



HAL
open science

Implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité alpha5 des récepteurs nicotiques dans l'homéostasie pulmonaire et la bronchopneumopathie chronique obstructive

Zania Diabasana

► **To cite this version:**

Zania Diabasana. Implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité alpha5 des récepteurs nicotiques dans l'homéostasie pulmonaire et la bronchopneumopathie chronique obstructive. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Reims Champagne Ardenne, 2021. Français. NNT: . tel-03367469

HAL Id: tel-03367469

<https://hal.univ-reims.fr/tel-03367469v1>

Submitted on 6 Oct 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

Zania DIABASANA

Le 29 juin 2021

Implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques dans l'homéostasie pulmonaire et la bronchopneumopathie chronique obstructive

Thèse dirigée par le **Professeur Gaëtan Deslée et le Docteur Valérian Dormoy, 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-directeur
Mme Céline MASCAUX,	Professeur,	Université de Strasbourg, France	Rapporteur
M. Charles PILETTE,	Professeur,	Université de Louvain, Belgique	Rapporteur
M. Richard LE NAOUR,	Professeur,	Université de Reims, France,	Examineur
M. Philippe GOSSET,	Chargé de Recherche HDR,	Université de Lille, France	Examineur



Na mama na ngai,

Remerciements

J'aimerais commencer par remercier le Professeur Myriam Polette, directrice de l'unité Inserm UMR-S 1250, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant mes années de thèse.

Je suis très reconnaissante à l'égard du Professeur Céline Mascaux de l'université de Strasbourg et du Professeur Charles Pilette de l'université de Louvain pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Mes remerciements vont également au Professeur Richard Le Naour de l'université de Reims et au docteur Philippe Gosset de l'université de Lille pour leur participation à ma soutenance de thèse en tant qu'examineurs.

Un grand merci à mon directeur de thèse le Professeur Gaëtan Deslée sans qui ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Merci d'avoir été présent et impliqué dans ce projet de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon co-directeur de thèse Valérian Dormoy sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci pour ton encadrement sans reproche, tes nombreux conseils et ta présence durant ma thèse. Travailler sous ta directive a été une agréable expérience, tu as su me mettre à l'aise dès mon arrivée dans ton équipe par ta gentillesse, ta bonne humeur et ton enthousiasme. Tu m'as accordé ta confiance et réussi à me transmettre la rigueur scientifique. Tu es une belle personne et je n'aurais sincèrement pas pu rêver mieux comme encadrant. Merci infiniment !

Un énorme merci au Docteur Jeanne-Marie Perotin pour son aide précieuse dans le recueil des données cliniques de patients et les analyses statistiques. Je remercie également les Docteurs Julien Ancel et Pauline Mulette de m'avoir permis d'avoir accès aux fibroscopies et pour leur aide clinique.

Je souhaite également remercier tous les autres membres de l'unité Inserm U1250 avec qui j'ai eu la chance de travailler et de partager mon quotidien pendant mes années de thèse.

Un remerciement spécial au futur docteur Antony Hoarau, sans qui ces trois années de thèse n'auraient pas été aussi plaisantes et amusantes. Ta présence a été très importante pour moi notamment lorsque j'étais découragée. Tu as été à l'écoute et m'as conseillée à maintes reprises et pour ça je te remercie profondément. Nos discussions vont réellement me manquer !

Mes remerciements vont également à Randa Belgacemi et Théophile Ponchel avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à échanger. Merci pour votre aide et votre gentillesse. Je remercie également Elodie Serbine et Jordan Da Silva pour leurs nombreux conseils.

Il m'est impossible d'oublier le Docteur Arnaud Bonnomet pour son aide au quotidien et ses blagues bêtes qui, je dois bien l'avouer, vont un peu me manquer. Je tiens à exprimer ma gratitude aux Docteurs Béatrice Nawrocki-Raby, Christelle Coraux, Véronique Dalstein, Emilie Luczka, Audrey Brisebarre et Céline Charlier pour leurs conseils avisés et leur aide scientifique. Je remercie Adeline Germain et Nathalie Lalun pour leurs enseignements aux techniques expérimentales, toujours avec patience et bienveillance. Mes remerciements vont

également à Claire Kileztky et Alexandre Abreder pour leur aide et leur disponibilité. Merci à Annie Chaveriat pour son aide précieuse dans la gestion administrative et sa sympathie.

Cette thèse a été l'occasion pour moi d'encadrer trois stagiaires de licences. Je remercie Joffrey Mary, Julien Vion et Marianne Lemée pour leur implication et le travail qu'ils ont fourni.

Pour terminer, je tiens à remercier sincèrement les personnes qui me sont chères et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Un immense merci à ma maman qui a été mon pilier et ma force tout au long de ma thèse. Tu sais à quel point ces dernières années ont été très difficiles et éprouvantes mais tu as toujours su trouver les mots pour me redonner le sourire, la force et le courage de continuer et pour ça je ne te remercierai jamais assez. Merci à ma soeur Amandine d'avoir été à mes côtés, de m'avoir soutenue et d'avoir répondu présente lorsque j'en avais le plus besoin. On est ensemble deh ! Nalingi bino ! Merci à tonton Jean-Baptiste, Papa Augustin et Fatou d'avoir également cru en moi et de m'avoir encouragée à continuer mes études. Découragement n'est pas ivoirien ! Encore merci à toute ma famille pour votre présence et votre soutien. J'espère vous avoir rendus fier. Nzambe monene !

RESUME

Implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques dans l'homéostasie pulmonaire et la bronchopneumopathie chronique obstructive

Des études d'associations pangénomiques ont permis d'associer le variant rs16969968 (SNP $\alpha 5$) de la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) au comportement tabagique, à la diminution de la fonction respiratoire et l'incidence de la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). Nous avons ainsi proposé d'établir un lien entre ce polymorphisme et les événements biologiques pulmonaires caractéristiques de la BPCO. Par ailleurs, en absence d'une cartographie complète, nous avons étudié l'expression transcriptomique et protéomique des nAChRs dans le poumon.

Nous avons mis en évidence une expression transcriptomique différentielle des sous-unités en fonction des compartiments pulmonaires et du statut tabagique, en plus d'avoir confirmé l'expression protéique de la plupart des sous-unités dans l'épithélium bronchique. *In vitro* et *ex vivo*, rs16969968 est associé à un retard de ciliogenèse dans un contexte non-pathologique ainsi qu'à une diminution de la réponse inflammatoire en début de différenciation cellulaire. Des études génotypiques ont mis en évidence que ce SNP $\alpha 5$ est plus exprimé chez les patients atteints de la BPCO et qu'il est associé à une diminution de la fonction respiratoire et l'augmentation de l'emphysème indépendamment de la pathologie sans pour autant sembler influencer le remodelage épithélial bronchique.

Cette étude pionnière a proposé un atlas complet des nAChRs dans les voies aériennes ainsi qu'une explication biologique quant à l'effet du polymorphisme rs16969968 sur les altérations de l'épithélium respiratoire chez l'Homme.

Mots-clés : Poumon – Récepteurs nicotiques – Polymorphisme génétique – BPCO – Cellules épithéliales

ABSTRACT

Role of polymorphism rs16969968 of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 5$ subunit in lung homeostasis and chronic obstructive pulmonary disease

Genome-Wide Association Studies (GWAS) associated *CHRNA5* polymorphism rs16969968 (SNP $\alpha 5$) coding $\alpha 5$ nAChR subunit with smoking behavior, decreased respiratory function, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) onset. We proposed to establish the relationship between SNP $\alpha 5$ and lung biological events characteristic of COPD. Furthermore, nAChRs have been detected in human airways to fill the knowledge gap with a complete lung cartography. We studied their transcriptomic and proteomic profiles in the lung.

We demonstrated a differential transcriptomic expression of all subunits depending on the lung compartment and the smoking status, in addition to confirming protein expression of the majority of nAChR subunits in the bronchial epithelium. *In vitro* and *ex vivo*, rs16969968 altered ciliogenesis in a non-pathological context and deregulated inflammatory response in early epithelial cell differentiation. Genotyping studies revealed that rs16969968 is more found in COPD patients and correlated with respiratory function impairment and lung emphysema independently of the pathology. Nonetheless, the polymorphism did not influence the bronchial epithelial morphohistology in COPD patients.

This pioneering study provided a complete atlas of nAChRs in human airways and cellular and molecular clues to decipher polymorphism rs16969968-associated impairments in the respiratory epithelium of the human lung.

Keywords: Lung – Nicotinic receptors – Genetic polymorphism – COPD – Epithelial cells

TABLE DES MATIERES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	12
ABREVIATIONS.....	15
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES TABLEAUX	21
INTRODUCTION.....	22
Chapitre I : Le poumon	23
1. L'appareil respiratoire	23
2. Le poumon	24
2.1 Développement pulmonaire.....	25
2.2 Voies de signalisation.....	27
3. Les populations cellulaires exprimées dans le poumon	28
3.1 Tissu épithélial des voies aériennes.....	29
3.1.1 Cellules épithéliales.....	30
3.1.2 Systèmes de défense de l'épithélium	37
3.2 Tissus non-épithéliaux des voies aériennes.....	41
3.2.1 Identité des cellules immunitaires	41
3.2.2 Recrutement des cellules immunitaires.....	48
Chapitre II : Le système cholinergique de l'appareil respiratoire	52
1. Le système cholinergique neuronal	52
2. Le système cholinergique non-neuronal.....	53
2.1 Synthèse et libération de l'acétylcholine	53
2.2 Fonction de l'acétylcholine dans les voies aériennes	55
3. Les récepteurs à l'acétylcholine	56
3.1 Les récepteurs muscariniques métabotropiques	56
3.2 Les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine.....	57
3.2.1 Structure des récepteurs nicotiniques	57
3.2.2 Diversité des récepteurs nicotiniques.....	59

3.2.3	Activation et désensibilisation des récepteurs nicotiques	60
3.2.4	Agonistes et antagonistes des récepteurs nicotiques	61
3.2.5	Fonctions pulmonaires des récepteurs nicotiques	63
4.	Polymorphismes des nAChRs	66
4.1	Généralités	66
4.2	Les polymorphismes nucléotidiques des nAChRs	66
	Chapitre III : La bronchopneumopathie chronique obstructive.....	68
1.	Définition.....	68
2.	Epidémiologie	68
3.	Symptômes, diagnostic et classifications	69
3.1	Symptômes	69
3.2	Diagnostic	70
3.2.1	Spirométrie, plethysmographie, épreuve d'exercice	70
3.2.2	Radiographie	71
3.2.3	Examens biologiques.....	71
3.3	Classification GOLD	71
4.	Facteurs de risque	72
4.1	Facteurs environnementaux	72
4.1.1	La fumée de cigarettes.....	72
4.1.2	Pollution de l'air ambiant.....	74
4.2	Facteurs génétiques	74
5.	Physiopathologie.....	75
5.1	Mise en place et maintien de l'inflammation	76
5.1.1	Initiation de l'inflammation par les cellules épithéliales	76
5.1.2	Initiation de l'inflammation par les cellules du système immunitaire	77
5.2	Stress oxydatif	79
5.3	Remodelage des voies aériennes	80
5.3.1	Destruction des jonctions cellulaires.....	80

5.3.2 Altération de la régénération épithéliale	80
6. Traitements	81
6.1 Réhabilitation respiratoire	81
6.1.1 Evaluation physique	82
6.1.2 Entraînement physique	83
6.2 Traitements pharmacologiques	84
6.2.1 Bronchodilatateurs	84
6.2.2 Corticostéroïdes inhalés	84
6.2.3 Combinaisons LABA/LAMA/CSI	84
7. Rôle des polymorphismes CHRNA3/A5 dans la BPCO	86
OBJECTIFS DE THESE	89
MATÉRIELS & MÉTHODES	91
1. Echantillons biologiques et données cliniques	92
1.1 Fibroscopies	92
1.1.1 Recrutement	92
1.1.2 Isolation des cellules épithéliales	94
1.2 Polypes nasaux	95
1.3 Résections pulmonaires	96
2. Culture cellulaire primaire	96
2.1 Différenciation de l'épithélium	96
2.2 Résistance transépithéliale	97
3. Analyses génomiques	97
3.1 Extraction d'ADN	97
3.1.1 Culots cellulaires	97
3.1.2 Tissus FFPE	98
3.2 Génotypage	98
3.2.1 Amplification par PCR	98
3.2.2 Digestion enzymatique	99

3.2.3 Migration sur gel d'agarose.....	99
4. Analyses transcriptomiques	100
4.1 Hybridation <i>in situ</i>	100
4.2 RT-qPCR.....	101
4.2.1 Extraction des ARNs.....	101
4.2.2 Transcription inverse.....	102
4.2.3 Polymérisation en chaîne quantitative.....	102
4.2.4 Analyse des données	103
5. Immunomarquage et analyses par microscopie	104
5.1 Coupes FFPE (IF).....	104
5.2 Membranes d'inserts (WMIF).....	105
5.3 Analyses par microscopie.....	106
5.3.1 Analyse des coupes FFPE	106
5.3.2 Analyse des immunomarquages sur membranes d'inserts.....	107
6. Analyses protéomiques	107
7. Analyse de données.....	108
7.1 Données en RNA-sequencing.....	108
7.2 Single cell sequencing	109
8. Statistiques	109
RÉSULTATS	110
1. Atlas des sous-unités des nAChRs dans les voies aériennes pulmonaires chez l'Homme	111
1.1 Publication.....	111
1.2 Résumé	112
2. Le polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs altère la différenciation cellulaire dans l'épithélium respiratoire	137
2.1 Publication.....	137
2.2 Résumé	138
3. Rôle du SNP $\alpha 5$ dans la BPCO.....	165

3.1 Le gène <i>CHRNA5</i> est exprimé dans l'épithélium bronchique de patients non-BPCO et BPCO.....	165
3.2 Répartition de l'expression du SNP α 5 dans les voies aériennes de patients non-BPCO et BPCO.....	166
3.3 Association du SNP α 5 avec les données cliniques des patients non-BPCO et BPCO.	167
3.4 L'expression du SNP α 5 n'a pas d'effet sur le remodelage de l'épithélium respiratoire des patients BPCO	172
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....	175
1. Synthèse des travaux et discussion	176
1.1 Cartographie des sous-unités des nAChRs	176
1.2 Exploration du rôle de rs16969968 dans les remodelages épithéliaux.....	178
2. Perspectives expérimentales	180
3. Conclusion.....	182
BIBLIOGRAPHIE	183

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques

Chr15q25 genetic variant (rs16969968) alters cell differentiation in respiratory epithelia

Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Claire Launois, Gonzague Delepine, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Christophe Ruaux, Philippe Gosset, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy

International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13):6657

Nicotinic Receptor Subunits Atlas in the Adult Human Lung

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

International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(20):7446

Primary ciliogenesis is a crucial step for multiciliated cells determinism in the respiratory epithelium

Randa Belgacemi, Zania Diabasana, Antony Hoarau, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Christophe Ruaux, Myriam Polette, Jeanne-Marie Perotin, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy

Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(15):7575-7579

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, Philippe Birembaut, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Gonzague Delepine, Myriam Polette, Gaetan Deslée, 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, Valérian Dormoy

Respiratory Research, 2020, 21(1):207

Communications orales (Visioconférences)

Implication du SNP α 5 dans la bronchopneumopathie chronique obstructive

Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Gonzague Delepine, Philippe Gosset, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Journées de Recherche Respiratoire, Brest - France (Octobre 2020)

Implication du SNP α 5 dans la bronchopneumopathie chronique obstructive

Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Gonzague Delepine, Philippe Gosset, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Journée Rémoise des Jeunes Chercheurs de la SFR CAP-Santé, Reims– France (Octobre 2020)

Communications par voie d'affiche

Role of the nicotinic acetylcholine receptor gene mutation *CHRNA5* in chronic obstructive pulmonary disease

Zania Diabasana, Randa Belgacemi, Julie Routhier, Philippe Birembaut, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
ATS – International Conference, Philadelphie – Etats-Unis (Août 2020)

Implication des récepteurs nicotiniques dans la bronchopneumopathie chronique obstructive

Zania Diabasana, Randa Belgacemi, Julie Routhier, Philippe Birembaut, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Carrefour Pathologie de la Société Française de Pathologie, Paris - France (Novembre 2019)

Bronchopneumopathie chronique obstructive et récepteurs nicotiniques

Zania Diabasana, Randa Belgacemi, Julie Routhier, Philippe Birembaut, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Journées de Recherche Respiratoire de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF), Bruxelles – Belgique (Octobre 2019)

Bronchopneumopathie chronique obstructive et récepteurs nicotiniques

Zania Diabasana, Randa Belgacemi, Julie Routhier, Philippe Birembaut, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Journée des Jeunes Chercheurs de la Structure Fédérative de Recherche Champagne-Ardenne Picardie (SFR Cap-Santé), Reims – France (Octobre 2019)

Bronchopneumopathie chronique obstructive et récepteurs nicotiniques

Zania Diabasana, Randa Belgacemi, Julie Routhier, Philippe Birembaut, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy
Les Journées des Jeunes Chercheurs Transfrontalières, Reims – France (Avril 2019)

Distinctions

Novembre 2019

Carrefour Pathologie de la Société Française de Pathologie (SFP), Paris – France

Prix du meilleur ePoster interface Inserm 2019

Octobre 2019

Journée des Jeunes Chercheurs de la Structure Fédérative de Recherche Champagne-Ardenne Picardie (SFR Cap-Santé), Reims – France

1^{er} prix Spécial « Boehringer Ingelheim » du meilleur poster

Avril 2019

Journées des Jeunes Chercheurs Transfrontaliers, Reims – France

Prix Poster

ABREVIATIONS

A

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique

B

BChE	Butyrylcholinestérase
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>

C

CaCC	<i>Calcium-activated chloride channel</i>
CarAT	Carnitine acétyltransférase
CC10	<i>Club Cell 10-kDa Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDC	<i>classical Dendritic Cell</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CHRN	Famille de gènes codant les sous-unités des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine
CHT1	<i>High affinity Choline Transporter 1</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CSI	Corticostéroïdes inhalés
CVF	Capacité Vitale Forcée
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>

D

DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde

E

EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i>

F

FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FOX	<i>Forkhead Box</i>

G

GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMNC	<i>Geminin Coiled-Coil Domain Containing</i>
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>

H

HHIP	<i>Hedgehog Interacting Protein</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

I

IAL	<i>Interface Air-Liquide</i>
Id2	<i>Inhibitor of DNA binding 2</i>
IFN	<i>Interféron</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IL	<i>Interleukine</i>
ILC	<i>Innate Lymphoid Cell</i>
IREB2	<i>Iron-Responsive Element-Binding protein 2</i>

J

JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
------------	-------------------------------------

K

KO	<i>Knockout</i>
-----------	-----------------

L

LABA	<i>Long-Acting β2-Agonist</i>
LAEC	<i>Large Airway Epithelial Cells</i>
LAMA	<i>Long-Acting Muscarinic Antagonist</i>
LB	<i>Lymphocyte B</i>
LBA	<i>Lavage Broncho-Alvéolaire</i>
LPC	<i>Liquide Périciliaire</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>

LT Lymphocyte T

M

mAChR *muscarinic Acetylcholine Receptor*
MICA/B *MHC class I Chain-related protein A/B*
MMP *Matrix Metalloproteinase*
mMRC *modified Medical Research Council*

N

nAChR *nicotinic Acetylcholine Receptor*
NF- κ B *Nuclear Factor-kappa B*
NK *Natural Killer*
NKG2D *Natural-Killer Group 2, member D*
NNK *Nicotine-derived nitrosamine ketone*
NNN *N-nitrosornicotine*
Nrf2 *Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2*

O

OCT *Organic Cation Transporter*
OMS *Organisation Mondiale de la Santé*

P

PAMP *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PBS *Phosphate Buffer Saline*
PCR *Polymerase Chain reaction*
pDC *plasmacytoid Dendritic Cell*
PDGFA *Platelet Derived Growth Factor Subunit A*
PnI/II *Pneumocyte de type I/II*
PRR *Pattern Recognition Receptor*

R

RANTES *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*
ROS *Reactive Oxygen Species*
RTE *Résistance transépithéliale*

S

SAEC *Small Airway Epithelial Cells*
SHH *Sonic HedgeHog*
SNP *Single Nucleotide Polymorphism*

SP-C *Surfactant Protein C*
SVF *Sérum de Veau Fœtal*

T

TCR *T Cell Receptor*
TGF *Transforming Growth Factor*
Th *T helper*
TNF *Tumor Necrosis Factor*
TRP63 *Transformation Related Protein 63*
TTF-1 *Thyroid Transcription Factor-1*

V

VaChT *Vesicular Acetylcholine Transporter*
VEMS *Volume Expiratoire Maximal par Seconde*

W

WT *Wild Type*

Z

ZO-1 *Zonula Occludens-1*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation des voies aériennes inférieures chez l'Homme.....	23
Figure 2 : Stades du développement pulmonaire embryonnaire.....	25
Figure 3 : Membrane basale de l'épithélium pulmonaire	29
Figure 4 : Structure de l'appareil respiratoire des voies aériennes inférieures	30
Figure 5 : Architecture du cil moteur et non-moteur (primaire)	32
Figure 6 : Les complexes de jonctions de l'épithélium pulmonaire.....	37
Figure 7 : Régénération normale et pathologique de l'épithélium respiratoire des voies aériennes.....	39
Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme de clairance mucociliaire	40
Figure 9 : Principales cellules immunitaires retrouvées dans le poumon et leur localisation	42
Figure 10 : Principales cytokines impliquées dans les mécanismes de différenciation des LT.....	45
Figure 11 : Processus de maturation des LB après une interaction avec un antigène.....	46
Figure 12 : Synthèse, libération et dégradation de l'ACh dans les cellules neuronales... 	53
Figure 13 : Synthèse, libération et dégradation de l'ACh dans les cellules non-neuronales	54
Figure 14 : Mécanismes de libération de l'acétylcholine dans les cellules épithéliales respiratoires	55
Figure 15 : Composition des nAChRs	57
Figure 16 : Structure d'une sous-unité de nAChRs	58
Figure 17 : Représentation de l'arrangement des sous-unités des nAChRs avec leur site de fixation.....	59
Figure 18 : Modèle d'activation et de désensibilisation des nAChRs.....	60
Figure 19 : SNP retrouvés dans la région chromosomique 15q24/25.....	67

Figure 20 : Variations régionales de la mortalité par BPCO en France, 2013-2014.....	69
Figure 21 : Evaluation du stade de la BPCO en tenant en compte les données spirométriques, les symptômes et le risque d'exacerbations	72
Figure 22 : Obstruction des voies aériennes dans la BPCO	76
Figure 23 : Inflammation des voies aériennes dans la BPCO	77
Figure 24 : Algorithme de la prise en charge de la BPCO	85
Figure 25 : Analyse comparative de la séquence en acides aminés entourant la position 398 de la sous-unité $\alpha 5$ entre différentes espèces.....	87
Figure 26 : Fréquence de la distribution allélique du SNP rs16969968 entre différentes populations ethniques	88
Figure 27 : Plan expérimental de l'étude de l'expression du SNP$\alpha 5$ dans une population BPCO vs non-BPCO	93
Figure 28 : Plan expérimental de l'étude de l'expression transcriptomique et protéomique des sous-unités des nAChRs	94
Figure 29 : Plan expérimental de culture cellulaire en IAL.....	95
Figure 30 : Exemple de résultats obtenus après génotypage.....	99
Figure 31 : Principe de détection d'ARN <i>in situ</i> par le kit RNAscope technology.....	100
Figure 32 : Principe de détection des protéines par le kit Proteome profiler array	108
Figure 33 : Le gène <i>CHRNA5</i> est exprimé dans l'épithélium bronchique de patients non-BPCO et BPCO.....	165
Figure 34 : Répartition du génotype de <i>CHRNA5</i> dans les voies aériennes de patients non-BPCO et BPCO.....	166
Figure 35 : Le SNP rs16969968 n'influence pas le remodelage épithélial bronchique des patients BPCO	173
Figure 36 : Le SNP rs16969968 n'influence pas la différenciation cellulaire des patients BPCO.....	174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'étude des différents gènes d'intérêts en PCR	103
Tableau 2 : Listes des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.....	105
Tableau 3 : Associations entre les génotypes WTα5 et SNPα5 de patients non-BPCO et BPCO et les données cliniques	168
Tableau 4 : Associations entre les génotypes WTα5 et SNPα5 et les données cliniques	170

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE POUMON

1. L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un système biologique qui regroupe un ensemble d'organes interconnectés assurant la respiration, un processus physiologique indispensable au métabolisme cellulaire permettant les échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone entre le milieu extérieur et l'organisme. Ce système est composé des voies aériennes supérieures (VAS) comprenant le nez, les cavités nasales, les sinus para nasaux, le pharynx et la partie du larynx au-dessus des cordes vocales et des voies aériennes inférieures (VAI) comprenant la partie du larynx en dessous des cordes vocales, la trachée et le poumon (**Figure 1 ▼**). L'espace intra pulmonaire comprend les voies aériennes conductrices d'air (bronches et bronchioles) et le parenchyme (bronchioles respiratoires et alvéoles) où se déroule l'hémostase (LeMessurier et al., 2020; Man et al., 2017). La fonction respiratoire inclut la respiration externe correspondant aux échanges gazeux entre les alvéoles pulmonaires et les capillaires sanguins, et la respiration interne, durant laquelle l'oxygène est utilisé par les cellules et le glucose issu de l'alimentation est oxydé en dioxyde de carbone.

