoto, Y., Wang, X., Lim, S.J., Vincent, M., Lessard, M., et al. (2015). p63(+)Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature* 517, 616–620.
- (329) Zuo, W.-L., Yang, J., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Rostami, M., Mezey, J.G., O’Beirne, S.L., Kaner, R.J., and Crystal, R.G. (2019). Exaggerated BMP4 signalling alters human airway basal progenitor cell differentiation to cigarette smoking-related phenotypes. *Eur. Respir. J.* 53.
- (330) Zysman, M., Chabot, F., Devillier, P., Housset, B., Morelot-Panzini, C., Roche, N., and Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) (2016). Pharmacological treatment optimization for stable chronic obstructive pulmonary disease. Proposals from the Société de Pneumologie de Langue Française. *Rev. Mal. Respir.* 33, 911–936.

CARACTERISATION DE LA VOIE HEDGEHOG DANS LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM DES VOIES AERIENNES ET ALTERATION DANS LA BPCO

La voie Hedgehog (HH) est une voie de signalisation cruciale pour l'organogenèse et l'homéostasie. Etant donnée son implication dans la quiescence et la réparation pulmonaire ainsi que son altération dans des maladies respiratoires chroniques, nous avons exploré la présence et l'impact de la voie HH durant la différenciation de l'épithélium des voies aériennes et son incidence sur la genèse du remodelage épithélial caractéristique de la BPCO.

Nous avons mis en évidence une corrélation entre l'expression des acteurs de la voie HH et la différenciation in vitro ainsi qu'une sécrétion du ligand principal de la voie, Sonic Hedgehog (Shh), par les cellules basales. In vitro, l'inhibition de la voie induit un remodelage caractéristique de la BPCO dont une réduction des cellules ciliées. Une altération de la signalisation HH chez les patients BPCO a été observée, particulièrement concernant l'expression et la localisation du facteur de transcription Gli2. Enfin, par une étude translationnelle, nous avons démontré la possibilité d'évaluer l'expression de la voie HH en routine clinique. Les données recueillies ont confirmé l'altération de la voie HH chez les patients BPCO en lien avec l'expression transcriptomique et protéomique de Gli2 associée à une baisse de la sécrétion du ligand Shh.

Cette étude montre l'importance de la voie HH dans la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et identifie pour la première fois une altération de cette voie chez les patients BPCO. La compréhension des mécanismes moléculaires associés à la pathogenèse en lien avec la voie HH ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette pathologie sans traitement.

Mots clés : Voie Hedgehog, Plasticité épithéliale, Poumon, Bronchopneumopathie Chronique Obstructive, Différenciation.

HEDGEHOG PATHWAY CHARACTERIZATION IN AIRWAY EPITHELIAL CELL DIFFERENTIATION AND ALTERATION IN COPD

Hedgehog (HH) pathway is crucial for organogenesis and homeostasis. Since HH signaling is involved in pulmonary quiescence and repair, and altered in chronic lung diseases, we investigated HH signalling during airway epithelial cell differentiation and its incidence on Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)-associated remodeling.

In vitro we demonstrated a correlation between HH pathway actors expression and differentiation. We identified basal cells as the source of the main pathway ligand, Sonic Hedgehog (Shh). Preventing the ligand-induced HH activation led to the establishment of a remodeled epithelium with reduced cilliogenesis. We also observed HH signalling alteration in COPD patient, especially a loss of Gli2 transcription factor expression and localization. Finally, we revealed the possibility to evaluate HH expression in clinical routine. Our collected data confirm HH pathway alteration in COPD patients in correlation with Gli2 transcriptomic and proteomic expression associated with a decrease of Shh ligand secretion.

This study highlights the importance of the HH pathway in airway epithelial cell differentiation and identifies for the first time an alteration of this pathway in COPD patient. Understanding the molecular mechanisms associated with HH pathway in pathogenesis would open the way to new therapeutic strategies in this disease without available treatments.

Keywords: Hedgehog Pathway, Epithelial Cell Plasticity, Lung, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Differentiation.

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

Unité Inserm UMR-S 1250

Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire (P3Cell)

45 rue Cognacq-Jay, CHU Maison-Blanche,
51092 Reims Cedex