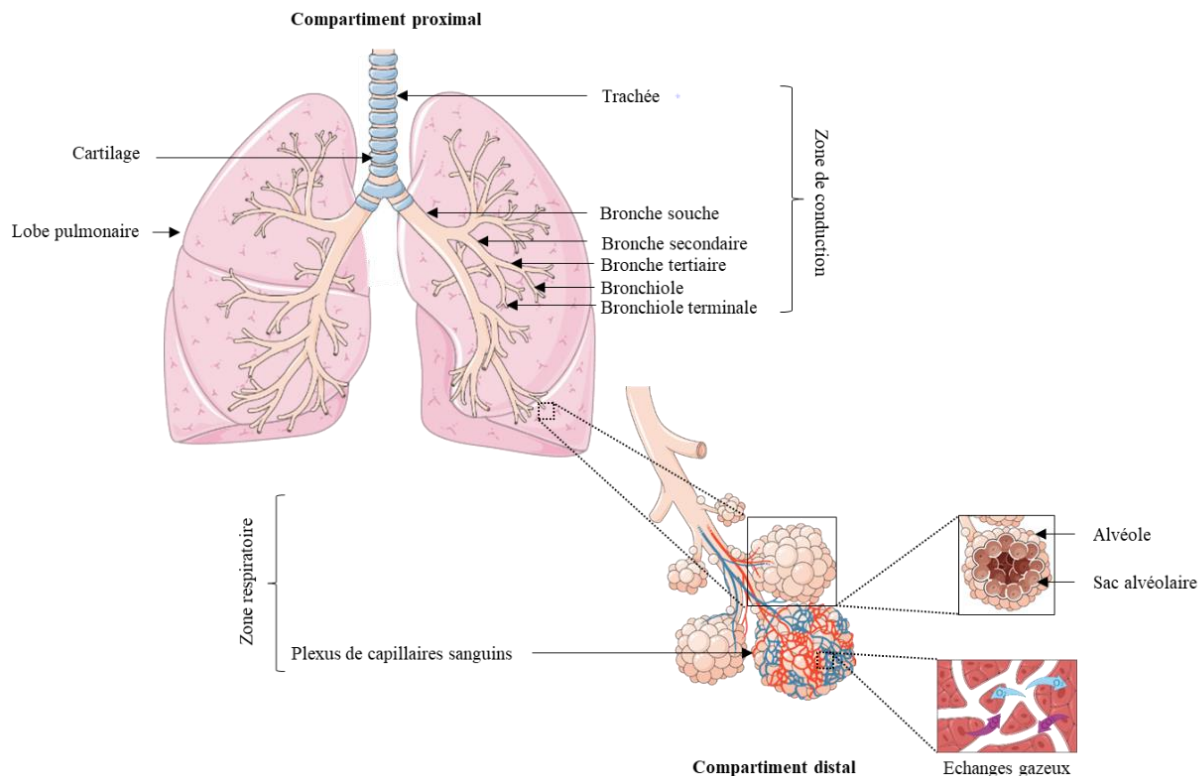


Figure 1 : Organisation des voies aériennes inférieures chez l'Homme

La respiration externe, également appelée ventilation pulmonaire, s'effectue en deux phases : une phase d'inspiration et une phase d'expiration. Lors de l'inspiration, l'air pénètre dans notre corps par voie buccale ou voie nasale et transite par les VAS où il sera nettoyé de particules parasites, humidifié et réchauffé. Par la suite, l'air passe par la trachée, puis les bronches et les bronchioles avant d'arriver dans les alvéoles, lieu où sont réalisés les échanges gazeux. Ces alvéoles, qui représentent plus de 90% du volume pulmonaire total, sont en contact de l'air par l'épithélium alvéolaire et au contact des capillaires par l'endothélium, ces deux compartiments étant séparés par un tissu conjonctif (Guillot et al., 2013; Knudsen and Ochs, 2018). L'oxygène issu de l'air pénètre ainsi dans les capillaires sanguins pulmonaires puis est disséminé dans le corps pour l'alimentation et le fonctionnement des cellules. Lors de l'expiration, les déchets produits par le métabolisme sous forme de CO₂ sont évacués.

La ventilation pulmonaire nécessite l'action de muscles dits respiratoires (diaphragme, muscles abdominaux, muscles intercostaux et muscles accessoires) dont la contraction et le relâchement contrôlent les phases d'inspiration et d'expiration, à la fois normales et forcées, en augmentant, stabilisant ou expulsant le volume de la cage thoracique (Green and Moxham, 1985).

2. Le poumon

Le poumon est un organe thoracique reposant sur le diaphragme et enveloppé de la plèvre, une membrane composée de deux feuillets dont le rôle est de protéger le poumon des microorganismes extérieurs et de réduire les frictions occasionnées lors des mouvements respiratoires. Le poumon gauche et le poumon droit sont séparés par une région contenant notamment le cœur, l'œsophage, la trachée et les artères pulmonaires appelée le médiastin. Le poumon gauche est constitué de deux lobes, le lobe supérieur et le lobe inférieur tandis que le poumon droit contient trois lobes, le lobe supérieur, le lobe moyen et le lobe inférieur. Ces lobes sont organisés en scissures et reliés à la trachée, un conduit constitué de tissu fibreux et cartilagineux, qui se subdivise en deux à l'entrée du poumon afin de former les deux bronches principales. Ces dernières se ramifient ensuite par dichotomie inégale en plusieurs subdivisions bronchiques qui donnent naissance à des bronchioles s'affinant à leur tour en bronchioles terminales à l'extrémité desquelles se trouvent les sacs alvéolaires et les alvéoles (Suresh and Shimoda, 2016).

2.1 Développement pulmonaire

Le poumon est un organe complexe dont le développement débute durant les premières semaines de gestation pour se terminer quelques années après la naissance (Woik and Kroll, 2015). Il est découpé en cinq stades à savoir le stade embryogénique, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire qui se chevauchent dans le temps (**Figure 2 ▼**) (Chinoy, 2003; Mullassery and Smith, 2015). L'endoderme est à l'origine de composants épithéliaux pulmonaires tandis que le mésoderme donne naissance au tissu conjonctif, cartilage, muscles lisses, fibroblastes et vaisseaux sanguins (Herriges and Morrisey, 2014; Mullassery and Smith, 2015; Schittny, 2017).

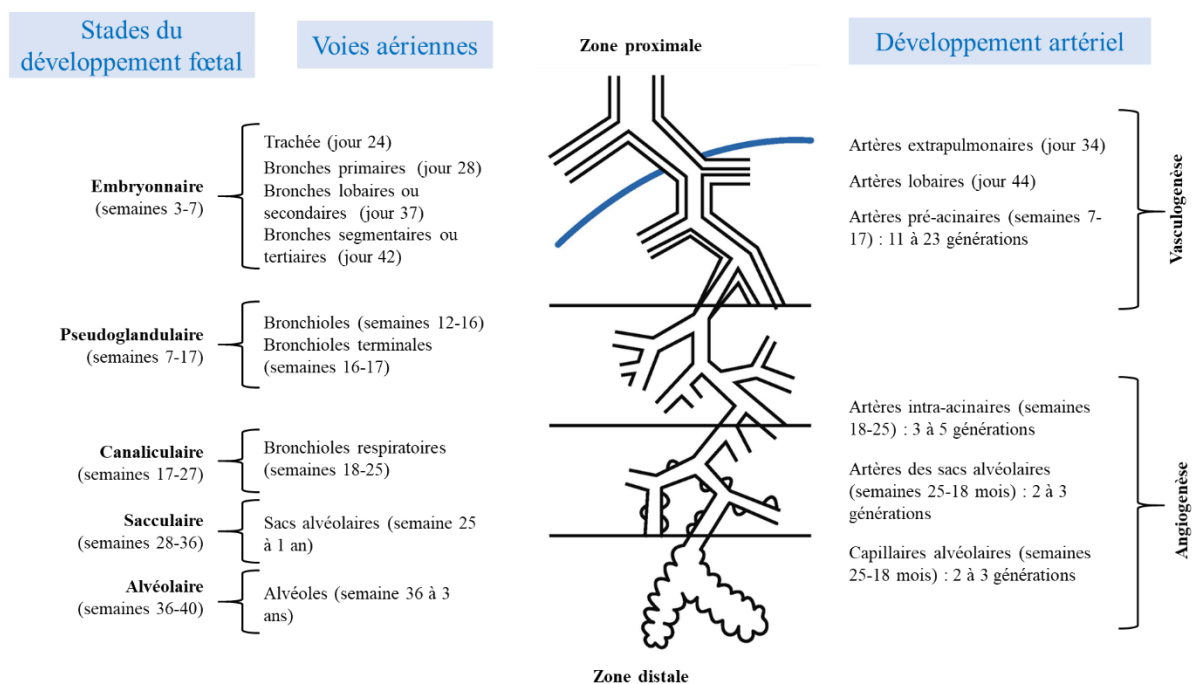


Figure 2 : Stades du développement pulmonaire embryonnaire

(Modifié d'après Iñiguez Osmer et Sánchez, 2020)

Stade embryonnaire : L'évagination de l'épithélium du côté ventral de l'intestin primitif génère un bourgeonnement pulmonaire qui se subdivise à sa partie distale en deux bourgeons précurseurs des bronches souches droites et gauches et dont la croissance se poursuit dans le mésenchyme environnant (Mullassery and Smith, 2015; Woik and Kroll, 2015). Ces bronches primaires donnent ensuite naissance aux bronches secondaires puis tertiaires tandis que les cellules mésenchymateuses qui entourent la trachée se différencient en précurseurs de cartilages. Parallèlement, le développement du système vasculaire est initié par la formation des premiers vaisseaux sanguins (Kotecha, 2000; Lewin and Hurtt, 2017).

Stade pseudoglandulaire : Les bronches tertiaires se subdivisent en bronches terminales intégrées dans le mésenchyme environnant et les premières bronchioles apparaissent afin de former l'arbre respiratoire par morphogenèse (Herriges and Morrisey, 2014; Schittny, 2017). Au cours de ce stade, les parois trachéales et bronchiques (partie proximale) sont tapissées d'un épithélium pseudostratifié précurseur des cellules épithéliales et l'arbre artériel continue son développement (Schittny, 2017; Woik and Kroll, 2015).

Stade canaliculaire : La formation de la partie distale du poumon est enclenchée par le développement des acini, de petites cavités arrondies regroupant les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires et les alvéoles primitives (Kotecha, 2000). Les cellules épithéliales qui composent la trachée, les bronches et les bronchioles se différencient en différents types cellulaires incluant des cellules ciliées, sécrétrices de mucus et neuroendocrines (Lewin and Hurtt, 2017; Mullassery and Smith, 2015; Woik and Kroll, 2015). Enfin, les vaisseaux sanguins qui alimentent le poumon sont complètement développés (Mullassery and Smith, 2015; Warburton et al., 2010).

Stade sacculaire : Les voies aériennes périphériques s'élargissent et la morphogenèse bronchique est achevée. Les parois alvéolaires s'allongent et s'affinent augmentant la surface à l'origine des échanges gazeux, les acini se différencient en sacs alvéolaires et des septa primaires entourés de capillaires se développent entre ces sacs. Les pneumocytes de type II (PnII) se différencient en pneumocytes de type I (PnI) dans l'épithélium alvéolaire et les PnII commencent à sécréter le surfactant pulmonaire nécessaire au fonctionnement respiratoire et à la défense de l'hôte (Lewin and Hurtt, 2017; Rock and Hogan, 2011; Schittny, 2017).

Stade alvéolaire : Le stade alvéolaire débute en fin de gestation et se termine jusqu'à trois ans après la naissance. Les septa primaires se divisent et donnent naissance aux septa secondaires se divisant en plus petites unités appelées alvéoles. Les vaisseaux sanguins sont retrouvés dans l'espace inter-alvéolaire et la barrière air-sang se forme. A la naissance, 10 à 20% des alvéoles sont formées et leur nombre ainsi que leur surface d'échange augmente au cours des premières années de la vie (Lewin and Hurtt, 2017; Mullassery and Smith, 2015). Dans sa forme définitive, il est estimé que le poumon est composé de 300 à 600 millions d'alvéoles avec environ 1000 alvéoles par acinus.

2.2 Voies de signalisation

Le développement de l'appareil respiratoire est un mécanisme finement régulé par l'expression d'hormones, de facteurs de transcription et de croissance (Chinoy, 2003; Hooper and Wallace, 2006). L'épithélium et le mésenchyme sont en constante interaction et expriment de nombreuses molécules telles que les homéoprotéines Nkx également appelées TTF-1 (*Thyroid-specific transcription factor*), la voie Wnt/ β -caténine, les protéines FOX (*Forkhead Box*) ou encore la voie SHH (*Sonic HedgeHog*) permettant l'initiation de la formation du réseau de branchement bronchique et la différenciation épithéliale (Guillot et al., 2013; Schittny, 2017).

La voie Wnt/ β -caténine est indispensable pour le développement embryonnaire de nombreux organes tels que le cœur, le pancréas, le rein et le foie mais aussi la régulation de différents processus cellulaires (Hussain et al., 2017; Tanaka et al., 2002). D'un point de vue fonctionnel, Wnt représente une famille de glycoprotéines riches en cystéines qui se fixent aux récepteurs Fz (*Frizzled*), composés de sept domaines transmembranaires, permettant la translocation de la protéine β -caténine dans le noyau afin d'activer l'expression de gènes (Wodarz and Nusse, 1998). Au sein des voies aériennes, la voie Wnt/ β -caténine active l'expression du facteur de transcription Nkx2.1 par les progéniteurs endodermaux qui, en association avec SP-C (*Surfactant protein C*), est à l'origine de l'arbre bronchique (Rock and Hogan, 2011). Les protéines Wnt sont également capables d'activer la voie JNK (*c-jun N-terminal kinases*) ou même des canaux de libération d'ions calcium (Warburton et al., 2010).

Les protéines FOX sont une famille de facteurs de transcription (Hfh8, Foxa1, Foxj1, etc.) dont le domaine de liaison à l'ADN est à hélice « ailée » (Warburton et al., 2010). L'absence du gène *FOXJ1* chez la souris induit une altération de la ciliogenèse en raison d'un défaut de migration et de fixation des corps basaux à la membrane apicale (Brody et al., 2000). Exprimé chez de nombreuses espèces, Hfh8 interviendrait quant à lui dans l'initiation du développement pulmonaire (Hackett et al., 1995; Warburton et al., 2010).

La voie SHH participe à la formation des ramifications de l'arbre respiratoire en régulant les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme (Kugler et al., 2015). En effet, SHH est impliqué dans la division du bourgeon pulmonaire en œsophage et trachée au début de l'organogenèse et régule l'expression de molécules de signalisation par le mésenchyme pulmonaire telles que FGF10 (*Fibroblast Growth Factor 10*) et BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) contrôlant ainsi la morphogenèse pulmonaire (Fernandes-Silva et al., 2017; Urase et al., 1996). De plus, il est nécessaire à la formation du cartilage au niveau de la trachée et des

bronches proximales ainsi qu'à la formation des muscles lisses bronchiques et vasculaires en interagissant avec le parenchyme pulmonaire (Miller et al., 2004).

Enfin, l'élastine nécessaire à la formation des alvéoles est produite par les cellules musculaires lisses alvéolaires à la suite de l'expression de PDGFA (*Platelet-derived growth factor A*) tandis que la dérégulation de l'acide rétinolique permet la sacculature et la maturation des PnI (Rock and Hogan, 2011). Du côté de la spécialisation cellulaire, l'expression de la voie Notch par les cellules épithéliales distales ainsi que la protéine TTF-1 et le facteur de transcription Id2 (*Inhibitor of DNA binding 2*) interviennent dans la différenciation des cellules épithéliales respiratoires (Rock and Hogan, 2011; Whitsett, 2018).

La liste décrite ci-dessus n'est pas exhaustive. Il existe une multitude de molécules et de récepteurs impliqués dans les processus de développement pulmonaire permettant la mise en place de toutes les populations cellulaires orchestrant les fonctions pulmonaires.

3. Les populations cellulaires exprimées dans le poumon

L'appareil respiratoire est une surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur constitué d'une zone de conduction (pharynx, trachée, bronches, bronchioles) et d'une zone d'échanges (bronchioles respiratoires, conduits alvéolaires et alvéoles) (Rokicki et al., 2016). Histologiquement, la paroi des voies aériennes est composée de quatre tuniques concentriques:

- Une muqueuse comprenant un épithélium de surface reposant sur une membrane basale et un chorion enrichi en fibres élastiques produites par les fibroblastes et en vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- Une sous-muqueuse composée de glandes tubulo-acineuses et séro-muqueuses dont la sécrétion a pour rôle d'humidifier l'air. Les bronchioles en sont dépourvues. En revanche, des cellules musculaires lisses forment une couche fragmentée dans les voies de gros calibre puis continue dans les petites voies aériennes.
- Une enveloppe fibro-cartilagineuse de type hyalin apportant la rigidité au tissu et uniquement présente en proximal. Ainsi, les bronchioles et le parenchyme en sont dépourvus.
- Un adventice qui n'est autre qu'un tissu conjonctif constitué de vaisseaux et de nerfs. Plus le calibre des voies aériennes diminue, plus l'adventice est réduit jusqu'à disparaître au niveau des alvéoles qui sont connectés par l'interstitium pulmonaire (tissu conjonctif et capillaires).

De nombreux types cellulaires épithéliaux et non-épithéliaux sont présents dans le poumon. Ils jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire et permettent d'activer les processus de réparation après un endommagement tissulaire. Bien que de nombreuses cellules aient été identifiées à ce jour, l'identification et la caractérisation du profil d'expression génique et de la localisation protéique de nouveaux types cellulaires ne cessent d'accroître grâce à l'exploitation de techniques de séquençage à l'échelle de la cellule unique (Deprez et al., 2020; Schiller et al., 2019; Travaglini et al., 2020).

3.1 Tissu épithélial des voies aériennes

La trachée, les bronches et les larges bronchioles sont tapissées d'un épithélium respiratoire de type pseudostratifié. Toutes les cellules épithéliales reposent sur la lame basale bien que certaines d'entre elles n'atteignent pas la lumière des voies aériennes (Boudreau et al., 1996; Tam et al., 2011). Dans les bronchioles de plus petit diamètre, l'épithélium devient unistratifié cubique avant de devenir pavimenteux au sein des alvéoles.

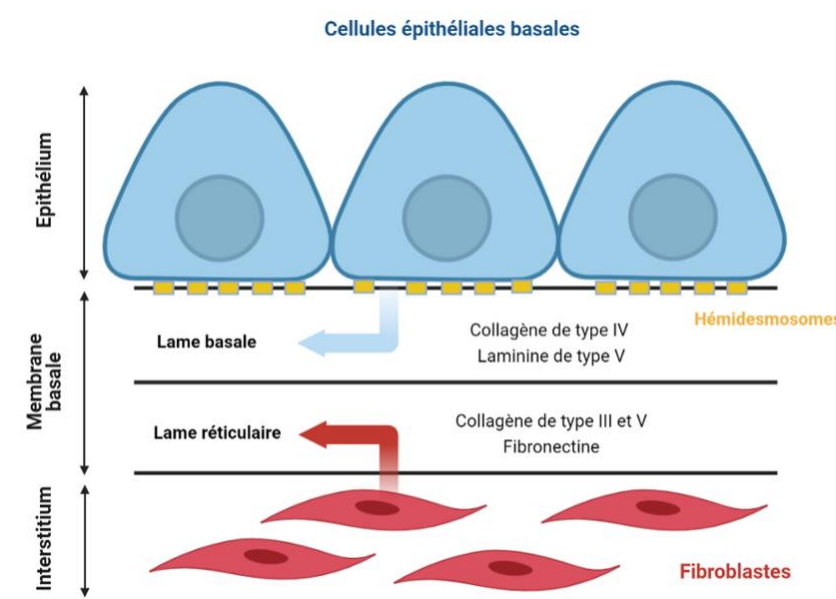


Figure 3 : Membrane basale de l'épithélium pulmonaire

(Modifié d'après Tam et al., 2011)

Tout au long des voies aériennes, l'épithélium est séparé de la matrice extracellulaire par la membrane basale. Cette dernière est composée de deux couches : d'une lame basale principalement composée de collagène de type IV et de laminines de type V sécrétés par les cellules basales, et d'une lame réticulaire principalement composée de collagène de type III et IV et de fibronectines sécrétés par les fibroblastes sous-épithéliaux et l'interstitium (**Figure 3** ◀). En plus de permettre l'adhésion des cellules épithéliales, elle permet d'établir la polarité cellulaire et d'envoyer des signaux de survie à l'épithélium.

3.1.1 Cellules épithéliales

Il existe une grande diversité de populations cellulaires au sein du poumon. Parmi elles, on distingue les cellules basales, multiciliées et sécrétrices (caliciformes, club et glandulaires) qui représentent les populations majoritaires (**Figure 4** ▼). La composition épithéliale varie selon un gradient proximo-distal par conséquent le nombre de cellules caliciformes est diminué dans les bronchioles tandis que le nombre de cellules club est augmenté (Nawroth et al., 2020; Rock and Hogan, 2011).

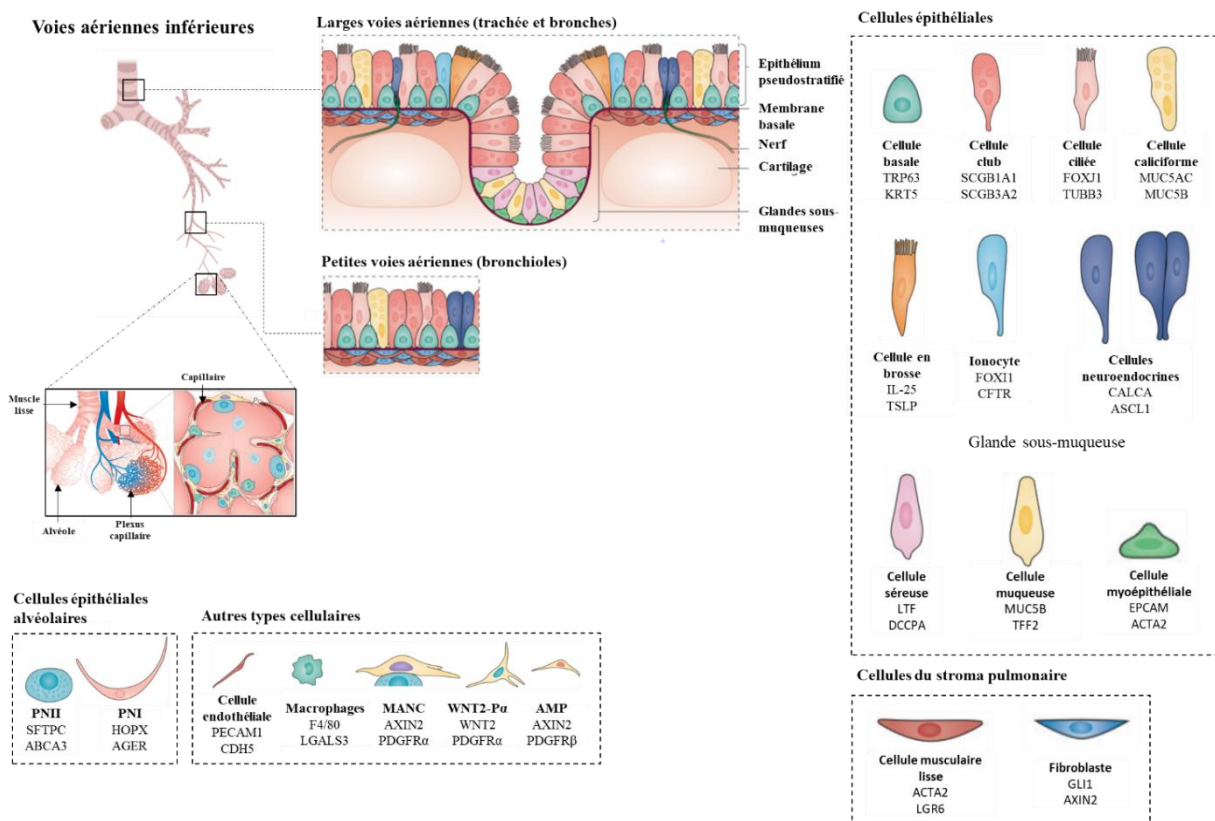


Figure 4 : Structure de l'appareil respiratoire des voies aériennes inférieures

Les principales cellules composant les voies aériennes de la trachée aux alvéoles sont représentées

(Modifié d'après Zepp et Morrisey, 2019)

3.1.1.1 Cellules basales

De forme pyramidale, les cellules basales reposent sur la membrane basale à l'aide d'hémidesmosomes, des jonctions d'ancrage qui s'y attachent via leurs intégrines $\alpha 6\beta 4$ (**Figure 3** ◀) (Evans and Plopper, 1988; Knight and Holgate, 2003; Tam et al., 2011). Au sein des voies aériennes, ces cellules sont généralement regroupées lorsqu'elles sont exprimées en position proximal (trachée, bronches) et tendent à se singulariser en position distale (bronchioles) jusqu'à disparaître au sein des alvéoles (**Figure 4** ◀) (Deprez et al., 2020; Hiemstra et al., 2015; Rock et al., 2010). Les cellules basales expriment différentes protéines qui leurs sont propres telles que le facteur de transcription Trp63 (*Transcription factor transformation-related protein 63*) et les Ck5 et Ck14 (Cytokératines 5 et 14) dont les niveaux d'expression influencent la différenciation et le remodelage épithélial. Par ailleurs, elles produisent des molécules bioactives telles que des cytokines ou encore l'endopeptidase neutre (Tam et al., 2011).

Ces cellules sont dites progénitrices et multipotentes : elles ont la capacité de contrôler l'homéostasie et la plasticité cellulaire en régénérant un épithélium fonctionnel à la suite d'une lésion par prolifération et différenciation en cellules multiciliées et sécrétrices via l'activation ou l'inhibition de différentes voies de signalisation (Whitsett, 2018). En effet, il a été montré qu'une forte expression de Notch favorise la formation de cellules caliciformes tandis qu'une faible expression permet à la protéine GMNC (*Geminin coiled-coil domain containing*) d'activer le gène *FOXJ1* (*Forkhead box J1*) crucial pour la différenciation en cellules ciliées (Rock et al., 2010; Whitsett, 2018).

En outre, bien que nécessaire à l'organisation et à la maintenance de l'épithélium pulmonaire, des mutations ou modifications épigénétiques provoquées par des agents environnementaux tels que des agents infectieux, des allergènes ou des particules en suspension dans l'air peuvent survenir et créer un déséquilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules basales. Ce phénomène est ensuite à l'origine de l'émergence et de la progression de pathologies pulmonaires incluant la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme ou encore la mucoviscidose (Grainge and Davies, 2013; Rock et al., 2010).

3.1.1.2 Cellules multiciliées

Mise en place de la structure ciliaire

Les cellules multiciliées représentent le type cellulaire le plus abondant au sein de l'épithélium pulmonaire (Grainge and Davies, 2013). La différenciation des cellules basales ou sécrétrices suite à l'expression du facteur de transcription FoxJ1 en est à l'origine et elles sont considérées comme totalement différenciées (Didon et al., 2013). De forme cylindrique, ces cellules possèdent à leur surface des extensions de la membrane plasmique appelées cils, chacun mesurant 3-7 μm de long et possédant un diamètre de 0,1 μm (**Figure 4 ◀**) (Brekman et al., 2014; Fahy and Dickey, 2010). On dénombre deux grands types de cils (**Figure 5 ▼**) (Nigg and Raff, 2009) :

- Les cils moteurs qui possèdent un axonème (partie axiale du cil) de configuration 9+2 composé de neuf doublets de microtubules périphériques entourant deux simples microtubules centraux. Les microtubules internes et externes sont reliés entre eux par des rayons radiaux tandis que les microtubules externes contiennent des bras de dynéines (intérieur et extérieur) et sont reliés entre eux par des liens de nexines (Munkholm and Mortensen, 2014).
- Les cils non moteurs (ou cils primaires) qui possèdent un axonème de configuration 9+0 composé de neuf doublets de microtubules périphériques sans paire centrale.

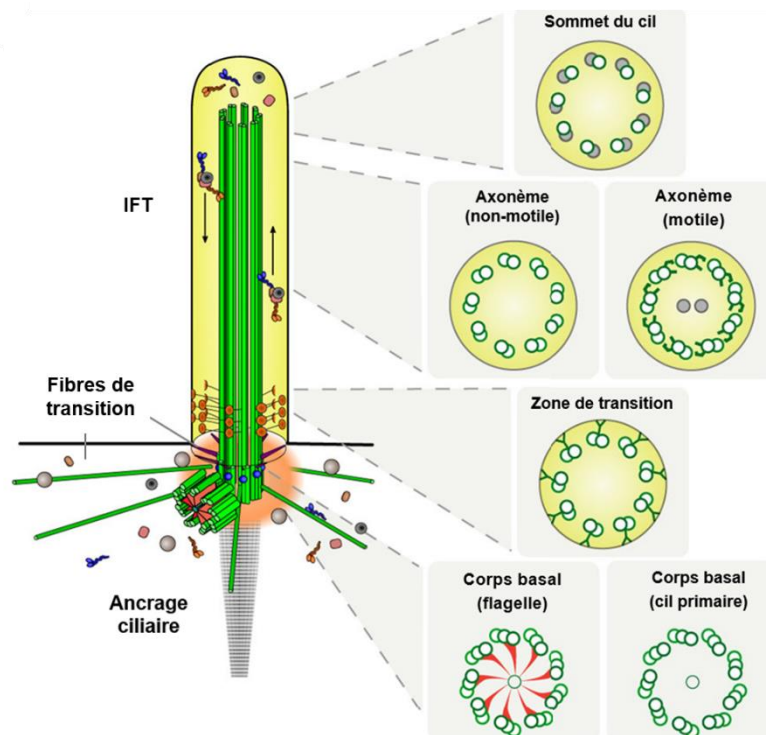


Figure 5 : Architecture du cil moteur et non-moteur (primaire)

(Werner et al., 2017)

C'est l'assemblage du centriole mère avec une matrice péricentriolaire riche en protéines qui aboutit à la formation du centrosome, le centre organisateur de microtubules (Bettencourt-Dias et al., 2011). Une fois établi, ce centrosome constitué de neuf triplets de microtubules migre au pôle apical de la membrane plasmique où il s'y attache à l'aide de ses appendices et devient alors le corps basal. Par la suite, les cils y sont assemblés et s'étendent en périphérie de la cellule pour atteindre le liquide de surface périciliaire (LPC). L'assemblage de plusieurs centrioles à la fois permet de former des cellules multiciliées pouvant contenir jusqu'à 300 cils (Bettencourt-Dias et al., 2011). On estime ainsi que le poumon adulte est composé d'environ 3×10^{12} cils moteurs (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017).

Le processus de ciliogenèse fait appel au transport intraflagellaire (IFT) pour l'assemblage : transport rétrograde à partir du doublet de microtubules central jusqu'au sommet du cil puis antérograde en sens inverse. Le cil nouvellement formé est alors entouré d'une membrane continue avec la membrane plasmique (Nigg and Raff, 2009). Ce transport permet la formation mais également le maintien de la structure ciliaire. Au sein des cellules multiciliées, l'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine moteur de la dynéine est responsable du battement ciliaire (Kikkawa, 2013; Rosenbaum and Witman, 2002).

Fonctions des cils

Les cellules multiciliées sont pourvues de récepteurs et de chaînes protéiques exprimés au pôle apical tels que le canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) et la protéine CHT1 (*High-affinity Choline Transporter 1*) afin d'assurer et de contrôler des mécanismes biologiques. Le LPC dans lequel baignent les cils est impliqué dans le phénomène de clairance mucociliaire permettant d'évacuer les particules emprisonnées dans le mucus et de les expulser hors de l'organisme par le système digestif. Le cil primaire, bien que non-moteur, joue un rôle important dans les interactions cellulaires et présente une fonction mécanosensorielle. En effet, il intervient dans la transduction du signal de la voie SHH chez la souris, impliquée dans le développement embryonnaire (Huangfu and Anderson, 2005; Nachury et al., 2010). De plus, les cils primaires ont la capacité de capter des signaux extracellulaires via des récepteurs spécialisés et de les transmettre à l'intérieur de la cellule dans le but d'initialiser de multiples processus cellulaires tel que la prolifération ou la maintenance cellulaire (Anvarian et al., 2019; Hildebrandt et al., 2011). Des anomalies dans l'expression de gènes impliqués dans la maintenance du cil (formation incomplète ou activité altérée) sont à l'origine de ciliopathies, une famille de maladies touchant plusieurs organes et tissus au sein desquels le complexe cil-centrosome est compromis (Hildebrandt et al., 2011; Nigg and Raff, 2009).

3.1.1.3 Cellules sécrétrices

Les voies aériennes se composent de deux types d'épithélium : un épithélium de revêtement et un épithélium glandulaire. L'épithélium de revêtement tapisse les voies respiratoires et pénètre le chorion sous-jacent afin de former l'épithélium glandulaire. Des cellules sécrétrices, productrices de mucus ou de substances protéiques, sont retrouvées dans ces épithéliums. (**Figure 4** ◀). On en distingue principalement 3 types dont la différence est basée sur le type de sécrétion et la localisation : les cellules caliciformes et les cellules club retrouvées dans l'épithélium de revêtement et les cellules glandulaires (séreuses et muqueuses) formant l'épithélium glandulaire.

Cellules caliciformes

Représentant environ 20% des cellules épithéliales pulmonaires, les cellules caliciformes sont principalement exprimées dans les larges voies aériennes. Elles sont polarisées, ainsi le noyau et les organelles sont retrouvés au pôle basal tandis que le pôle apical est enrichi en granules sécrétant du mucus dans les voies aériennes. Cette sécrétion est stimulée par la libération d'ATP (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; Tam et al., 2011). Le mucus est principalement composé d'eau (97%) mais aussi de mucines (1%), de sel (1%) et de diverses protéines (1%). Ce sont les canaux CFTR, CaCC (*Ca²⁺-activated chloride channel*) et ENaC (*Epithelial Na⁺ Channel*) qui en contrôlent l'hydratation. Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire codées par 17 gènes (*MUC*) chez l'Homme. Certaines d'entre elles ont la capacité de former des polymères, des monomères de mucines se lient alors par ponts disulfures grâce à la présence de cystéines en position terminale. On dénombre ainsi deux polymères dans les voies aériennes : Muc5ac principalement sécrété par les cellules caliciformes et Muc5b principalement sécrété par les cellules muqueuses des glandes (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; Fahy and Dickey, 2010).

Cellules club

Les cellules club (également appelées cellules exocrines bronchiolaires), représentent environ 10% des cellules épithéliales. Essentiellement exprimées dans la partie distale de l'arbre bronchique, ces cellules présentent une forte activité métabolique comme en témoigne la présence de réticulum endoplasmique lisse et rugueux ainsi que l'abondance de mitochondries au pôle apical de la cellule. De forme cubique, elles contiennent de petits granules très riches en eau exprimées notamment au pôle basal de la cellule. L'utéroglobine, également appelée CC10 (*Club Cell 10-kDa protein*), est une protéine de masse moléculaire

peu élevée qui constitue le principal produit de sécrétions des cellules club (Rokicki et al., 2016). Elles participent à la transformation des composés toxiques nocifs inhalés via la sécrétion de lipides ou de glycoprotéines (cytochrome P-450 par exemple) et contribuent ainsi à la protection et la réparation des voies aériennes inférieures (Singh and Katyal, 2006). De plus, elles contribuent à la tumorigenèse et à la réaction inflammatoire de l'épithélium. Le niveau d'expression de CC10 permet la détection de la présence de lésions et donc de pathologies sous-jacentes. Enfin, les cellules club sont des cellules intermédiaires qui ne sont pas totalement différenciées. Elles peuvent donc servir de cellules souches et ont la capacité de se différencier en cellules ciliées, caliciformes, et PnI et II.

Cellules glandulaires

Les cellules glandulaires regroupent les cellules muqueuses et séreuses exprimées par les glandes sous-muqueuses. Les cellules muqueuses représentent environ 60% du volume glandulaire et sécrètent notamment le Muc5b tandis que les cellules séreuses représentent à peu près 40% du volume glandulaire et sécrètent des protéoglycanes ou protéines antimicrobiennes en réponse à des signaux neurologiques (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017; Fahy and Dickey, 2010).

3.1.1.4 Cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines sont des cellules de forme pyramidale possédant à leur surface des microvillosités et ayant la capacité de former des corps neuroépithéliaux en se regroupant sous forme de clusters dans les zones de bifurcations (Sui et al., 2018). Bien que faiblement exprimées, les cellules neuroendocrines sont localisées tout au long des voies aériennes en dehors des alvéoles. Ces cellules sont dites neuroendocrines en raison de leurs vésicules cytoplasmiques qui contiennent divers neurotransmetteurs et neuropeptides leur permettant de communiquer avec le système nerveux sympathique et parasympathique par innervation (Cutz et al., 2013; Hellings and Steelant, 2020). Leur rôle reste encore à ce jour discuté néanmoins leur implication durant le développement embryonnaire ainsi que dans l'émergence de maladies pulmonaires est démontré (Cutz et al., 2008).

3.1.1.5 Pneumocytes

Les alvéoles sont le lieu où les échanges gazeux sont réalisés. Afin de permettre ce processus biologique, l'épithélium alvéolaire est doté de cellules alvéolaires appelées PnI et PnII. Ces cellules sont étroitement liées entre elles par des jonctions intercellulaires spécifiques assurant le rôle de barrière et possèdent de nombreuses mitochondries et des microvillosités (Dobbs and Johnson, 2007).

Les PnI sont des cellules fortement pavimenteuses qui occupent environ 96% de la surface alvéolaire. Leur principal rôle est de permettre les échanges gazeux grâce à leur large surface d'échange en réduisant la zone de contact entre l'air et le sang (inférieure à 1µm) (Guillot et al., 2013). Ces cellules sont métaboliquement actives et présentent des canaux ioniques sodiques et des vacuoles intracellulaires (Dobbs and Johnson, 2007).

Les PnII sont de larges cellules cubiques. Bien qu'ils n'occupent que 4% de la surface alvéolaire, ils possèdent un rôle crucial. Contrairement aux PnI, les PnII sont pourvus des caractéristiques de cellules souches : ils sont capables de s'auto renouveler, et de se différencier en PnI afin de régénérer un épithélium fonctionnel pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Mason, 2006). Ces cellules sont à l'origine de la production du surfactant pulmonaire, une substance composée à 90% de lipides et à 10% de protéines, sécrétée dans la lumière alvéolaire et nécessaire à la réduction de la tension de surface à l'interface air-liquide afin d'assurer la stabilité alvéolaire durant la respiration et éviter que les alvéoles ne collapsent. Ce surfactant possède également des propriétés antimicrobiennes et un rôle dans la défense de l'hôte en favorisant les réactions inflammatoires lors de l'infiltration des alvéoles par des corps étrangers (Guillot et al., 2013; Mason, 2006; Wright, 2005). Ce sont les corps lamellaires produits et sécrétés par les PnII qui en sont à l'origine (Ochs et al., 2020).

3.1.1.6 Ionocytes

Les ionocytes pulmonaires sont un type cellulaire récemment découvert dans l'épithélium des voies aériennes chez l'Homme et la souris. Dérivés des cellules basales et présents en faible quantité, ils expriment le gène *FOXI1* et le canal CFTR en très grande quantité, suggérant une potentielle implication dans la mucoviscidose (Hawkins and Kotton, 2018; Montoro et al., 2018; Plasschaert et al., 2018). A ce jour, leur fonction reste inconnue.

3.1.2 Systèmes de défense de l'épithélium

La surface interne des voies aériennes est constamment en contact avec les particules toxiques, bactéries, virus et autres pathogènes en provenance du milieu extérieur. L'épithélium des voies respiratoires joue un rôle majeur dans la protection de la muqueuse respiratoire en empêchant l'infiltration et la propagation de ces composés et en les éliminant. La formation d'une barrière physique et le système de clairance mucociliaire de l'épithélium pulmonaire font partie des mécanismes de défense nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire.

3.1.2.1 Barrière physique

Les cellules épithéliales sont reliées entre elles du pôle apical au pôle basolatéral par des complexes de jonctions intercellulaires que sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (**Figure 6 ▼**) (Kojima et al., 2013). Toutes ces cellules sont reliées à la membrane basale par l'intermédiaire d'hémidesmosomes permettant ainsi de conserver la cohésion cellulaire.

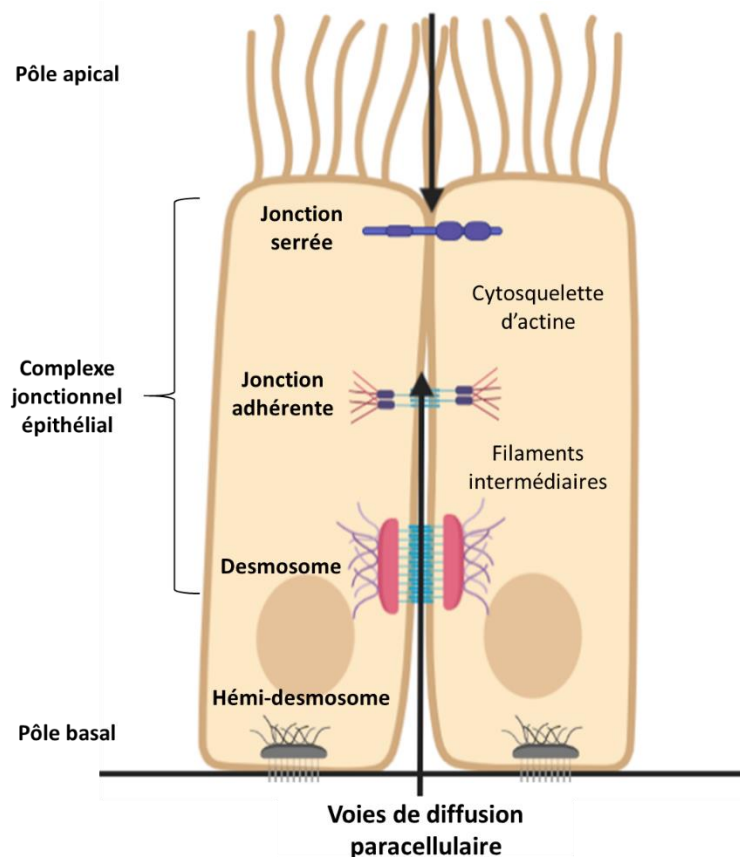


Figure 6 : Les complexes de jonctions de l'épithélium pulmonaire

(Modifié d'après Steed E. et al., 2010)

Les jonctions serrées sont exprimées dans la partie apicale de la membrane. Elles sont composées de protéines transmembranaires regroupant entre autres les ZO-1 (*Zonula Occludens-1*), les JAM (*Junction Adhesion Molecules*), les occludines et les claudines (Heijink et al., 2020). Ces jonctions permettent non seulement de réguler le passage d'ions et de molécules à travers l'épithélium par le mécanisme de sélectivité ionique (perméabilité paracellulaire), mais également de mettre en place la polarité cellulaire (González-Mariscal et al., 2014; Kojima et al., 2013). Les jonctions adhérentes sont localisées dans la partie basolatérale de la membrane. Elles sont composées de protéines transmembranaires dont la β -caténine et l'E-cadhérine notamment. Cette dernière a la capacité de se lier aux cellules voisines à l'aide de son domaine extracellulaire et au cytosquelette d'actine via la liaison de son domaine intracellulaire (Heijink et al., 2020). Le principal rôle des jonctions adhérentes est ainsi d'initier le contact cellule-cellule et par conséquent de maintenir l'intégrité épithéliale (Hartsock and Nelson, 2008; Hellings and Steelant, 2020). Les desmosomes quant à eux apportent une intégrité structurale supplémentaire en se liant aux filaments intermédiaires du cytosquelette (Nekrasova and Green, 2013).

Malgré la présence de cette barrière physique, des agents étrangers peuvent parvenir à endommager l'épithélium pulmonaire développant ainsi une desquamation des cellules épithéliales. Les cellules basales utilisent alors leur capacité d'auto-renouvellement afin de repeupler la zone lésée par prolifération et migration. On observe de cette manière la formation d'une métaplasie malpighienne transitoire durant laquelle les cellules de forme cubique sont organisées en couches superposées (**Figure 7 ►**). Après différenciation, un épithélium fonctionnel est reconstitué et l'intégrité de la barrière épithéliale est rétablie. Plusieurs facteurs interviennent dans ce processus de régénération : les métalloprotéases matricielles (MMP), la matrice extracellulaire et des cytokines et facteurs de croissance sécrétés tout au long du processus de réparation par les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Toutefois, des anomalies dans la régénération de cet épithélium pseudostratifié mucociliaire sont à l'origine de lésions précurseurs du cancer par dédifférenciation cellulaire, ou remodelage épithélial (métaplasie malpighienne persistante, hyperplasie des cellules basales et hyperplasie des cellules sécrétrices) par transdifférenciation à l'origine du développement de diverses pathologies pulmonaires (Adam et al., 2014; Mascaux et al., 2019).

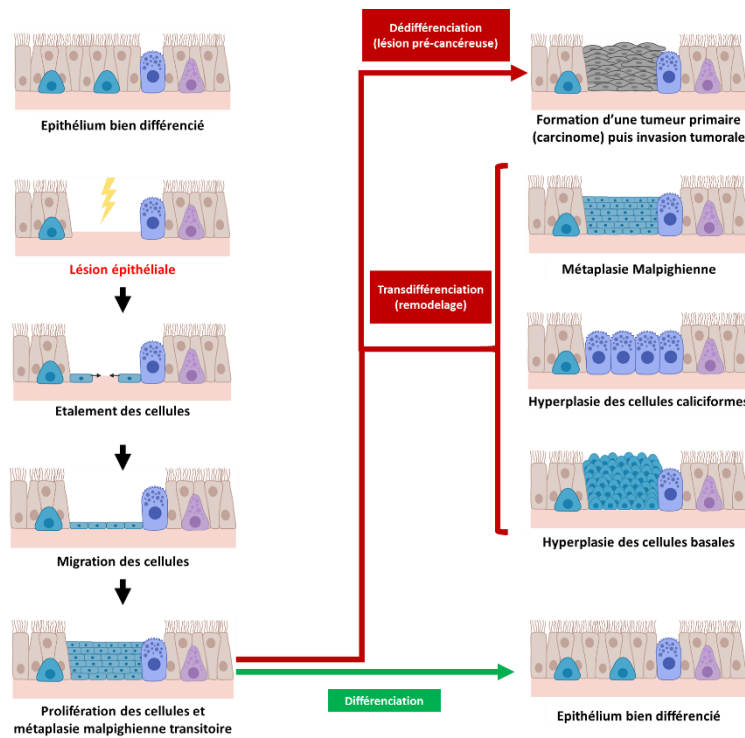


Figure 7 : Régénération normale et pathologique de l'épithélium respiratoire des voies aériennes

Représentation de la réparation et de la régénération épithéliale après une lésion et les anomalies cellulaires associées à la formation d'une lésion pré-cancéreuse ou d'un remodelage

(Modifié d'après Adam et al., 2014)

3.1.2.2 Clairance mucociliaire

Le mécanisme de clairance mucociliaire est un système de nettoyage hautement régulé et efficace permettant d'éliminer les bactéries, virus et autres pathogènes et particules présents dans les voies aériennes. Ce processus met en jeu deux éléments : le mucus formant une couche de surface permettant de bloquer et d'emprisonner les corps étrangers qui sont par la suite transportés vers le système digestif à l'aide du battement des cils, et le LPC qui fait office de barrière contre les particules inhalées en plus de faciliter le battement synchrone des cils par la lubrification. C'est le modèle du gel en brosse (**Figure 8 ►**) (Ma et al., 2018; Nawroth et al., 2020).

Le LPC est un liquide peu aqueux et de faible viscosité dans lequel baignent les cils. Il est composé de mucines (Muc1, Muc4 et Muc16) et d'autres molécules telles que des glycolipides (Randell et al., 2006). L'équilibre entre l'absorption d'ions Na^+ et la sécrétion d'ions Cl^- favorise l'hydratation de ce liquide, maintient sa hauteur et empêche la couche de mucus supérieure de s'y enfoncer (Tarran et al., 2005). La fréquence des battements ciliaires est dépendante de plusieurs facteurs notamment la température, le pH, les molécules d'ATP disponibles et la viscosité du mucus (Nawroth et al., 2020).

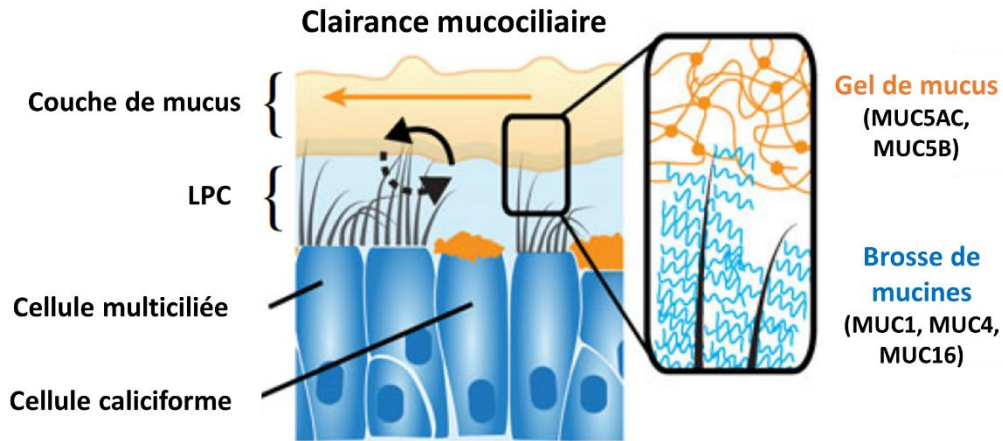


Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme de clairance mucociliaire

Modèle du gel en brosse composé d'une couche de mucus et du liquide périliciliaire (LPC)

(Nawroth et al., 2019)

Le gel de mucus supérieur est composé des mucines de haut poids moléculaires suivantes : Muc5ac et Muc5b principalement et Muc2, Muc8 et Muc19 dans une moindre mesure. Elles sont libérées par les cellules sécrétrices épithéliales et glandulaires, toutefois des cytokines (IL-6 et IL-17) pourraient intervenir dans la stimulation de l'expression des Muc5ac et Muc5b (Chen et al., 2003). L'export des ions chlorures des cellules épithéliales vers le milieu extracellulaire à travers les canaux CFTR, CaCC et ENaC est un mécanisme nécessaire à la régulation de l'hydratation des mucines, indispensable pour la déformation du gel en réponse aux forces appliquées et donc pour le maintien de l'osmose (Bustamante-Marín and Ostrowski, 2017). L'activation des récepteurs P2Y2 (*P2Y purinoreceptor 2*) à la suite de la libération d'ATP et d'adénosine participent également à cette hydratation (Button et al., 2013).

Comme décrit précédemment, la composition épithéliale suit un gradient proximo-distal. La composition de la couche de mucus varie donc en fonction de la localisation intra-pulmonaire. Les sécrétions des cellules club (plus aqueuses), remplacent progressivement les sécrétions des cellules caliciformes (Rokicki et al., 2016).

Des mutations du canal CFTR et des gènes codants les protéines structurales à l'origine de la formation des cils sont respectivement associées à la mucoviscidose et à la dyskinésie ciliaire. Ces pathologies sont définies par une clairance mucociliaire altérée en raison d'une difficulté à éliminer les déchets et par conséquent, à une obstruction chronique des voies aériennes (Antunes and Cohen, 2007; Ma et al., 2018; Whitsett, 2018).

3.2 Tissus non-épithéliaux des voies aériennes

Le stroma pulmonaire est un tissu conjonctif dense sous-jacent des voies aériennes assurant l'intégrité structurale et participant à la réparation tissulaire après lésion. Les structures cartilagineuses qui le composent permettent le maintien de la trachée et des bronches. De nombreux types cellulaires y sont présents, notamment des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des cellules inflammatoires (Thompson et al., 1995).

A la suite d'une rupture de l'épithélium, les fibroblastes du stroma pulmonaire envahissent le site lésé et participent à la production de la matrice extracellulaire provisoire, nécessaire à l'attachement et la migration des cellules épithéliales. Ces dernières s'associent ensuite aux fibroblastes afin d'initier une réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines (Invernizzi et al., 2020; Sacco et al., 2004). Les cellules musculaires lisses facilitent la respiration en tonifiant les voies de conductions aériennes. Des protéines du nom de matrisome sont également exprimées par la matrice extracellulaire et participent à la régulation des processus cellulaires tels que la survie et la différenciation (Naba et al., 2016).

Enfin, une protection supplémentaire est apportée par la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. A la fois complexe et organisée, elle fait intervenir les nombreuses cellules de l'immunité. Etant donné le rôle crucial de ce mécanisme dans le développement, la protection, la réparation et la régénération des structures pulmonaires, il est important de définir précisément les cellules de l'immunité participant activement au maintien de l'intégrité et à l'homéostasie pulmonaire.

3.2.1 Identité des cellules immunitaires

Les cellules souches hématopoïétiques sont produites par la moelle osseuse et ont la capacité de se différencier en cellules souches lymphoïdes et myéloïdes, à l'origine des différents types de cellules immunitaires. Ce mécanisme porte le nom d'hématopoïèse. Par la suite, une partie de ces cellules participera à la réponse immunitaire innée, rapide et non spécifique, tandis que l'autre partie apportera la réponse immunitaire adaptative, spécifique cette fois-ci mais qui intervient plus tardivement. De nombreuses cellules immunitaires sont présentes dans le poumon (**Figure 9 ►**).

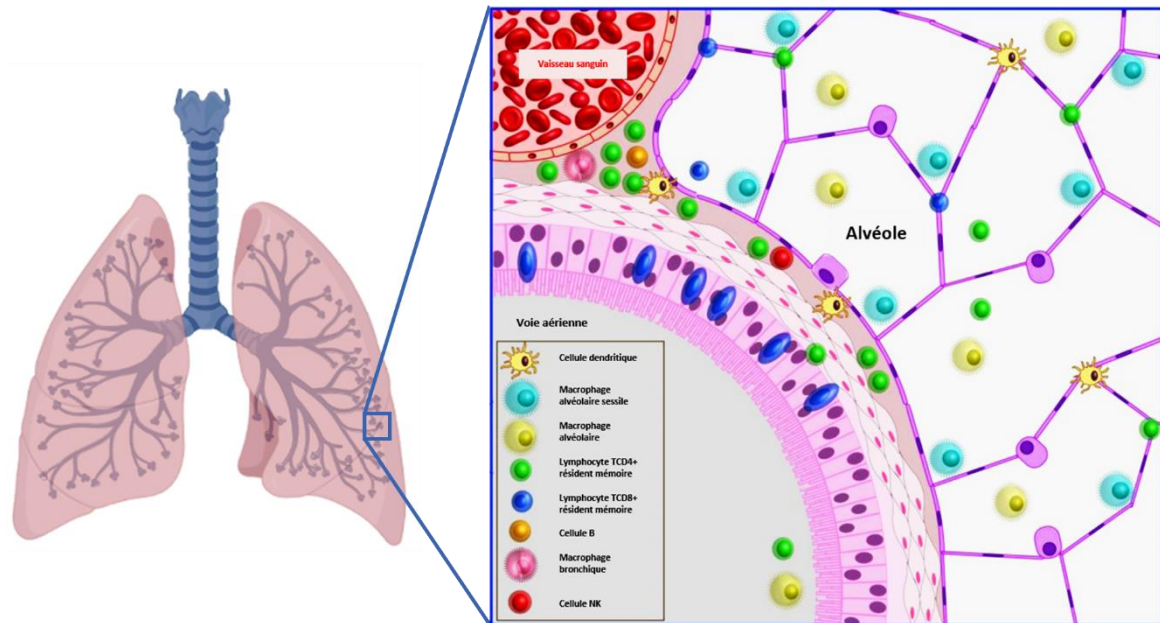


Figure 9 : Principales cellules immunitaires retrouvées dans le poumon et leur localisation

(Modifié d'après Snyder et Farber, 2019)

3.2.1.1 Cellules polymorphonucléaires

Ces cellules de l'immunité innée possèdent de nombreux granules de sécrétion dans le cytoplasme. On en distingue trois types : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.

Les polynucléaires neutrophiles sont très représentés dans le poumon et jouent un rôle très important dans l'élimination de pathogènes (notamment les bactéries) par le mécanisme de phagocytose (Giacalone et al., 2020; Segal, 2005). Ils ont la capacité de libérer des fibres composées d'ADN (*NET* de l'anglais *Neutrophile Extracellular Trap*) à travers le mécanisme de nétose afin de limiter la propagation microbienne (Jenne et al., 2013). Enfin, ils peuvent réguler la fonction des autres cellules immunitaires par la sécrétion d'enzymes ou de molécules.

Les polynucléaires éosinophiles sont retrouvés dans le sang et migrent vers le site de l'inflammation uniquement après avoir été exposés aux cytokines pro-inflammatoires IL-3, IL-5, et GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (Luijk et al., 2005; Tashkin and Wechsler, 2018). Ils possèdent plusieurs fonctionnalités, aussi bien directe qu'indirecte, dans la prise en charge d'éléments étrangers et leur élimination (Davoine and Lacy, 2014; George and Brightling, 2016; Moqbel et al., 1994). Les éosinophiles peuvent également stimuler les lymphocytes T (LT), favoriser la réponse humorale et agir comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Ravin and Loy, 2016).

Les polynucléaires basophiles sont des granulocytes circulants dans le sang qui représentent moins de 1% des leucocytes (Borriello et al., 2014). Ils ont la capacité de se fixer aux molécules IgE (Immunoglobuline E) à l'aide de leur récepteur (FcεRI) autorisant la libération de médiateurs incluant les histamines, le VEGF et des cytokines principalement de type Th2 (*T helper 2*) (Ishizaka et al., 1972; Voehringer, 2012). Les basophiles sont connus pour être notamment impliqués dans les réactions allergiques (Bühring et al., 2004).

3.2.1.2 Monocytes

Les monocytes sont des cellules précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques. Ils se développent dans la moelle osseuse et circulent dans le sang. Chez l'Homme, il existe 3 sous-types de monocytes : les monocytes classiques qui sont les plus abondants (CD14⁺⁺CD16⁻), intermédiaires (CD14⁺⁺CD16⁺), et non-classiques (CD14⁺CD16⁺⁺). Les différents récepteurs exprimés leur confèrent des propriétés et des fonctionnalités diverses (Gren and Grip, 2016; Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Zigmund et al., 2012).

Au cours de la réaction inflammatoire, les monocytes classiques sont les premiers à être recrutés au site infecté. Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, etc.), digèrent la matrice extracellulaire et activent des cellules immunitaires (Serti et al., 2014; Thiesen et al., 2014). Les monocytes intermédiaires et non-classiques interviennent plus tardivement en remplacement des monocytes classiques et neutralisent principalement les dommages tissulaires causés par les monocytes classiques en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β) (Morias et al., 2015; Sprangers et al., 2016). Après avoir été sollicités, les sous-types de monocytes se différencient rapidement en macrophages ou cellules dendritiques qui poursuivent la réponse inflammatoire (Geissmann et al., 2010; Valledor et al., 1998).

3.2.1.3 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules du système immunitaire inné exprimées dans les tissus et les organes lymphoïdes (Collin and Bigley, 2018). Dans le poumon, ces cellules ont été identifiées tout au long de l'épithélium respiratoire en position basolatérale selon un gradient proximo-distal décroissant (**Figure 9 ◀**) (Condon et al., 2011).

Au sein de l'épithélium pulmonaire, les DC sont dans un état dit immature et exercent une fonction de sentinelle. Elles sont activées à la suite de l'infiltration d'agents étrangers et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires en empruntant les vaisseaux lymphatiques

afin de retrouver les LT naïfs (ou Th0) et permettre leur différenciation (Beutler, 2004; Pennock et al., 2013). Trois sous-types de cellules dendritiques sont co-exprimés dans le poumon : les cellules dendritiques conventionnelles myéloïdes 1 et 2 (cDC 1 et 2) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les récepteurs exprimés à la membrane cellulaire peuvent varier d'un sous-type à l'autre, par conséquent le motif moléculaire reconnu ainsi que le type de LT produit varient en fonction du pathogène rencontré (bactérie, virus, etc.) (Collin and Bigley, 2018; Condon et al., 2011). Dans le poumon, les cellules dendritiques améliorent la réponse immunitaire médiée par les Th2 (Plantinga et al., 2013).

Les DC sont les seules CPA à pouvoir activer la différenciation des Th0 : elles réalisent donc le pontage entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Hikichi et al., 2019).

3.2.1.4 Macrophages

Les macrophages sont exprimés dans la quasi-totalité des tissus humains (Sinder et al., 2015). Ce sont des cellules phagocytaires, elles ont donc la capacité de dégrader les cellules mortes, les débris cellulaires et les corps étrangers (Varol et al., 2015). Ils sont divisés en macrophages de phénotype M1 qui sont liés aux réponses pro-inflammatoires et en macrophages de phénotype M2 qui sont pour leur part liés aux réponses anti-inflammatoires (Das et al., 2015). Dans le poumon, les macrophages peuvent être retrouvés à la périphérie des voies aériennes mais la grande majorité d'entre eux se situe dans la surface luminale des alvéoles et sont appelés pour cette raison les macrophages alvéolaires (**Figure 9 ◀**). Ces derniers participent activement à l'élimination des agents étrangers (Guillot et al., 2013). Deux populations sont distinguables : les macrophages sessiles qui sont adhérents à l'épithélium et dont le rôle est d'envoyer des signaux régulateurs dans le but de moduler la réponse immunitaire, et les macrophages non-sessiles qui sont présents dans l'espace luminal et sont à l'origine de l'initiation de la réponse immunitaire (Snyder and Farber, 2019; Westphalen et al., 2014). Les macrophages possèdent également des propriétés de CPA.

3.2.1.5 Lymphocytes T

Les LT sont des cellules du système immunitaire adaptatif dont la maturation et la sélection sont réalisées dans le thymus avant leur export en périphérie (Pennock et al., 2013).

Au cours de cette maturation, les LT produisent à leur surface des récepteurs membranaires TCR (*T Cell Receptor*) spécifiques à chaque cellule. Le TCR, composé de deux chaînes α et β , s'associe avec un complexe de protéines (CD3) et des co-récepteurs CD4 ou CD8 (Gao et al., 2002). L'interaction des LT avec les CPA initie leur différenciation en LT CD4⁺ *helper* qui

activent ou recrutent des cellules immunitaires au site infecté et en LT CD8⁺ cytotoxiques qui jouent un rôle crucial dans l'élimination des cellules hôtes infectées en sécrétant des granules cytotoxiques (contenant des enzymes telles que le granzyme et la perforine) dans le cytosol de ces cellules (Monks et al., 1998; Pennock et al., 2013). Le choix de la réponse des LTCD4⁺ *helper* est orienté par l'environnement cytokinique qui est lui-même créé en fonction du pathogène. Ces différents sous-types de lymphocytes participent ensuite à la réponse ou tolérance immunitaire (**Figure 10 ▼**).

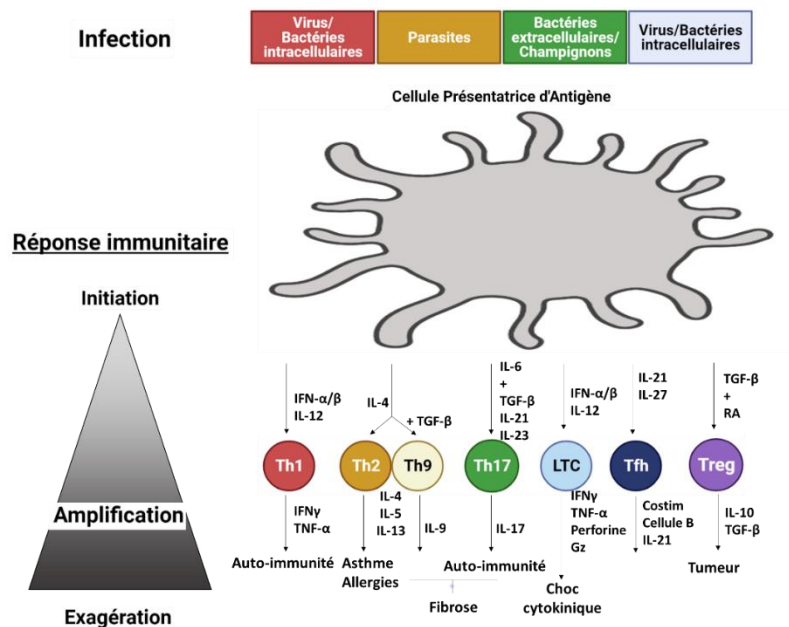


Figure 10 : Principales cytokines impliquées dans les mécanismes de différenciation des LT

Th = LT helper; Tfh = LT folliculaire helper; LTC = LT cytotoxique; Treg = LT régulateur

(Pennock et al., 2013)

La majorité des LT sont détruits à la fin de la réponse immunitaire à l'exception d'une petite partie devenant les LT mémoires. Leur fonctionnalité est altérée mais leur capacité proliférative est grande et leur mécanisme d'activation s'avère moins stricte que les LT naïfs ce qui leur permet de déclencher une réponse rapide en cas de nouvelle exposition au pathogène pour lequel elles sont spécifiques (Pennock et al., 2013). Dans le poumon, les LT mémoires résidents (LTmr) représentent la majorité des LT. Ils sont exprimés au sein des voie aériennes, ainsi que dans la périphérie et dans le parenchyme pulmonaire (Snyder and Farber, 2019) (**Figure 9 ◀**).

3.2.1.6 Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont des cellules appartenant au système immunitaire adaptatif qui produisent les anticorps dirigés contre les pathogènes afin d'induire la réponse immunitaire humorale.

Après plusieurs étapes de différenciation dans la moelle osseuse, des progéniteurs lymphoïdes communs donnent naissance à un LB naïf exprimant un récepteur membranaire (BCR de l'anglais *B Cell Receptor*) à la surface cellulaire, composé d'une IgD ou IgM couplé à un hétérodimère (Iga et Igβ), capable de reconnaître plus de 5×10^{13} antigènes différents (Pieper et al., 2013; Tobón et al., 2013). Les LB naïfs migrent ensuite en direction de la rate et sont activés après la détection d'un antigène permettant la différenciation en LB régulateurs ou plasmocytes à courte durée de vie, ou la maturation des LB naïfs dans le centre germinal qui présentent alors des fragments antigéniques sur le CMHII (Complexe Majeur d'Histocompatibilité II) reconnus par les LT CD4⁺ (**Figure 11 ▼**) (Bosmann and Ward, 2013; Fillatreau et al., 2002; Radbruch et al., 2006). Par la suite, ces LB prolifèrent, subissent une hypermutation somatique suivie d'une commutation isotypique changeant l'isotype des IgD et IgM en IgA, IgE et IgG. *In fine*, la maturation des LB permet d'obtenir des plasmocytes et des LB mémoires spécifiques des antigènes à longue durée de vie qui circulent dans le sang et les tissus (**Figure 9 ◀**) (Nothelfer et al., 2015). Les anticorps produits activent ensuite le système du complément ou interagissent avec d'autres cellules immunitaires (Nothelfer et al., 2015).

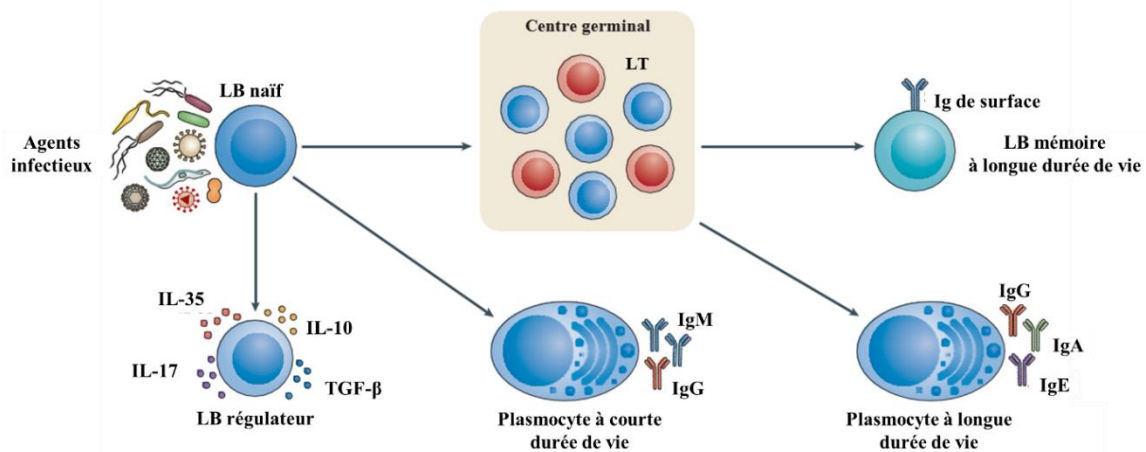


Figure 11 : Processus de maturation des LB après une interaction avec un antigène

(Nothelfer et al., 2015)

3.2.1.7 Cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules appartenant à l'immunité innée dont le développement est principalement réalisé dans la moelle osseuse (Scoville et al., 2017). Elles sont pourvues de récepteurs inhibiteurs leur permettant de se développer et de discriminer le soi du non-soi (Abel et al., 2018).

Les cellules NK sécrètent essentiellement des cytokines de type Th1 (incluant TNF- α , IFN- γ et GM-CSF) qui contribuent à la défense antibactérienne et antivirale. De plus, elles expriment des récepteurs membranaires cytotoxiques tels que NKp44, NKp46 et NKG2D (*Natural-Killer receptor Group 2, member D*) activés par les ligands membranaires des cellules infectées permettant d'enclencher leur destruction par la sécrétion de granules cytotoxiques (Lanier, 2008; Sun and Lanier, 2011). Elles possèdent donc une fonction cytolytique similaire aux LT CD8⁺ bien qu'elles ne nécessitent pas d'exposition préalable à l'antigène pour être activées (Abel et al., 2018; Tay and Welsh, 1997).

Plusieurs sous-types ont été décrit en fonction de l'expression des récepteurs CD16 et CD56 (Michel et al., 2016). Elles ont également la capacité de réguler l'activité d'autres cellules immunitaires incluant les LT, macrophages et polynucléaires neutrophiles en plus de posséder des fonctions anticancéreuses (Bosmann and Ward, 2013; Minetto et al., 2019; Schuster et al., 2016).

3.2.1.8 Cellules innées lymphoïdes

Récemment, une famille d'effecteurs de la réponse innée dérivant d'un progéniteur lymphoïde commun a été décrite : ce sont les cellules innées lymphoïdes (ILC). Contrairement aux LT et LB, elles ne possèdent pas de récepteurs spécifiques aux antigènes, leur activation repose alors sur des cytokines sécrétées dans l'environnement et des signaux de danger exprimés par les pathogènes ou les cellules épithéliales (Cherrier, 2014; Spits et al., 2013). Trois sous-types (ILC1, 2 et 3) ont été définis en fonction de leurs propriétés et des cytokines produites :

- Les ILC1 regroupent les cellules capables de produire l'IFN- γ mais ne pouvant pas sécréter de cytokines de type Th2 et Th17. Elles participent à la réponse antivirale et antitumorale (Spits et al., 2013, 2016).
- Les ILC2 produisent des cytokines de type Th2 (IL-9, IL-13, etc.) et dépendent des facteurs de transcription GATA-3 (*GATA-binding protein 3*) et ROR- α (*retinoic acid receptor-related orphan receptor- α*) pour leur développement et leur fonction (Lai et

al., 2018). Elles sont nécessaires à l'initiation de la réponse de type Th2 contre les allergènes (Steer et al., 2017). Les ILC2 sont les sous-types les plus exprimés dans le poumon.

- Les ILC3 regroupent les cellules produisant de l'IL-17 et/ou IL-22 et dont le développement et la fonction dépendent du facteur de transcription ROR γ t (*RAR-related orphan receptor gamma*). Les ILC3 participent à la réponse fongique et bactérienne (Spits et al., 2013; Stehle et al., 2018).

A ce jour, la caractérisation des ILC n'en est qu'à son début et de nouvelles fonctionnalités et propriétés ne cessent d'être identifiées.

3.2.2 Recrutement des cellules immunitaires

Au sein du poumon, les cellules épithéliales communiquent avec les cellules immunitaires dans deux processus cruciaux : le développement et la réparation pulmonaire.

3.2.2.1 Développement pulmonaire

L'expression des cellules immunitaires de type 2 incluant les ILC2, les macrophages alvéolaires, les éosinophiles et les basophiles augmente dans le poumon au stade alvéolaire suite à la sécrétion d'IL-33 médiée par les PnII et les fibroblastes suggérant un rôle dans le remodelage et par conséquent dans le développement pulmonaire (Loering et al., 2019). En effet, les macrophages alvéolaires seraient impliqués dans le développement et la régénération pulmonaire en favorisant la survie et la prolifération des PnII. Les macrophages sont également exprimés au début de l'organogenèse et persistent tout au long de ce processus (Blackwell et al., 2011). Ils sont alors appelés macrophages fœtaux et participent à la formation de la population de macrophages résidents retrouvés dans le poumon adulte. Ce phénomène nécessite l'expression de GM-CSF (Guilliams et al., 2013). Les macrophages jouent donc un rôle central dans l'organogenèse pulmonaire et dans le maintien de l'homéostasie en stimulant le remodelage et la réparation tissulaire. Le rôle des ILC2 au cours de l'organogenèse reste encore inconnu cependant ils participeraient au mécanisme d'angiogenèse nécessaire à la formation des alvéoles en produisant du VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*) et de l'IL-13 (Loering et al., 2019).

L'expression de plusieurs cytokines, chimiokines ou facteurs de transcription est nécessaire au développement pulmonaire (Saito et al., 2018). C'est le cas de la superfamille de TGF- β qui est sollicitée au cours de l'organogenèse, et plus précisément au stade pseudoglandulaire. En

effet, il a été montré que les trois isoformes de TGF- β (TGF- β 1, 2 et 3) sont exprimées durant ce processus et que des souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces isoformes présentaient un effondrement des voies distales ou une hypoplasie alvéolaire après la naissance (Kaartinen et al., 1995; Sanford et al., 1997).

3.2.2.2 Immunité pulmonaire

Les différents types de cellules immunitaires résidentes dans le poumon préviennent les infections par les substances et les corps étrangers et participent au maintien de l'homéostasie.

Macrophages

Les macrophages jouent un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale au sein des voies aériennes en phagocytant les particules inhalées et les éléments étrangers en plus de favoriser la sécrétion de cytokines et la présentation antigénique des pathogènes (Cheng et al., 2021; Puttur et al., 2019). En cas de lésion épithéliale, les sécrétions de LPS (lipopolysaccharide) et d'IFN- γ polarisent les macrophages au phénotype M1 qui participent ensuite à la destruction du pathogène. En revanche, durant le processus de réparation, les sécrétions d'IL-4 et IL-13 polarisent les macrophages au phénotype M2 (Byers and Holtzman, 2011). Ils sécrètent alors des cytokines impliquées dans l'activation des cellules Th2 et dans le recrutement des éosinophiles au sein du tissu pulmonaire, et produisent également de l'arginase (une hydrolase impliquée dans la formation de collagène) au niveau de la zone endommagée. Tous ces mécanismes participent à la réparation tissulaire en activant les myofibroblastes et en favorisant la production de la matrice extracellulaire et la prolifération des cellules épithéliales dont les PnII (Cheng et al., 2021; Hung et al., 2019; Puttur et al., 2019). Les cytokines sécrétées par les M2 contribuent également à la régulation de l'inflammation afin d'empêcher le développement d'une inflammation chronique.

Cellules NK

Les cellules NK interviennent dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Des études ont montré qu'en cas d'infection pulmonaire par le virus de la grippe A (Influenza A), les cellules NK activent leur processus de dégranulation et sécrètent du granzyme B et de l'IFN- γ impliqués dans la destruction des macrophages infectés (Ardain et al., 2020; Cooper et al., 2018).

Cellules dendritiques

Les réponses immunitaires médiées par les DC dépendent du type d'infection. Chez des souris exposées aux acariens domestiques, les cDC2 prennent en charge les allergènes et sont responsables des réponses Th2 et Th17 en sécrétant des cytokines, des chimiokines et des molécules co-stimulantes (Plantinga et al., 2013; Zhou et al., 2014). Chez des individus asthmatiques, la population de cDC1 et cDC2 est augmentée et stimule les réponses Th2 et Th9 après contact avec des allergènes (Chairakaki et al., 2018). Les cDC exprimant le récepteur CD103 gouvernent la formation de LT CD8⁺ tandis que les cDC exprimant les CD11b sont responsables de la formation de LT mémoires dans un contexte d'infection par Influenza (Hemann et al., 2019; Kim et al., 2014). Enfin, les pDCs favorisent l'arrêt de la réplication virale en sécrétant de l'IFN de type I. Les DC rendent également possible le recrutement de neutrophiles, cellules NK, LT cytotoxiques et mémoires au site d'infection (Cook and MacDonald, 2016). Les DC possèdent donc des propriétés leur permettant de faire face à une multitude d'agents étrangers et de maintenir l'homéostasie pulmonaire.

Lymphocytes

Les LTmr exprimés dans l'épithélium pulmonaire interviennent en réponse à des agressions extérieures diverses. Les LT CD4⁺ mémoires et circulants spécifiques de la *Salmonella* sont produits en grande quantité chez des souris vaccinées contre la *Salmonella* et sont nécessaires à une protection efficace contre cette bactérie (Benoun et al., 2018). Les LT CD8⁺ mémoires agissent dès les premiers instants d'une infection par le virus Influenza A et sont remplacés par la suite par les LT CD8⁺ circulants (Suarez-Ramirez et al., 2019).

Les LB mémoires sont très efficaces en cas de réinfection par des agents étrangers. Des études ont montré que les LB mémoires résidents dans le poumon donnent lieu à une réponse humorale rapide par la différenciation en plasmocytes et la sécrétion d'anticorps dirigés spécifiquement contre le virus influenza en cas de réinfection par ce virus chez la souris (Allie et al., 2019; Onodera et al., 2012).

Cellules lymphoïdes innées

Les ILC jouent un rôle majeur dans le maintien des conditions physiologiques, la réparation tissulaire et la régulation de l'inflammation. Au cours d'une infection, l'épithélium endommagé et les macrophages alvéolaires libèrent des DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) activant les ILC2 (Stehle et al., 2018). Ces derniers stimulent alors la prolifération cellulaire et la sécrétion d'IL-5 et IL-13 qui favorisent le recrutement des

éosinophiles, stimulent la production de mucus des cellules caliciformes et affectent la contraction des cellules musculaires lisses favorisant la protection contre les pathogènes (Finkelman et al., 2004; Mindt et al., 2018; Van Dyken et al., 2016). La production d'IL-1 β et IL-27 stimule l'activation des ILC3 qui sécrètent à leur tour de l'IL-22 impliquée dans l'immunité antibactérienne et la réparation tissulaire (Stehle et al., 2018).

Cellules épithéliales

Pour finir, les cellules épithéliales interviennent également dans le mécanisme de réparation lors d'une lésion tissulaire. Elles sécrètent des peptides antimicrobiens (défensine notamment) qui ciblent et détruisent les pathogènes ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-8, IP-10, RANTES et éotaxine qui permettent d'une part de recruter les neutrophiles et les éosinophiles sur le lieu d'infection et d'autre part d'activer les cellules NK (Invernizzi et al., 2020; Müller and Jaspers, 2012). En cas d'infection virale et en plus des cytokines exprimées, les cellules épithéliales peuvent entrer en état de stress. Elles s'adaptent alors au changement de leur environnement en modifiant l'expression de certains gènes et en sécrétant de nombreuses protéines afin d'éviter l'apparition de dommages ou même la mort cellulaire. Parmi les protéines exprimées à la membrane cellulaire, on retrouve MICA et MICB (*MHC class I chain-related proteins A and B*) et ULBP1-6 (*UL16-binding proteins 1-6*) qui sont les ligands des récepteurs NKG2D exprimés par différentes populations de lymphocytes (cellules NK ou LT CD8+ $\alpha\beta$) (Antonangeli et al., 2017). Ces dernières enclenchent alors la destruction des cellules cibles (Cong and Wei, 2019; Culley, 2009).

Dans ce chapitre, nous avons vu que le poumon est un organe complexe faisant collaborer de nombreuses populations de cellules et dont la fonction principale de respiration est assurée par les interactions de ses épithélia avec les structures environnantes. Plusieurs mécanismes cellulaires sont mis en œuvre afin de garantir la plasticité cellulaire et le maintien des conditions physiologiques. En cas de danger et d'agressions extérieures, le poumon est capable de se défendre et d'initier les procédures de réparation et d'éliminations des agents étrangers. Le système inflammatoire est l'un des acteurs majeurs participant à la mise en place et à l'efficacité de ces mécanismes de défenses. Cependant, d'autres systèmes contribuent également à l'homéostasie pulmonaire : c'est le cas du système cholinergique.

CHAPITRE II : LE SYSTEME CHOLINERGIQUE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE

Le système cholinergique regroupe un ensemble d'enzymes capables de produire et de dégrader l'acétylcholine (ACh), et de récepteurs qui après fixation d'un agoniste induisent une neurotransmission chimique. L'ACh est un neurotransmetteur produit dans les terminaisons axonales et synthétisé pour la première fois par Von Baeyer en 1867 (Burgen, 1995). Il a initialement été décrit dans le système nerveux avant d'être mis en évidence dans la majorité des tissus humains et chez d'autres mammifères, des plantes, des champignons ou encore des bactéries témoignant de son rôle crucial dans le développement et le fonctionnement biologique (Dale and Dudley, 1929; Wessler and Kirkpatrick, 2008).

1. Le système cholinergique neuronal

L'appareil respiratoire est innervé par de nombreux nerfs autonomes afférents et efférents régulant plusieurs aspects de la fonction cellulaire incluant la tonicité des muscles lisses, le diamètre des bronches et l'inflammation (Kummer and Krasteva-Christ, 2014; van der Velden and Hulsmann, 1999). La régulation de cette homéostasie cellulaire fait intervenir le système nerveux autonome constitué des nerfs sympathiques et parasympathiques. L'ACh en est le neurotransmetteur endogène majoritaire. Dans les cellules nerveuses, l'ACh est synthétisée dans l'axoplasme par la choline transférase (ChAT) à partir de la choline et de l'acétyl-CoA d'origine mitochondriale (**Figure 12 ►**). Le transporteur de choline à haute affinité (CHT1) intervient dans ce mécanisme de synthèse en permettant l'entrée de la choline dans les cellules neuronales. Par la suite, l'ACh est transférée dans de petites vésicules synaptiques au niveau de la terminaison de l'axone par l'action du transporteur d'ACh vésiculaire (VACHT), qui agit comme un échangeur H^+/ACh . Cela permet alors la dépolarisation du nerf terminal et aboutit à la libération de l'ACh dans l'espace extracellulaire par exocytose. Une fois libérée, l'ACh peut interagir avec deux classes de récepteurs : les récepteurs muscariniques métabotropiques couplés aux protéines G et les récepteurs nicotiques à l'ACh formant des canaux ioniques. Néanmoins, l'ACh est rapidement clivée en acétate et choline à partir de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) synthétisée directement par les neurones assurant ainsi l'équilibre entre la libération d'ACh et sa dégradation (pour revue, Kummer et al., 2008).

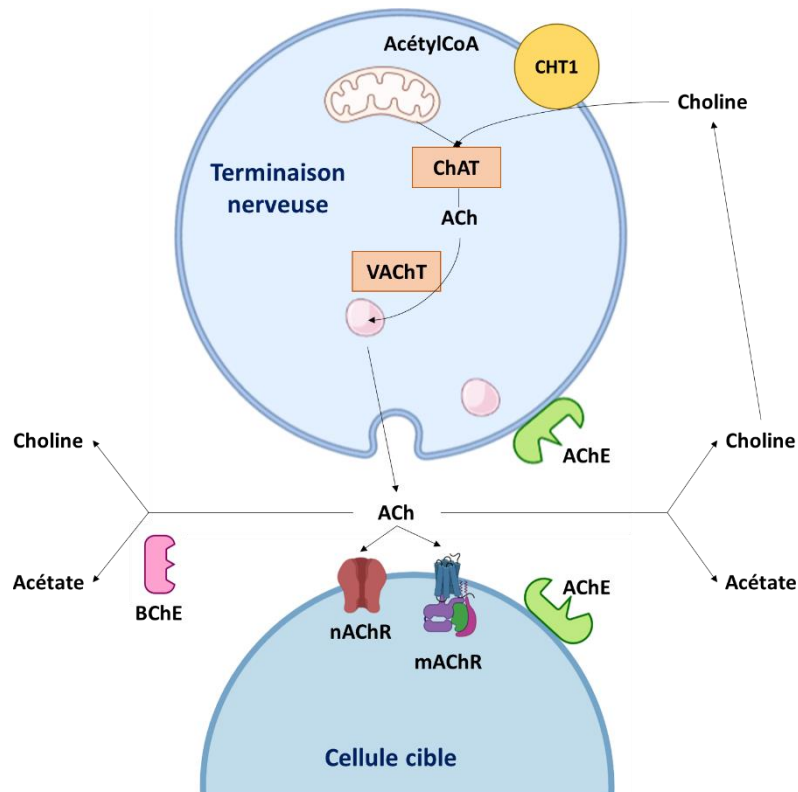


Figure 12 : Synthèse, libération et dégradation de l'ACh dans les cellules neuronales

(Kummer et al., 2008)

2. Le système cholinergique non-neuronal

La présence du système cholinergique en dehors du système nerveux est associée à la régulation de mécanismes biologiques incluant la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que la maintenance des contacts cellule-cellule (Kurzen et al., 2007; Wessler and Kirkpatrick, 2008).

2.1 Synthèse et libération de l'acétylcholine

L'ACh est également synthétisée par diverses cellules non-neuronales telles que les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales des voies aériennes (Wessler and Kirkpatrick, 2008). Toutefois, le mécanisme de synthèse et de libération de l'ACh diffère de celui des cellules neuronales, notamment par l'absence de nombreux transporteurs et enzymes. De même, la quantité d'ACh produit dans les voies aériennes est faible en comparaison de la production neuronale (Koarai and Ichinose, 2018; Kummer et al., 2008). Ainsi, le transporteur de choline (CHT1) n'étant que faiblement exprimé par les cellules cholinergiques non-neuronales, l'acétyltransférase carnitine (CarAT) constitue un mode

alternatif afin de permettre la synthèse de l'ACh par les fibres musculaires squelettiques (**Figure 13 ▼**) (Tuček, 1982). Le transporteur vésiculaire d'ACh (VAcHT) est fréquemment absent des cellules non-neuronales. L'ACh nouvellement produit peut alors directement être synthétisée dans le cytoplasme par l'intermédiaire de transporteurs membranaires organiques OCT1,2 et 3 dont l'action dépend généralement du gradient de concentration et du potentiel de membrane (Kummer and Krasteva-Christ, 2014; Wessler et al., 2001). Une dernière voie de libération décrite est celle du médiatophore, un protéolipide retrouvé à l'origine dans les membranes plasmiques des cellules de l'organe électrique de *torpedo marmorata*, où il participe à la libération de l'ACh directement du cytoplasme ou par formation de pores entre les vésicules synaptiques et la membrane plasmique (Fujii et al., 2012). Par la suite, le clivage de l'ACh peut être réalisé par des estérases, dont la butyrylcholinestérase (BChE), mais moins efficacement que l'AChE (Darvesh et al., 2003).

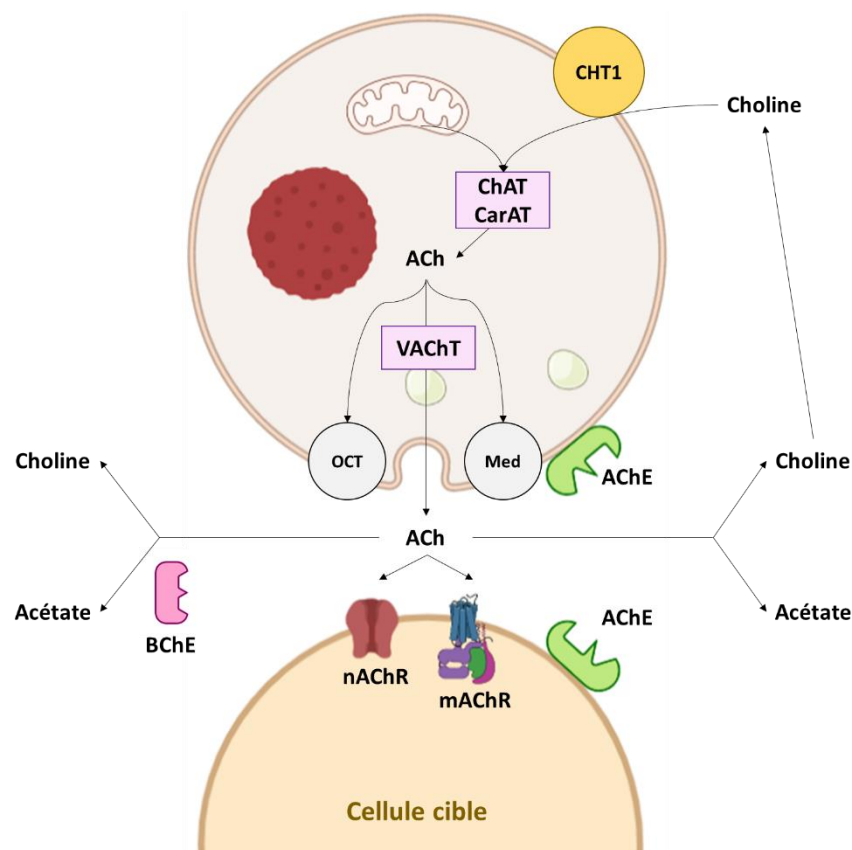


Figure 13 : Synthèse, libération et dégradation de l'ACh dans les cellules non-neuronales

(Kummer et al., 2008)

2.2 Fonction de l'acétylcholine dans les voies aériennes

La libération de l'ACh dans les voies aériennes stimule les récepteurs muscariniques et nicotiques des cellules épithéliales à l'origine de cette production (boucle autocrine) ou des cellules épithéliales avoisinantes (boucle paracrine).

La distribution subcellulaire de la machinerie à l'ACh diffère dans les populations cellulaires. Ainsi, dans les cellules ciliées et sécrétrices, les enzymes participant à la synthèse et la libération de l'ACh sont situées au pôle apical suggérant une libération de l'ACh dans la lumière bronchique et plus précisément dans le LPC qui lui servirait de milieu de transport (**Figure 14 ▼**) (Kummer and Krasteva-Christ, 2014). Une fois sécrétée, l'ACh interagit avec les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiques à l'ACh et régule de multiples mécanismes cellulaires incluant la prolifération, la sécrétion de mucus, la fréquence du battement ciliaire et la libération d'IL-8 (Kummer et al., 2008; Saracino et al., 2013). Au contraire, pour les cellules neuroendocrines et basales exprimant les enzymes nécessaires à la synthèse et à la libération de l'ACh au pôle basal, la libération est destinée au tissu conjonctif sous-jacent. Ce neurotransmetteur permet ensuite de contrôler la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires, la sécrétion des glandes sous-muqueuses, ou la tonicité des muscles lisses en fonction du type de récepteur stimulé. Bien que nécessaire à l'homéostasie cellulaire des voies aériennes, l'ACh peut également participer à l'inflammation et au remodelage observés dans de nombreuses pathologies pulmonaires (Koarai and Ichinose, 2018).

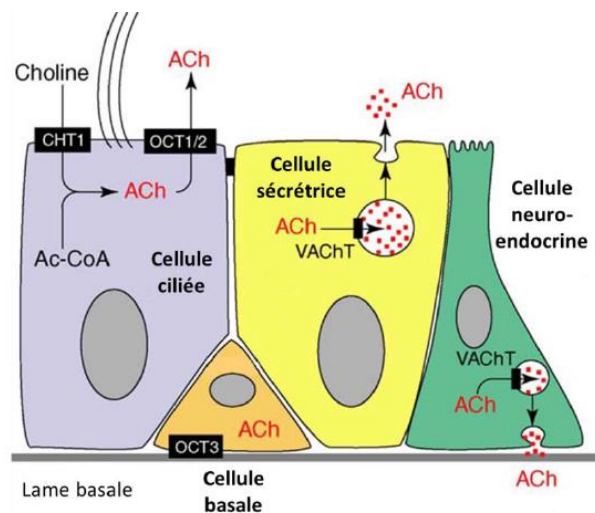


Figure 14 : Mécanismes de libération de l'acétylcholine dans les cellules épithéliales respiratoires

(Kummer et al., 2008)

3. Les récepteurs à l'acétylcholine

Il existe deux grands types de récepteurs pouvant lier l'ACh : les récepteurs muscariniques métabotropiques et les récepteurs nicotiniques ionotropiques. Ils sont exprimés par les cellules neuronales et les cellules non-neuronales.

3.1 Les récepteurs muscariniques métabotropiques

Les récepteurs muscariniques métabotropiques (mAChRs) appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). On distingue 5 sous-types nommés M₁ à M₅ dont la distribution dépend de l'organe. Après activation, les mAChRs se couplent aux protéines G, des protéines hétérotrimériques liant la guanosine triphosphate afin de réguler des messagers secondaires et permettre l'ouverture de canaux ioniques (Christopoulos et al., 1998; Eglen, 2006). Ces récepteurs sont activés par l'ACh mais tiennent leur nom de leur agoniste originellement décrit, la muscarine, un alcaloïde toxique produit par *Amanita Muscaria* également retrouvé chez d'autres champignons tels que *Mycena* ou encore *Inocybe* (Eglen, 2005; Kosentka et al., 2013). En revanche, elles sont inhibées par l'atropine, une toxine issue de la plante *Atropa belladonna* (Albuquerque et al., 2009).

D'un point de vue fonctionnel, les mAChRs (principalement M₁) sont exprimés dans le système nerveux et régulent plusieurs fonctions neurologiques telles que le mouvement, la cognition et l'apprentissage (Jiang et al., 2014; Moran et al., 2019). Dans le poumon, ces récepteurs régulent la prolifération cellulaire et la sécrétion de mucus (Kummer et al., 2008) et participent à l'émergence de pathologies respiratoires. Par exemple, les sous-unité M₂ et M₃ sont associées à la bronchoconstriction du muscle lisse observée dans l'asthme et la BPCO et contribueraient au remodelage des voies aériennes (fibrose bronchique et hypersécrétion de mucus) (Billington and Penn, 2003; Matthiesen et al., 2006; Pera and Penn, 2014). Enfin, les mAChRs sont exprimés par les cellules immunitaires et régulent leur production de cytokines (IFN- γ , IL-6) et d'anticorps (IgG₁) en plus d'enclencher des voies de signalisations cellulaires et d'augmenter l'expression de certains gènes (c-fos des LT) par influx calcique (Fujii and Kawashima, 2000; Fujii et al., 2007).

3.2 Les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine

Les récepteurs nicotiniques à l'ACh (nAChRs) sont des récepteurs à canaux ioniques (Dani, 2015). Ils sont activés de façon endogène par l'ACh mais tiennent leur nom de leur agoniste originellement décrit, la nicotine, un alcaloïde toxique issu de la plante de tabac *Nicotiana tabacum*. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs à canaux ionotropiques à boucle cystéine (Zoli et al., 2018).

3.2.1 Structure des récepteurs nicotiniques

Les nAChRs sont des protéines transmembranaires de masse moléculaire d'environ 290 kDa. Elles présentent une structure pentamérique, c'est-à-dire composée de 5 sous-unités distribuées de manière symétrique en délimitant un pore central rempli d'eau (Cecchini and Changeux, 2015). Les nAChRs peuvent être organisés en homopentamères (5 sous-unités identiques) ou en hétéropentamères (au moins une sous-unité α et β) (**Figure 15 ▼**). La fixation d'un ligand sur ces récepteurs autorise les flux ioniques entrants et sortants.

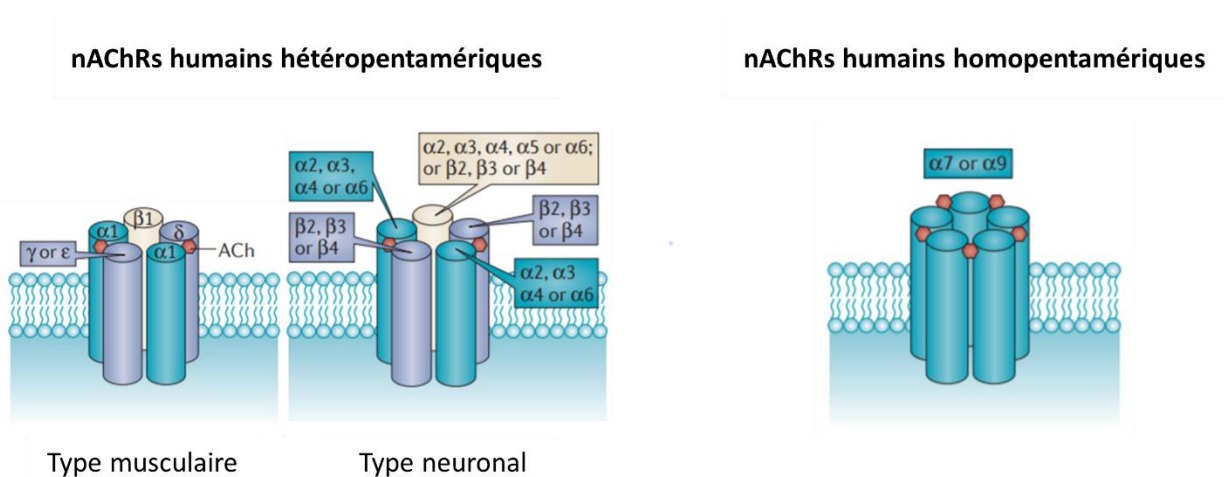


Figure 15 : Composition des nAChRs

(Grando, 2014)

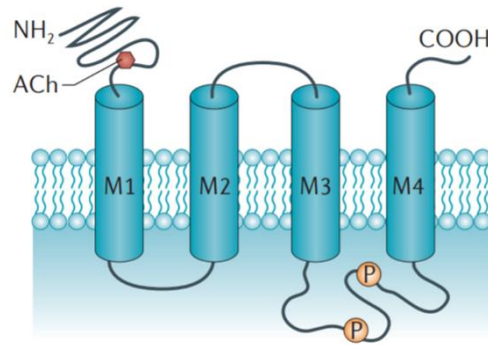


Figure 16 : Structure d'une sous-unité de nAChRs

(Grando, 2014)

Chez les mammifères, il existe 16 sous-unités codées par une famille multigénique appelée *CHRN* : $\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, δ , ϵ et γ (la sous-unité $\alpha 8$ étant uniquement retrouvée chez les oiseaux) (Dani, 2015; Dash et al., 2014). Leur identification a été rendue possible grâce aux méthodes de clonage moléculaire. Chaque sous-unité du récepteur est composée d'un long domaine extracellulaire, de plusieurs domaines transmembranaires et d'un domaine intracellulaire (**Figure 16 ▲**) (Kalamida et al., 2007) :

- Le large domaine amino-terminal extracellulaire est composé de 210 à 220 acides aminés et contient un ou plusieurs sites de glycosylation qui contribuent à la fixation du ligand. Au niveau des sous-unités α , la présence de deux cystéines adjacentes en position 192 et 193 partageant un pont disulfure, forme la région de fixation des ligands (agonistes et antagonistes). La présence de deux sous-unités α est nécessaire pour obtenir un récepteur fonctionnel. De plus, chaque site de liaison est formé par une poche à l'interface entre deux sous-unités adjacentes (**Figure 17 ►**) (Dani, 2015; Dennis et al., 1988; Galzi and Changeux, 1995; Kao et al., 1984) ;
- Les domaines transmembranaires sont composés de quatre segments transmembranaires hydrophobes (M1-M4) d'une taille allant de 15 à 20 acides aminés chacun et contenant deux boucles hydrophiles de petites tailles reliant les segments M1-M2 et M2-M3 (Huganir and Greengardt, 1990) ;
- Une large boucle intracellulaire qui se compose de 100 à 150 résidus entre les segments M3 et M4. Elle contient les sites de phosphorylation. C'est la région la plus variable entre les sous-unités. Les modifications intracellulaires induites par les flux ioniques diffèrent entre elles (Dani, 2015) ;
- Une région C-terminale variable composée d'un segment extracellulaire hydrophile d'une taille allant de 4 à 28 acides aminés.

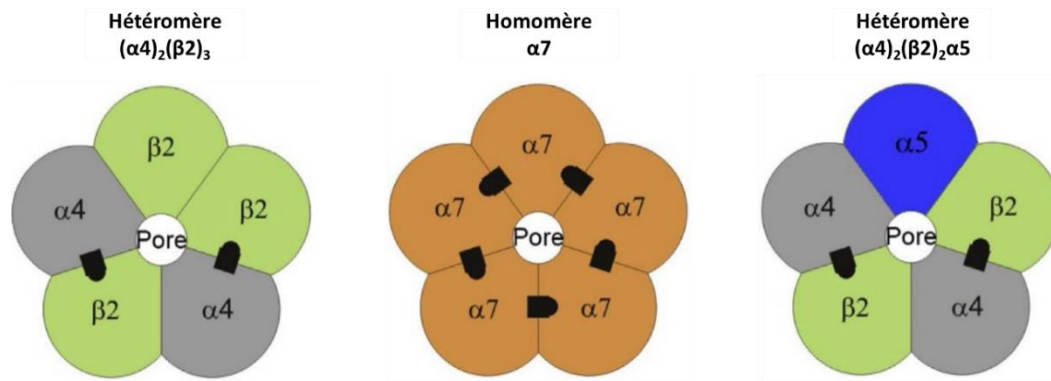


Figure 17 : Représentation de l'arrangement des sous-unités des nAChRs avec leur site de fixation

(Dani et al., 2015)

3.2.2 Diversité des récepteurs nicotiques

Il existe une grande hétérogénéité des nAChRs par l'arrangement spécifique en sous-unités influençant les propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs. Deux types principaux de récepteurs ont été décrits : les nAChRs musculaires et les nAChRs neuronaux.

Principalement exprimés par les muscles squelettiques, les nAChRs de type musculaire sont uniquement composés de 5 types de sous-unités et sont généralement assemblés à partir de $2(\alpha_1)/\beta_1/\delta/\gamma$ ou de $2(\alpha_1)/\beta_1/\delta/\epsilon$ en fonction de l'état d'innervation des fibres musculaires. Ils effectuent la transmission neuromusculaire (Fujii et al., 2017; Grassi and Fucile, 2020).

Les nAChRs de type neuronaux sont quant à eux assemblés à partir des sous-unités α_2 – α_7 , α_9 – α_{10} , et β_2 – β_4 . Les homomères α_7 et les hétéromères α_4/β_2^* (* signifiant qu'une autre sous-unité peut être présente d'après la nomenclature officielle des nAChRs) sont les sous-types neuronaux prédominants bien que d'autres combinaisons soient possibles telles que les hétéromères α_2/α_6^* ou les homomères α_9 (Bertrand and Terry, 2018; Lukas et al., 1999; Zoli et al., 2018). Certaines sous-unités sont dites « accessoires » car elles ne peuvent pas à elles seules former un récepteur fonctionnel et ne participent pas non plus à la fixation du ligand, néanmoins elles contribuent à la régulation et à la fonction du récepteur. C'est le cas de la sous-unité α_5 qui, associée à $(\alpha_4\beta_2)_2$, augmente la perméabilité calcique et le taux de calcium intracellulaire, améliore l'efficacité du ligand et la libération des neurotransmetteurs en comparaison des récepteurs $\alpha_4\beta_2^*$ (**Figure 17 ▲**). En revanche, l'association de la sous-unité α_5 avec les récepteurs $(\alpha_3\beta_4)_2$ diminue le taux de calcium intracellulaire ainsi que la libération de neurotransmetteurs (Scholze and Huck, 2020).

3.2.3 Activation et désensibilisation des récepteurs nicotiniques

Les nAChRs possèdent 4 états conformationnels définis par cristallographie. Plusieurs paramètres incluant le passage d'un état à l'autre, la durée d'ouverture du canal, la sélectivité ionique ainsi que l'intensité de la dépolarisation dépendent de la nature du ligand et de la composition des récepteurs en sous-unités (**Figure 18 ▼**) (Changeux and Edelstein, 1998; Dani, 2015).

- **Etat de repos** : En l'absence de ligand, les sites de liaison sont inoccupés. Le pore est donc fermé et il n'y a pas de flux ioniques.
- **Etat activé** : La fixation d'un ligand endogène ou exogène autorise un changement conformationnel du récepteur permettant l'ouverture du canal et les échanges ioniques. Les nAChRs sont perméables aux cations monovalents et divalents, principalement les ions Ca^{2+} et Na^+ (influx) et K^+ (efflux) (Zoli et al., 2018).
- **Etat désensibilisé intermédiaire** : Une exposition prolongée du récepteur avec le ligand induit une désensibilisation du récepteur, ce dernier est alors réfractaire à toute autre molécule. Le récepteur possède une forte affinité pour le ligand (Auerbach, 2015).
- **Etat désensibilisé final** : A ce stade, le récepteur est toujours en période réfractaire, et présente une forte affinité pour le ligand. C'est un état où le récepteur ne peut pas entraîner de réponse et nécessite une période de récupération avant de repasser à l'état actif ou de repos. Cette période de récupération varie en fonction de la composition des récepteurs. Par exemple, les homomères nAChR α 7 se désensibilisent très rapidement (millisecondes) (Couturier et al., 1990) tandis que les sous-unités ne possédant pas d' α 7 se désensibilisent plus lentement (secondes) (Giniatullin et al., 2005).

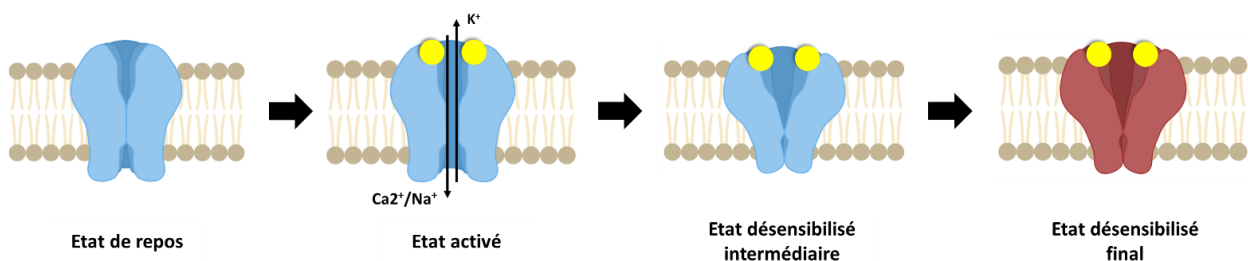


Figure 18 : Modèle d'activation et de désensibilisation des nAChRs

(D'après Corradi et Bouzat, 2016 ; Cecchini et Changeux, 2015)

3.2.4 Agonistes et antagonistes des récepteurs nicotiques

Les nAChRs peuvent fixer des molécules mimant l'effet du ligand physiologique (agonistes) ou au contraire, des molécules qui diminuent ou bloquent l'effet de ce ligand tout en empêchant sa fixation (antagonistes).

3.2.4.1 Principaux agonistes

On distingue les agonistes endogènes, naturellement produit par l'organisme, et les agonistes exogènes, provenant du milieu extérieur.

Endogènes

L'acétylcholine

Ce neurotransmetteur est l'agoniste endogène des mAChRs et des nAChRs. Il est exprimé par plusieurs types cellulaires neuronaux et non-neuronaux et participe à la régulation de nombreux processus cellulaires.

Choline

Ce précurseur de la biosynthèse de l'ACh est un agoniste sélectif des nAChRs $\alpha 7$. Des études supplémentaires doivent être réalisées afin de déterminer si cette molécule affecte les réponses inflammatoires médiées par les nAChRs $\alpha 7$ (Kusuda et al., 2020; Velazquez et al., 2019).

Exogènes

La nicotine

C'est l'agoniste le plus décrit. La nicotine est un alcaloïde toxique produit par les plantes de tabac leur servant d'insecticide (Tomizawa and Casida, 2003). Bien que les nAChRs soient exprimées par les cellules musculaires, la nicotine y est moins sensible en comparaison des nAChRs neuronaux (Albuquerque et al., 2009). La nicotine présente une haute affinité pour les récepteurs $\alpha 4\beta 2^*$ et son affinité pour les nAChRs est globalement plus élevée que celle de l'ACh (Gotti et al., 1997; Schuller, 2007). La fixation de la nicotine sur les nAChRs entraîne la libération de nombreux neurotransmetteurs tels que la dopamine et la noradrénaline qui ont une influence directe sur le comportement (anxiété, mémoire, apprentissage) par la modification de processus intracellulaires (Decker et al., 1995). Contrairement à l'ACh ou à d'autres ligands endogènes, la nicotine n'est pas rapidement dégradée. Par conséquent, son accumulation dans le système nerveux en raison d'une exposition continue à la fumée de cigarette conduit à une

activation puis à une saturation du récepteur qui aboutit à son état désensibilisé permanent. Ce phénomène diminue alors le nombre de récepteurs fonctionnels et empêche ainsi la fixation de l'ACh (Wittenberg et al., 2020).

N-Nitrosornicotine (NNN)

Cette nitrosamine carcinogène est formée à partir de la nicotine par le mécanisme de nitrosation et possède une structure similaire à ce dernier (Schuller, 2007).

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)

C'est une autre nitrosamine carcinogène dérivée de la nicotine qui présente une grande affinité pour les récepteurs nAChRs $\alpha 7$ (Schuller, 2007).

Sofinicine

Cette molécule est un agoniste sélectif des récepteurs $\alpha 4\beta 2^*$. Contrairement aux agonistes précédemment décrits, elle n'est pas naturelle mais a été conçue par l'homme afin de développer un traitement contre les troubles du déficit et de l'attention avec ou sans hyperactivité (Fleisher and McGough, 2014).

3.2.4.2 Principaux antagonistes

L' α -bungarotoxine et la κ -bungarotoxine

Ces neurotoxines sont des antagonistes compétitifs isolés à partir du venin du serpent *Bungarus Multicintus* (Chiappinelli and Lee, 1985). L' α -bungarotoxine possède une haute affinité pour les homomères neuronaux $\alpha 7$ et $\alpha 9$ ainsi que pour les deux nAChRs de type musculaire $2(\alpha 1)/\beta 1/\delta/\gamma$ et $2(\alpha 1)/\beta 1/\delta/\epsilon$ (Hannan et al., 2015). La κ -bungarotoxine, quant à elle, présente une haute sélectivité pour les nAChRs $\alpha 3\beta 2^*$ faiblement réversible (Luetje et al., 1998).

Mécamylamine

Il s'agit d'une molécule non-sélective et non-compétitive appartenant à la classe de drogues appelées les bloqueurs ganglionnaires, couramment utilisée par le passé dans le traitement de l'hypertension. Après fixation sur le nAChR dans le système périphérique et central, cette molécule augmente la durée d'activation des récepteurs et induit une diminution progressive de la pression sanguine. Ces dernières années, l'effet du mécamylamine sur les nAChRs a été beaucoup étudié dans l'espoir d'établir un traitement contre l'addiction à la nicotine (Bacher et al., 2009; Crooks et al., 2014).

L' α -conotoxine

Les α -conotoxines sont des antagonistes compétitifs des nAChRs retrouvés dans de nombreux coquillages marins du genre *Conus*. Ces peptides neurotoxiques possèdent une haute sélectivité pour les nAChRs $\alpha 3\beta 2^*$ (Arias and Blanton, 2000; Corringer et al., 2000).

3.2.5 Fonctions pulmonaires des récepteurs nicotiques

Le système cholinergique et les nAChRs sont exprimés par les cellules des voies aériennes et régulent divers mécanismes cellulaires afin de maintenir l'homéostasie.

3.2.5.1 Morphogenèse pulmonaire

Les nAChRs sont exprimés au cours du développement pulmonaire par différents types cellulaires. Néanmoins, deux sous-unités sont principalement impliquées dans ce processus : la sous-unité $\alpha 5$ et les récepteurs homomériques $\alpha 7$, leur expression étant contrôlée par la protéine TTF-1. La sous-unité $\alpha 5$ est exprimée en position distale au cours du processus de développement pulmonaire (cellules ciliées, club et alvéolaires) tandis que son expression dans les voies aériennes proximales varie selon la localisation et la période de développement (Porter et al., 2011). D'un point de vue fonctionnel, l'expression de l' $\alpha 5$ est associée à la différenciation cellulaire et serait régulée par FoxA2 et Gata-6, des facteurs de transcription également important pour la morphogenèse pulmonaire (Porter et al., 2011; Reynolds et al., 2010). En ce qui concerne les récepteurs homomériques $\alpha 7$, leur expression est augmentée par TTF-1 mais diminuée par Egr1 (*Early growth response protein 1*) afin de garantir une expression spatio-temporelle spécifique en fonction de la période de développement (Reynolds and Hoidal, 2005). Toutefois, ces récepteurs sont également impliqués dans l'altération de la fonction pulmonaire et dans la vulnérabilité aux maladies respiratoires à la suite d'une exposition prolongée à la fumée de cigarette durant la grossesse (Tager et al., 1993; Taylor and Wadsworth, 1987). En effet, la stimulation récurrente des récepteurs nicotiques, dont l'homomérique $\alpha 7$, les activent en continu avant d'induire leur inactivation permanente qui s'avère être néfaste pour le développement pulmonaire (Wang et al., 1998).

3.2.5.2 Régénération épithéliale

Etant donnée l'implication des nAChRs dans la régulation des flux ioniques en association avec la prolifération, des sous-unités avec $\alpha 7$ en tête de file ont fait l'objet de recherches expérimentales dans le système nerveux et dans les autres tissus non-neuronaux. Concernant le système pulmonaire, le rôle de l' $\alpha 7$ dans la régénération de l'épithélium respiratoire a été caractérisé sur des tissus bronchiques humains après lésion. Il a été montré que les cellules basales sont capables d'enclencher le mécanisme de réparation en migrant et recouvrant progressivement la zone lésée en quelques jours et que le récepteur $\alpha 7$ est exprimé par ces cellules tout au long de ce processus (Maouche et al., 2009). De plus, l'exposition de ces cultures à l' α -bungarotoxine est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire et l'apparition d'un remodelage (hyperplasie des cellules basales et métaplasie squameuse). *In vivo*, la régénération épithéliale est retardée chez les souris KO $\alpha 7$ et cela se traduit également par la présence d'une hyperplasie des cellules basales (Maouche et al., 2009). L'ACh et la nicotine favorisent la réparation tissulaire en activant les nAChRs ($\alpha 3$)₂($\beta 2$)₂ $\alpha 5$ (Tournier et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les nAChRs, notamment l' $\alpha 7$, sont des acteurs fondamentaux dans la plasticité des cellules épithéliales pulmonaires.

3.2.5.3 Régulation de l'inflammation

Le système cholinergique intervient dans la régulation de la réponse inflammatoire. Les cellules du système immunitaires expriment plusieurs composants du système cholinergique, à savoir les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ACh, les mAChRs et les nAChRs. Parmi ces derniers, les cellules de l'immunité expriment principalement les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ et $\alpha 10$ qui participent à la régulation de la fonction immunitaire (Fujii et al., 2017; Grando et al., 2015). Ainsi, les macrophages et les DC ont la capacité de synthétiser l'ACh à la suite de l'activation du LPS au cours d'une réaction inflammatoire. L'ACh agit ensuite de manière autocrine et paracrine, active la sous-unité $\alpha 7$ des macrophages et diminue l'expression et la libération de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α . En revanche, il a été montré que la production de TNF- α est augmentée chez des souris KO pour l' $\alpha 7$ en comparaison des souris WT (Fujii et al., 2017; Wang et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la sous-unité $\alpha 7$ joue un rôle fondamental dans la modulation de la réponse inflammatoire. De façon intéressante, l'ACh libérée par les LT active leurs récepteurs membranaires permettant l'augmentation de Ca^{2+} et l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-2 ainsi que leur propre prolifération (Mashimo et al., 2017). Enfin, le développement des LB dans la moelle osseuse ainsi que leur activation et leur réponse humorale sont contrôlés par les récepteurs $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2^*$ (Skok et al., 2005, 2006).

3.2.5.4 Pathologies respiratoires

La fumée de cigarette est incontestablement un facteur de risque pour l'émergence de maladies respiratoires. La nicotine, qui représente le principal composé addictif de la cigarette, est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une résistance à l'apoptose médiée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) favorisant ainsi la progression tumorale. Ce phénomène est rendu possible grâce à son interaction avec les récepteurs mitochondriaux $\alpha 7$ et $\beta 4$ (Chernyavsky et al., 2015; Schuller, 2007). Il a été montré que l'activation des nAChRs par la nicotine réduit l'efficacité de traitements médicamenteux dans le cas du cancer pulmonaire (erlotinib, sunitinib) en activant des voies de signalisation (EGFR/AKT) et des protéines (SIRT1/3/5-7) qui favorisent la survie des cellules cancéreuses (Cheng et al., 2020). De plus, les nitrosamines, des dérivées de la nicotine, sont favorables à l'émergence du cancer du poumon en induisant la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs (Schaal and Chellappan, 2014). En présence de nicotine, les cellules de la lignée alvéolaire A549 (adénocarcinome humain) affichent une migration et une invasion cellulaire altérées associées à une augmentation de l'expression de E-cadhérine lorsque le gène *CHRNA5* est invalidé. Ces données suggèrent que l' $\alpha 5$ participe au développement du cancer pulmonaire (Sun and Ma, 2015). Enfin, l'activation de la sous-unité $\alpha 5$ médiée par de faibles doses de nicotine favorise l'expression de la voie EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et promeut par conséquent la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire renforçant les conclusions déjà établies par les études précédentes quant à l'importance des nAChRs dans l'émergence de pathologies respiratoires (Wang et al., 2020).

Les nAChRs et leurs ligands sont donc très importants pour la réalisation de multiples mécanismes biologiques pulmonaires et leur fonction peut être détournée en faveur de l'émergence de maladies respiratoires. Récemment, de nombreux variants des nAChRs ont été découverts et certains d'entre eux participeraient à la promotion de divers processus pathologiques.

4. Polymorphismes des nAChRs

4.1 Généralités

Les mutations génétiques sont des modifications d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques du génome d'un organisme, aussi bien humain que viral. Elles sont la conséquence d'une exposition à des produits chimiques et de la radiation ultraviolet (facteurs exogènes), ou d'un défaut dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN (facteurs endogènes) (Paul et al., 2019). Ces variations génétiques sont des mécanismes fondamentaux ayant permis le développement de la vie et l'adaptation des espèces à leur environnement. Parmi eux les polymorphismes dont la forme la plus fréquemment observée est le polymorphisme nucléotidique simple (SNP de l'anglais *Single-Nucleotide Polymorphism*) caractérisé par le changement d'un nucléotide. On en dénombre trois types : (i) les polymorphismes dits « de hasard » (rSNP de l'anglais *random polymorphisms*) retrouvés dans des régions non-codantes représentant environ 98,5% du génome et qui n'ont, par conséquent, aucun effet sur l'expression génique, (ii) les polymorphismes périphériques (pSNP de l'anglais *peripheral polymorphisms*) dont la modification affecte les régions régulatrices et peut donc influencer sur les niveaux d'expressions et la structure de la protéine résultante, (iii) et les SNP codants (cSNP de l'anglais *coding polymorphism*) retrouvés dans une partie codante de l'ADN. Ils peuvent ainsi modifier la séquence en acides aminés de la protéine finale qui peut dans certains cas être impliquée dans des mécanismes pathologiques (Saracino et al., 2013).

4.2 Les polymorphismes nucléotidiques des nAChRs

Ces dernières années ont été marquées par l'émergence des études d'associations pangénomiques (GWAS de l'anglais *Genome-Wide Association Study*). Ce sont des analyses de diverses variations génétiques qui sont effectuées chez plusieurs individus d'une même espèce afin d'établir un lien entre leur expression et des observations phénotypiques associées à des maladies (Visscher et al., 2012). Ces études ont permis de mettre en évidence une multitude de variants génétiques dans la région 15q24/25 contenant le cluster de gènes *CHRNA3/A5/B4* codant pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ des nAChRs (**Figure 19 ►**). Ce cluster a été associé au développement de pathologies pulmonaires dont la BPCO (Duga et al., 2001).

INTRODUCTION

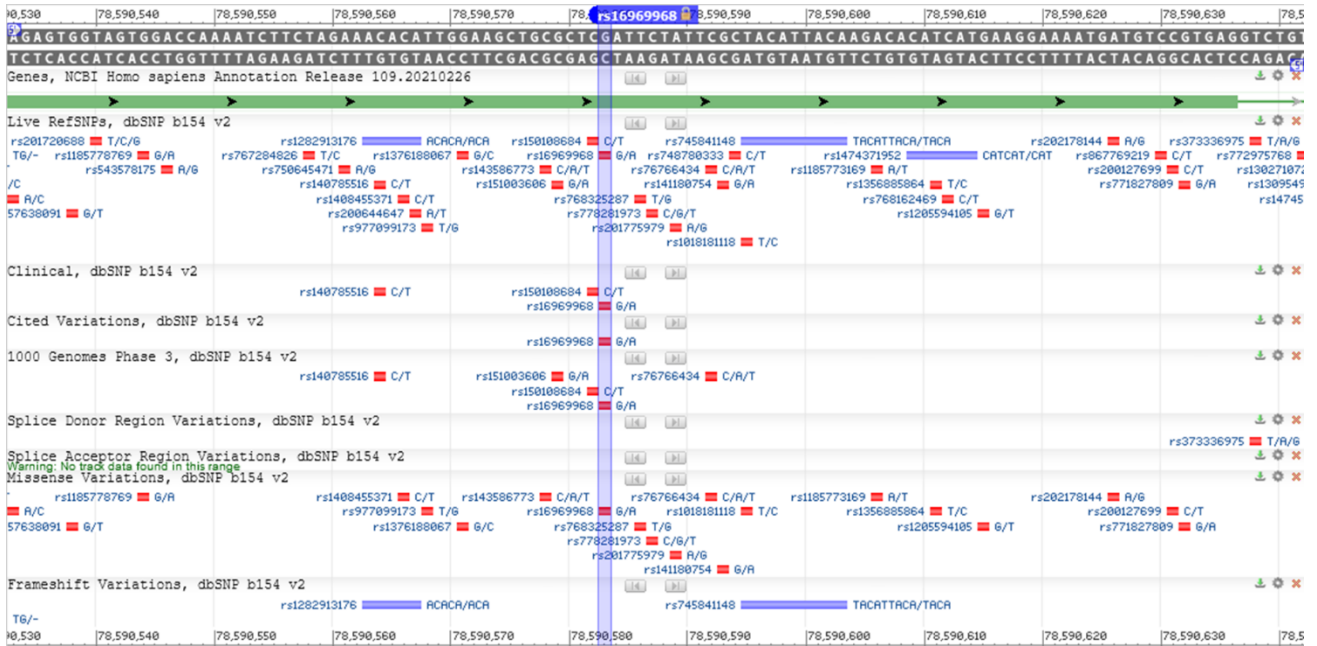


Figure 19 : SNP retrouvés dans la région chromosomique 15q24/25

CHAPITRE III : LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE

1. Définition

La broncho-pneumopathie chronique obstructive, ou BPCO, est une maladie respiratoire chronique dont l'incidence augmente avec l'âge. Elle est caractérisée par une diminution progressive et non réversible des débits respiratoires associée à des degrés variables à une inflammation broncho-pulmonaire et un emphysème. Les symptômes qui y sont associés, principalement la toux et la dyspnée d'effort croissante, étant peu alarmants, le diagnostic est bien souvent tardif. Par ailleurs, bien qu'étant la maladie respiratoire chronique la plus répandue, elle reste encore relativement peu connue du grand public (Soriano et al., 2020). En raison du sous-diagnostic de la BPCO, il est estimé qu'environ 2/3 des patients ignorent qu'ils en sont atteints retardant ainsi leur prise en charge.

2. Epidémiologie

Selon l'OMS, la BPCO est devenue la 3^{ème} cause de mortalité par maladie dans le monde en 2020 et elle toucherait environ 300 millions de personnes avec plus de 3 millions de décès annuels (James et al., 2018). Il y a quelques années, cette maladie était beaucoup plus diagnostiquée chez les hommes. Cependant, en raison d'une augmentation de la consommation tabagique chez la femme ces dernières décennies ainsi qu'une exposition accrue aux polluants domestiques (gaz, moisissures, monoxyde de carbone, etc.), la maladie tend à se développer à part égales chez les deux sexes (Gut-Gobert et al., 2019).

En France, la maladie touche plus de 3,5 millions de personnes ce qui représente 6 à 8 % de la population adulte (Santé publique France - Inserm). Le coût médico-économique de ces patients est non négligeable avec environ 100 000 à 150 000 patients hospitalisés pour exacerbations chaque année représentant une prise en charge annuelle s'élevant à 3,5 milliards d'euros. De plus, le taux d'hospitalisations est en constante augmentation (Santé Publique France). En terme de mortalité, 18 000 patients succombent à cette maladie chaque année, les régions Grand-Est et Hauts-de-France ont les taux de mortalité les plus élevés en France (Figure 20 ►).

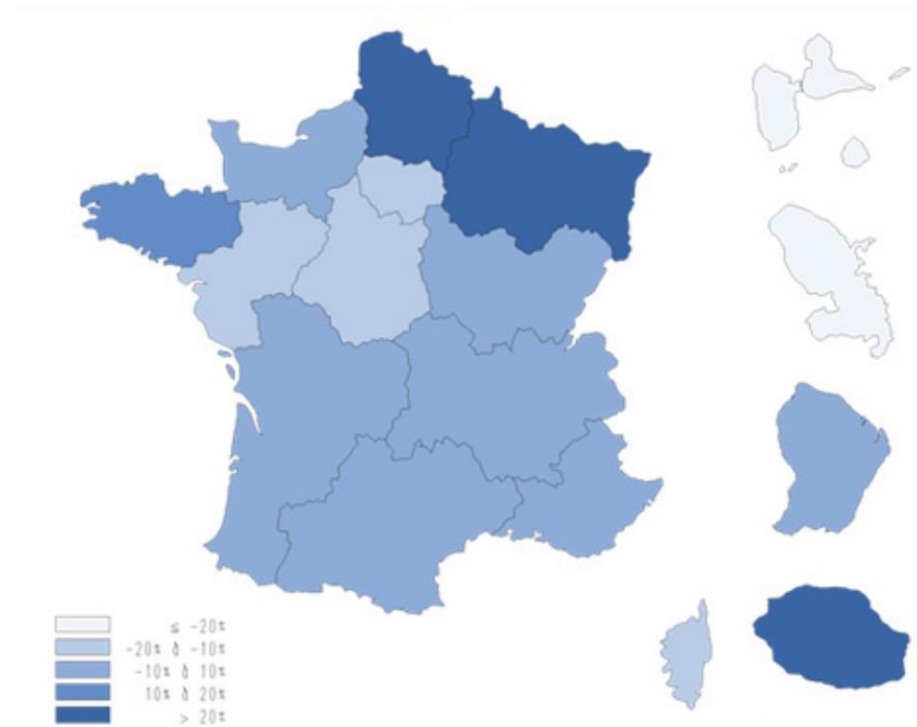


Figure 20 : Variations régionales de la mortalité par BPCO en France, 2013-2014

Ecart régional du taux moyen standardisé par rapport au taux moyen national chez des adultes de plus de 45 ans.

(Institut de Veille Sanitaire, 2017)

3. Symptômes, diagnostic et classifications

3.1 Symptômes

Les symptômes associés à la BPCO sont très peu alarmants pour les personnes qui en souffrent en raison d'un manque de reconnaissance et d'une banalisation de leur part. Ces patients attendent souvent une aggravation des problèmes respiratoires jusqu'à ce que cela en devienne un handicap sévère pour consulter un professionnel. L'un des premiers symptômes généralement décrit par les patients est une toux chronique fréquemment associée à des expectorations (Vogelmeier et al., 2020). Ces symptômes apparaissent progressivement et persistent avant d'évoluer bien souvent vers une dyspnée, une gêne ou oppression respiratoire entraînant une difficulté à réaliser des efforts physiques (essoufflement rapide, fatigue). On observe également une augmentation de la fréquence des infections bronchiques, responsables d'exacerbations de la BPCO.

3.2 Diagnostic

L'absence de biomarqueurs de la BPCO ne facilite pas l'établissement du diagnostic. Toutefois, des méthodes ont été développées afin d'analyser les phénotypes qui y sont associés et d'évaluer au mieux la prise en charge et le suivi des patients (Finch et al., 2016).

3.2.1 Spirométrie, plethysmographie, épreuve d'exercice

La mesure de la limitation des débits aériens à l'aide d'un test de spirométrie doit être effectuée en cas de suspicion de BPCO, c'est-à-dire lorsque les patients déclarent présenter les symptômes associés à cette maladie : une toux chronique, une dyspnée et/ou des expectorations, notamment en cas de facteur de risque tabagique. Pour cela, le patient est amené à souffler uniquement par la bouche dans un spiromètre mesurant les volumes d'air inspiré et expiré. Des bronchodilatateurs de courte durée d'action sont utilisés pour évaluer la variabilité du trouble ventilatoire obstructif. Une mesure du rapport VEMS/CVF (VEMS : Volume Expiratoire Maximale en une Seconde ; CVF : Capacité Vitale Forcée) inférieure à 0,7 après bronchodilatation définit un trouble ventilatoire obstructif, qui est non réversible dans la BPCO. La sévérité spirométrique de la BPCO est fixée sur la valeur du VEMS post-bronchodilatation (Frith, 2020; Tantucci and Modina, 2012; Vogelmeier et al., 2017). La durée et la fréquence des symptômes sont également prises en compte dans l'établissement du diagnostic et de sa sévérité (Vogelmeier et al., 2017).

La pléthysmographie permet de mesurer les volumes non mobilisables, déterminant ainsi la capacité pulmonaire totale (CPT) et le volume résiduel (VR). Dans le cadre de l'emphysème, un syndrome distensif est défini par une augmentation de la CPT, du VR et du rapport VR/CPT. Ce rapport VR/CPT est corrélé à la sévérité de l'emphysème et à la dyspnée d'effort. La diffusion alvéolo-capillaire (DLCO) doit également être évaluée. La DLCO est abaissée dans la cadre d'un emphysème, d'une hypertension pulmonaire ou d'une pneumopathie infiltrante diffuse (par exemple dans le cadre d'un syndrome fibrose-emphysème).

L'épreuve d'exercice (le plus souvent sur cycloergomètre) permet de mesurer la consommation maximale en O₂ (VO₂ max) et d'analyser au cours de l'exercice l'évolution des paramètres ventilatoires (volume courant, fréquence respiratoire), des échanges gazeux (PaO₂, PaCO₂, pH), ainsi que des paramètres cardio-vasculaires. Cette évaluation permet d'évaluer de façon plus précise les capacités à l'exercice, les symptômes (dyspnée, myalgies), ainsi que les facteurs physiologiques ventilatoires, cardio-vasculaires et/ou périphériques limitants

l'exercice. De façon plus simple, un test de marche de 6 minutes permet également d'évaluer les capacités à l'exercice, évaluant la distance de marche, la saturation en O₂ et les symptômes.

3.2.2 Radiographie

Le scanner thoracique est un outil utilisé en complément du test de spirométrie étant donné qu'il permet de déceler la présence et d'examiner la distribution d'un emphysème et/ou de modifications structurelles bronchiques (épaississement des parois bronchiques). (Hoffman et al., 2016). Il permet également de détecter des co-morbidités associées telles qu'un carcinome bronchique ou une hypertension pulmonaire. Des techniques de quantification scannographique de l'emphysème et de l'épaississement des parois bronchiques peuvent également être utilisées (Sieren et al., 2012).

3.2.3 Examens biologiques

D'un point de vue génétique, le déficit en α 1-antitrypsine, un inhibiteur de la sérine protéase protégeant le tissu pulmonaire, est mesuré par génotypage et constitue un indicateur supplémentaire de prédispositions à la BPCO (American Thoracic Society and European Respiratory Society, 2003; Henaou and Craig, 2016). Il s'agit actuellement du seul déficit monogénique justifiant en pratique clinique un dépistage, a fortiori chez un patient jeune et non ou faible fumeur. Le dépistage se réalise sur un prélèvement sanguin mesurant le taux d'alpha-1 antitrypsine, qui sera complété en cas de déficit par une étude phénotypique et génotypique (*détaillé ultérieurement dans le paragraphe 4.2, facteurs génétiques*).

3.3 Classification GOLD

L'outil d'évaluation ABCD établi par le GOLD (*Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) permet d'établir le diagnostic et la prise en charge des patients en prenant en compte plusieurs facteurs et indicateurs de la BPCO (**Figure 21 ►**) (Finch et al., 2016; Vogelmeier et al., 2017).

Ainsi, la sévérité de la limitation du débit expiratoire est déterminée après l'obtention des données spirométriques par la classification GOLD 1–2–3–4 tandis que les symptômes incluant notamment la dyspnée sont évalués à l'aide du mMRC (*modified Medical Research Council*) et du CAT (*COPD Assessment test*) associée à l'historique des exacerbations dans l'année précédente, permettant une répartition selon la classification GOLD A–B–C–D. Cette classification prend donc en compte différents phénotypes permettant de définir au mieux les stratégies thérapeutiques adaptées à chacun des patients.

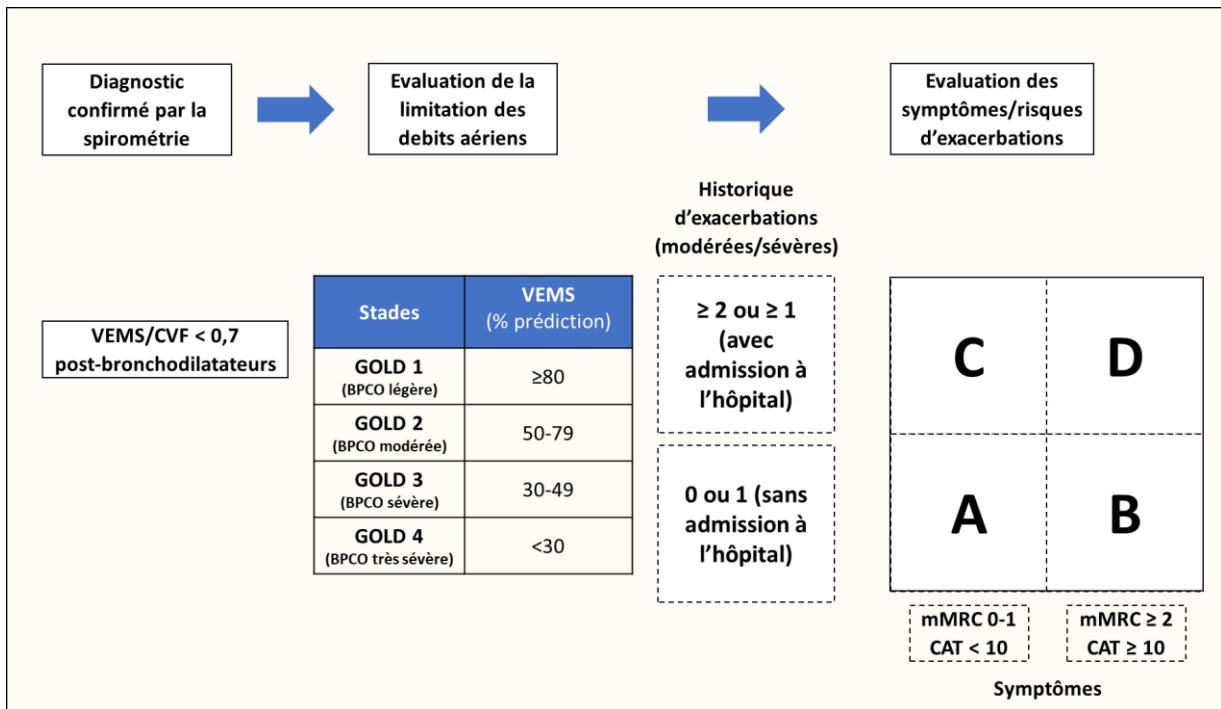


Figure 21 : Evaluation du stade de la BPCO en tenant en compte les données spirométriques, les symptômes et le risque d'exacerbations

*mMRC = modified Medical Research Council Dyspnoea Questionnaire; CAT = COPD Assessment Test
(D'après la classification GOLD, 2020)*

4. Facteurs de risque

La BPCO est une maladie caractérisée par deux entités pathologiques : l'obstruction bronchique définie par une limitation des débits aériens et un élargissement des alvéoles associé à une destruction des parois alvéolaires portant le nom d'emphysème, ces deux mécanismes étant médiés par une inflammation chronique. C'est une maladie multifactorielle dont la survenue peut être causée par l'accumulation de facteurs de risques exogènes et endogènes au cours de la vie.

4.1 Facteurs environnementaux

4.1.1 La fumée de cigarettes

La fumée de cigarettes constitue le principal facteur de risque de la BPCO, notamment dans les pays industrialisés où les fumeurs représentent plus de 90% des patients (Barnes, 2000). La fumée issue de la combustion du tabac libère plus de 4 500 composés toxiques qui, après avoir pénétré dans les voies aériennes, génèrent des altérations de l'épithélium pulmonaire à l'origine de la genèse et de la progression de divers pathologies respiratoires (Hou et al., 2019;

Montalbano et al., 2018). Parmi ces composés, on retrouve des nitrosamines obtenus par la nitrosation des alcaloïdes du tabac : le N-Nitrosoornicotine (NNN) et la cétone nitrosamine dérivée de la nicotine (NNK) sont considérés comme les plus cancérigènes (Gunduz et al., 2016; Konstantinou et al., 2018; Sophia et al., 1989). Des irritants respiratoires (acroléine) sont également retrouvés dans la fumée de cigarettes (Alwis et al., 2015).

L'un des phénomènes induit par cette inhalation est la réponse de l'épithélium des voies aériennes face à ce stress oxydatif exogène. Les composés toxiques ayant atteints les voies aériennes libèrent des ROS qui induisent différents phénomènes nuisibles au fonctionnement pulmonaire. Parmi eux, l'apparition de dommages à l'ADN est rendue possible par la diminution des sites apuriniques/apyradimiques nécessaires à la réparation de l'ADN (Barnes, 2020). La production de ROS active ensuite les macrophages alvéolaires qui, stimulés par l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de l'activation de cellules immunitaires, favorisent la fibrose péri-bronchique et bronchiolaire, l'hypersécrétion de mucus et engendrent la dégradation de l'élastine responsable de la destruction des parois alvéolaires (Hikichi et al., 2019). Enfin, le stress oxydatif généré par l'inhalation de composés toxiques permet l'activation de divers facteurs de transcription tels que NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) ou encore Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) qui contribuent à l'expression de médiateurs pro-inflammatoires générant ainsi de l'inflammation, à la fois pulmonaire et systémique, ainsi que de l'apoptose à l'origine de la BPCO (Fischer et al., 2015). Tous ces phénomènes accélèrent ainsi le vieillissement cellulaire et la sénescence des cellules souches, cette dernière étant associée au développement de lésions emphysémateuses (Hikichi et al., 2019).

La cigarette électronique a été initialement cataloguée comme une alternative plus sûre que la cigarette classique. De plus, la diversité de saveurs proposées et le sevrage tabagique facilité grâce à un contrôle du taux de nicotine n'ont fait qu'accroître sa popularité auprès des jeunes adultes et des adolescents ces dernières années. Néanmoins, malgré l'absence de production de fumée et une diminution considérable des effets nocifs comparés à une cigarette classique, de récentes études ont démontré que l'utilisation de la cigarette électronique est tout de même propice à la formation de remaniements pulmonaires (Cherian et al., 2020; Henry et al., 2020).

Ces données nous montrent donc que la fumée de cigarette est une des substances toxiques favorisant le développement d'affections respiratoires. Pourtant, environ 50 à 80% des fumeurs ne développeront pas de BPCO au cours de leur vie suggérant une susceptibilité ou une prédisposition génétique individuelle contribuant à l'apparition de la maladie (Terzikhan et al., 2016).

4.1.2 Pollution de l'air ambiant

Il existe trois types de pollutions associées à l'émergence de la BPCO : la pollution en milieu professionnel, la pollution extérieure et la pollution domestique.

De nombreux travailleurs sont exposés à des particules nocives en milieu professionnel. C'est le cas notamment des travailleurs du bâtiment et des mineurs qui se retrouvent quotidiennement en contact de particules toxiques, de fumées et de gaz (Balmes et al., 2003).

La pollution domestique constitue un facteur de risque majoritaire notamment dans les pays en voie de développement où l'utilisation de combustibles issus de la biomasse (fuel, bois, etc.), utilisés pour la cuisine et le chauffage, est plus élevée que dans les pays développés. Ce type de pollution est donc produit à domicile, mais également dans les salles de classe ou encore au sein des véhicules (Liu et al., 2008).

La pollution de l'air extérieur, en raison de l'émission de dioxyde d'azote et de particules fines (PM_{2,5} par exemple), est associé à une augmentation des symptômes respiratoires ainsi qu'aux exacerbations observées dans la BPCO à long terme. Néanmoins, cette pollution serait à l'origine d'environ 1 à 2 % des cas de BPCO seulement selon l'OMS (Hansel et al., 2016; Lux et al., 2020; Mannino and Buist, 2007).

Il est important de noter ici que l'âge constitue également un facteur de risque étant donné le déclin de la fonction pulmonaire observé avec le vieillissement.

4.2 Facteurs génétiques

A ce jour, le déficit en α -1 antitrypsine demeure le seul facteur de risque génétique de la BPCO. C'est un inhibiteur de sérines protéases codé par le gène *SERPINA1* essentiellement produit par les hépatocytes, les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules immunitaires (neutrophiles et monocytes) (Greene et al., 2016). Il a pour rôle de réguler négativement les effets protéolytiques de l'élastase des neutrophiles en plus de posséder des propriétés anti-inflammatoires. Son déficit se manifeste par le développement d'un emphysème à la suite de la destruction du tissu pulmonaire (DeMeo et al., 2007; Silverman, 2020).

Plusieurs études d'associations pangénomiques ont permis de révéler de nombreux gènes potentiellement liés à la BPCO (Silverman, 2020). Le cluster *CHRNA3/CHRNA5/IREB2* sur le chromosome 15q25 contenant des gènes codants pour des sous-unités des nAChRs a été mis en relation avec la maladie. De même, des loci tels que *HHIP* (*Hedgehog Interacting Protein*) et *FAM13A* (*Family with Sequence Similarity 13 Member A*) ont également été associés au

phénotype BPCO. Ils n'ont toutefois pas encore été reliés à des mécanismes physiopathologiques de la maladie (Barnes et al., 2015; Silverman, 2020).

5. Physiopathologie

La BPCO est une maladie pulmonaire caractérisée par une diminution non réversible des débits aériens en raison de l'inhalation de particules et de gaz nocifs. Elle est définie par la présence d'un remodelage des voies aériennes (obstruction bronchique et fibrose péribronchique) et une destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème) (**Figure 22 ►**) (Hogg, 2004; Janssen et al., 2019). Ces deux phénomènes sont la résultante d'une réponse inflammatoire anormale et persistante dans la périphérie pulmonaire face à ces agressions extérieures. Cette pathologie est dite hétérogène, c'est-à-dire que les paramètres décrits ci-dessus sont retrouvés à des degrés divers chez les patients (Barnes, 2016; Caramori et al., 2016).

Une hyperproduction de mucus, un mécanisme de clairance mucociliaire défectueux et, dans une moindre mesure, un épaississement des parois bronchiques sont les paramètres à l'origine de l'émergence de l'obstruction bronchique observée dans la BPCO. Il est aujourd'hui totalement établi que cette obstruction est principalement retrouvée dans les petites voies aériennes, de diamètre inférieur à 2 mm, en raison d'une faible résistance (Hogg, 2004). Pour ce qui est de l'emphysème, elle est caractérisée par une dilatation des espaces aériens au-delà des bronchioles terminales associé à une destruction des parois alvéolaires. Enfin, la fibrose péribronchique et bronchiolaire se développe à la suite de l'accumulation d'un tissu conjonctif fibreux durant le processus de réparation accompagné d'un épaississement des parois des voies aériennes (Hogg and Timens, 2009). La BPCO est rythmée par des épisodes d'exacerbations durant lesquels une aggravation aiguë des symptômes (dyspnée, toux, expectorations) est observée et peut nécessiter une hospitalisation dans les cas les plus sévères.

Bien qu'il existe plusieurs facteurs de risques associés à la BPCO, les études sur la physiopathologie dans le contexte de cette maladie ont principalement été réalisées chez des patients exposés à la fumée de cigarette.

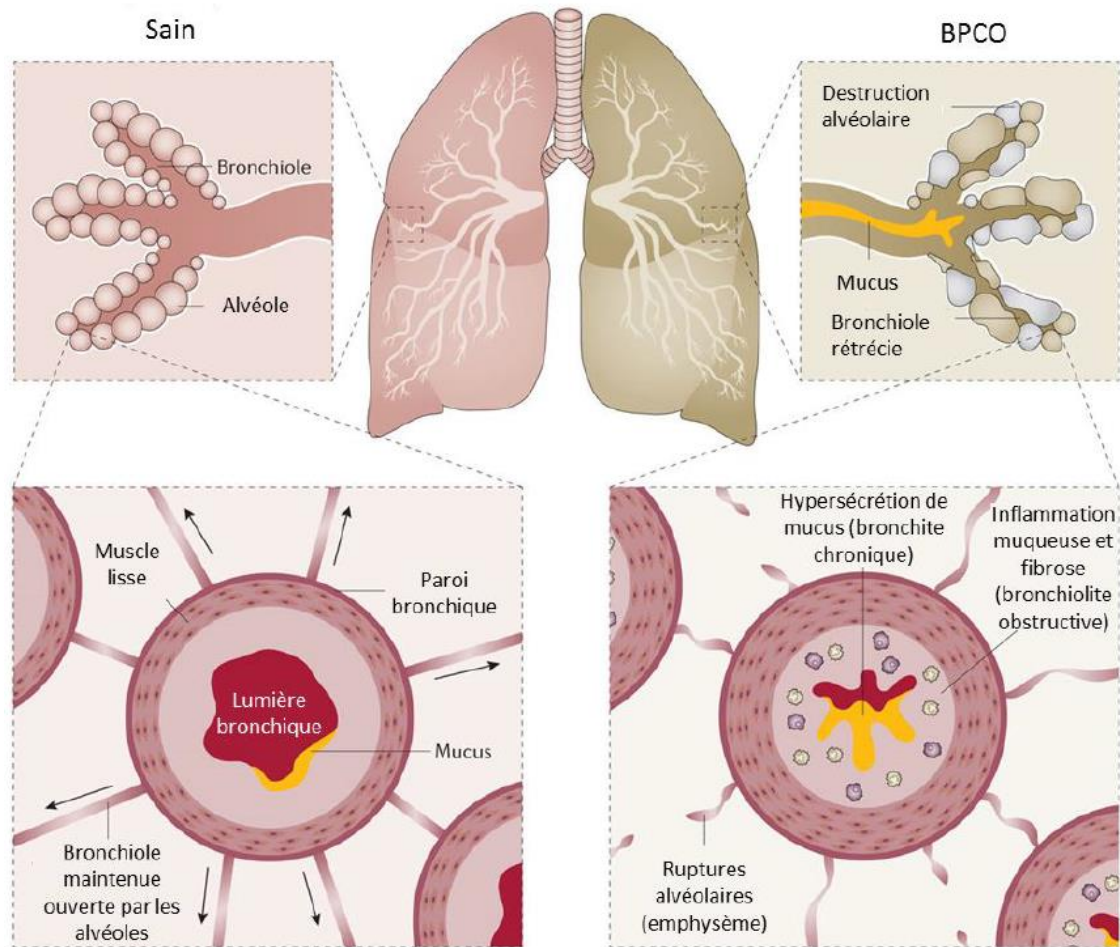


Figure 22 : Obstruction des voies aériennes dans la BPCO

(Barnes et al., 2015)

5.1 Mise en place et maintien de l'inflammation

Le processus inflammatoire mis en place par le système immunitaire inné et adaptatif est la réponse pulmonaire face à l'inhalation de composés toxiques et nocifs provenant de la fumée de cigarettes ou de l'air ambiant. Toutefois, la persistance de cette réponse est associée à un remodelage des voies aériennes à l'origine des altérations histologiques et fonctionnelles de l'épithélium respiratoire observées dans la BPCO.

5.1.1 Initiation de l'inflammation par les cellules épithéliales

L'arrivée récurrente de substances nocives au sein des voies aériennes aboutit à la formation de lésions au niveau des cellules épithéliales qui, en cours de mort cellulaire, libèrent alors des motifs moléculaires associés aux signaux de dangers (DAMP). Ces derniers (ATP, β -défensines, molécules S100, etc.) sont ensuite reconnus par les récepteurs de reconnaissance de

motifs moléculaires (PRR) des cellules avoisinantes non endommagées qui déclenchent une réaction inflammatoire. Plusieurs médiateurs pro-inflammatoires incluant des cytokines et des chimiokines (IL-1 β , TNF- α , et CXCR8) sont exprimés à partir de cette réponse. Ces médiateurs participent alors au maintien de l'inflammation par le recrutement de cellules immunitaires sur le site d'infection qui vont sécréter des molécules pro-inflammatoires mais également des radicaux oxygénés et des enzymes protéolytiques entraînant la destruction du tissu pulmonaire (Brusselle et al., 2011).

5.1.2 Initiation de l'inflammation par les cellules du système immunitaire

L'activation du système immunitaire s'avère être persistante, dérégulée et incontrôlée dans un contexte pathologique (**Figure 23 ▼**).

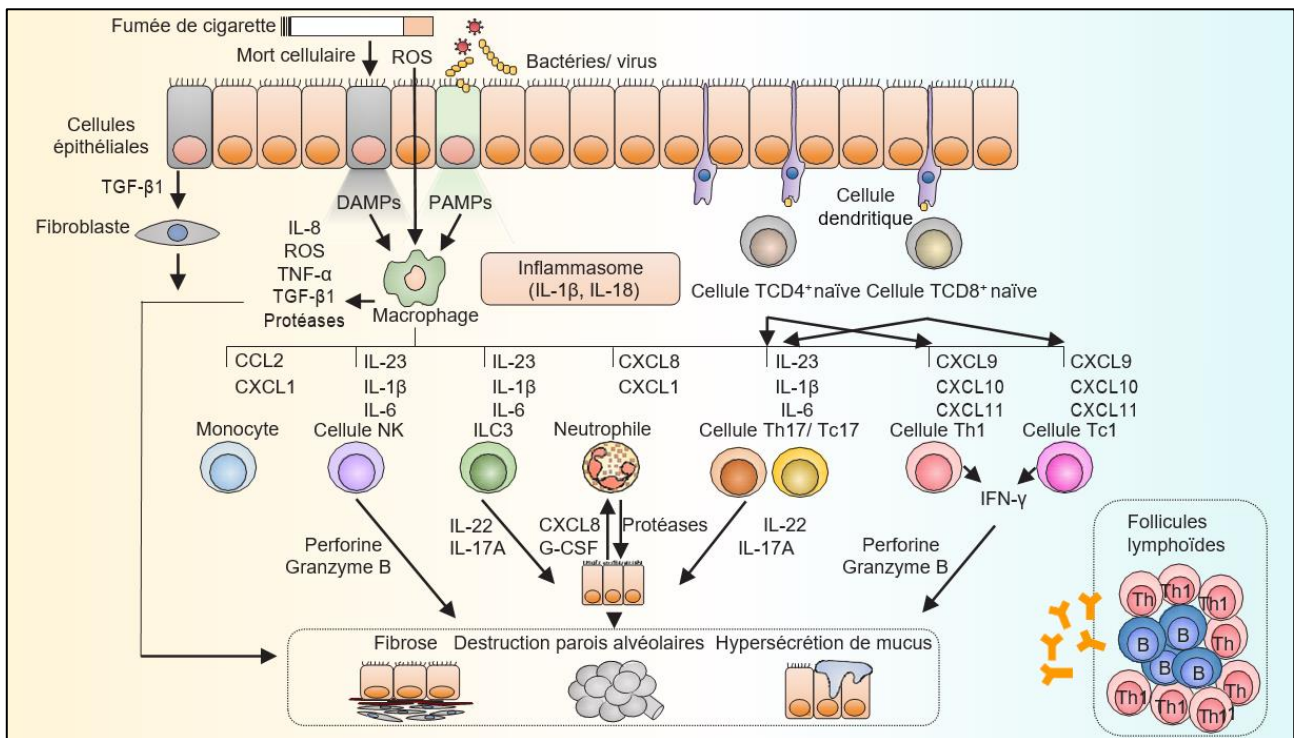


Figure 23 : Inflammation des voies aériennes dans la BPCO

L'inhalation de produits toxiques active les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires qui jouent un rôle central dans l'inflammation des voies aériennes de type 1 en libérant des cytokines et des chimiokines. Les macrophages alvéolaires et les neutrophiles libèrent des protéases (MMP, neutrophile élastase, etc.) qui entraînent la dégradation de l'élastine induisant la destruction des parois alvéolaires.

(Hikichi et al., 2019)

Le système immunitaire inné (SI) est le premier à être sollicité pour initier un processus de réparation immédiat. L'activation des récepteurs PRR à la surface des DC et des macrophages à la suite de la reconnaissance de PAMP ou de DAMP permet l'expression d'IL-1 β , TNF- α et CXCL8, des cytokines inflammatoires qui vont maintenir et aggraver le contexte inflammatoire déjà présent (Brusselle et al., 2011). Par exemple, la sécrétion de TNF- α provoque l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et facilite la migration de monocytes inflammatoires et de neutrophiles au sein du poumon (Barnes, 2016). Ces derniers libèrent alors des radicaux oxygénés et des enzymes protéolytiques responsables de la destruction pulmonaire. Parmi ces enzymes, on retrouve les MMP 2, 9 et 12 ainsi que l'élastase des neutrophiles dont l'expression favorise la production et la sécrétion de mucus à l'origine de l'obstruction bronchique et initie l'emphysème pulmonaire en détruisant la matrice élastique des alvéoles (Aldonyte et al., 2015).

De plus, la fumée de cigarette diminue la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter les bactéries et les débris cellulaires entraînant leur accumulation au sein des voies pulmonaires et créant par la suite une inflammation secondaire (Sanei and Wilkinson, 2016). La libération de ROS favorise la sécrétion de médiateurs fibrosants tels que TGF- β et des cytokines Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) par les cellules épithéliales et les macrophages qui vont à leur tour stimuler la sécrétion de collagène et autres matrices protéiques formant les bases d'une fibrose péribronchiolaire, un des paramètres intervenant dans le développement d'une obstruction bronchique des petites voies aériennes (Barnes, 2019). En parallèle, les éosinophiles promeuvent la lyse de l'épithélium alvéolaire ainsi qu'une rupture de la barrière épithéliale par la sécrétion de protéines contenues dans leurs granules cytoplasmiques (Ayars et al., 1985; Frigas et al., 1991). Enfin, les basophiles participent également à la formation de l'emphysème pulmonaire (Shibata et al., 2018).

Le nombre de polynucléaires neutrophiles circulants dans le sang est augmenté dans les cas pathologiques les plus sévères, cependant leur capacité de phagocytose semble être altérée. Ils représentent donc un marqueur efficace de la sévérité de la maladie. En effet, ils sont fortement recrutés dans un contexte pathologique mais sécrètent de nombreuses protéases sérines (MMP 1, 9, 12 et l'élastase des neutrophiles) impliquées dans la destruction des composants structurels de la matrice extracellulaire et dans le remodelage épithélial (Hoenderdos and Condliffe, 2013). Dans la BPCO, la tolérance immunitaire est altérée en raison d'une augmentation de Th17 au détriment des Treg dans le sang contribuant à la persistance de l'inflammation (Cosio and Saetta, 2012; Li et al., 2015).

Les LT CD4⁺ et CD8⁺ sont en augmentation dans les voies aériennes et le parenchyme de patients BPCO et leur expression est corrélée à une augmentation de la destruction tissulaire (Aldonyte et al., 2015; Barnes, 2016). De plus, la formation d'une réponse auto-immune a été détectée à la suite d'une augmentation d'anticorps dirigés contre le tissu pulmonaire (Feghali-Bostwick et al., 2008). Il existe un lien entre le nombre de cellules lymphocytaires et la sévérité de la pathologie. En effet, les LB sont exprimés en grande quantité à un stade avancé de la maladie tandis que l'augmentation de l'expression de LT CD8⁺ est corrélée avec l'emphysème pulmonaire.

Enfin, les ILC joueraient également un rôle dans cet état inflammatoire. L'infection virale (Influenza) ou l'exposition de la fumée de cigarettes sont des facteurs impliqués dans les exacerbations de la BPCO. Ces événements participent à l'activation de la plasticité des ILC2 qui se dirigent vers le site inflammatoire et, par perte de GATA-3 et l'expression d'IL-12 et IL-18 dans le milieu environnant, acquièrent un phénotype de type ILC1. Par la suite, cette conversion amplifie considérablement la réponse anti-virale de type 1 qui pourrait expliquer la persistance de la réponse inflammatoire au cours d'un épisode d'exacerbations (Silver et al., 2016).

5.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif, lié à la libération de molécules oxydantes, est un élément majeur dans l'initiation de la BPCO. La formation d'un déséquilibre entre les molécules oxydantes/antioxydantes, en raison d'une très grande libération de réactifs oxygénés et d'une diminution de l'expression de molécules antioxydantes, entraîne un défaut de réparation de l'ADN altérant ainsi la signature protéique cellulaire. En plus des réactifs oxygénés d'origine exogène, les cellules inflammatoires (macrophages alvéolaires et les neutrophiles sanguins), épithéliales et musculaires lisses sont capables de libérer des ROS en grande quantité participant au maintien de ce déséquilibre.

Une présence continue de réactifs oxygénés dans l'épithélium des voies aériennes observée dans un contexte pathologique participe à la formation d'un stress carbonyle altérant les propriétés fonctionnelles protéiques et aboutissant au développement de mécanismes physiopathologiques tels qu'une hypersécrétion de mucus, une dysfonction musculaire et la mort cellulaire. Ils favorisent également la libération de molécules oxydantes en stimulant leur expression par les mitochondries (Kirkham and Barnes, 2013). Le stress oxydatif persiste même après l'arrêt de la cigarette en raison de la production de ROS médiée par les cellules inflammatoires.

5.3 Remodelage des voies aériennes

L'inflammation chronique précédemment décrite est associée à l'apparition d'un remodelage des voies aériennes où la structure histologique normale du tissu pulmonaire est altérée en faveur de modifications pathologiques. On observe la formation d'une métaplasie des cellules épithéliales, une augmentation de la densité des vaisseaux sanguins et un épaissement de la couche de cellules musculaires lisses (Jones et al., 2016; Wang et al., 2018). Toutes ces altérations orchestrent les symptômes observés dans la BPCO.

5.3.1 Destruction des jonctions cellulaires

Un des phénomènes observés dans la BPCO est une rupture de la barrière physique épithéliale associée à une augmentation de la perméabilité paracellulaire, principalement due à la fumée de cigarette, endommageant les complexes jonctionnels intercellulaires. En effet, le programme transcriptionnel des jonctions serrées et adhérentes est progressivement altéré dans les petites voies aériennes de patients BPCO fumeurs comparés aux fumeurs sans pathologie respiratoire après une diminution de l'expression de gènes nécessaires à la formation des complexes jonctionnels cellulaires tels que *PTEN* (*Phosphatase and TENsin Homolog*), *FOXA1* (*Forkhead box A1*) et *CLDN1* (*Claudin 1*) (Shaykhiev et al., 2011). Ce phénomène a pour conséquence une augmentation de la perméabilité cellulaire en raison d'une susceptibilité accrue de l'épithélium pulmonaire à une prolifération ou une différenciation anormale (métaplasie ou dysplasie) (Wistuba et al., 2002).

En plus de la fumée de cigarettes, les pathogènes inhalés sont capables de dégrader les jonctions intercellulaires. Par exemple, une infection des cellules épithéliales nasales humaines cultivées en interface air-liquide par un rhinovirus est associée à la destruction des jonctions serrées et adhérentes par diminution de ZO-1, occludine, claudine-1 et E-cadhérine (Yeo and Jang, 2010).

5.3.2 Altération de la régénération épithéliale

Le mécanisme de régénération épithéliale est nécessaire à la réparation du tissu pulmonaire après lésion. Néanmoins, ce processus est altéré dans un contexte BPCO.

Les cellules basales, exprimées tout au long de l'arbre respiratoire proximal, sont très peu prolifératives en condition normale et se renouvellent lentement. Après lésion, les cellules progénitrices changent de phénotype et se différencient en cellules multiciliées (expression de MYB) et sécrétrices (expression de NOTCH2) afin de régénérer un épithélium fonctionnel sur

le site altéré. La perte de l'expression de SHH active la prolifération des cellules mésenchymateuses et, par boucle de rétroaction, favorise la prolifération épithéliale (Zepp and Morrisey, 2019). Dans la BPCO, les cellules basales continuent ainsi de proliférer de manière anarchique donnant lieu à une hyperplasie des cellules basales ou à une métaplasie malpighienne tandis que la différenciation des cellules ciliées est altérée en raison d'une expression diminuée de FoxJ1 et β -tubuline IV (Gohy et al., 2019; Rock et al., 2010). Les cellules mésenchymateuses et endothéliales interviennent également dans le processus pathologique.

Le mécanisme de différenciation des cellules basales est détourné dans un contexte pathologique en faveur de la production de cellules sécrétrices. En effet, les cellules Th2 activent la voie de signalisation Notch par la sécrétion d'IL-13 favorisant la différenciation des cellules basales en cellules caliciformes et par conséquent la mise en place d'une hyperplasie des cellules caliciformes. De même, l'expression d'IL-17 par les Th17 active la voie de signalisation Notch2 contribuant davantage à ce phénomène (Danahay et al., 2015; Rock et al., 2011). En parallèle, l'augmentation de Muc5ac et Muc5b a été démontré chez les patients BPCO (Caramori et al., 2009; Kesimer et al., 2017). De plus, la baisse d'activité du canal CFTR diminue l'hydratation de surface et favorise l'écrasement des cils moteurs par la couche de mucus supérieure. Tous ces mécanismes sont responsables d'une altération de la clairance-mucociliaire et participent à l'établissement de l'obstruction bronchique (Ghosh et al., 2015).

6. Traitements

Dans le but d'améliorer les symptômes et de réduire la morbidité et la mortalité de la BPCO, des traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques adaptés à la sévérité de la BPCO ont été développés. D'autre part, la fréquence élevée des co-morbidités notamment cardiovasculaires, métaboliques et cancéreuses justifie d'une évaluation et d'une prise en charge multidisciplinaire globale.

6.1 Réhabilitation respiratoire

La réadaptation (ou réhabilitation) respiratoire consiste en une prise en charge globale et multidisciplinaire incluant un réentraînement à l'exercice, une aide au sevrage tabagique, l'optimisation des traitements pharmacologiques, une kinésithérapie de drainage bronchique, une prise en charge nutritionnelle et psychologique, ainsi qu'une éducation thérapeutique globale. Son efficacité a été démontrée sur la dyspnée, les capacités à l'exercice, la qualité de

vie et la diminution de consommation de soins. La réadaptation est recommandée chez tout patient BPCO symptomatique. Dans le cadre de l'évaluation globale du patient atteint de BPCO, il est important de réaliser une évaluation précise des symptômes, des capacités à l'exercice, de la force musculaire et de la qualité de vie. Ces paramètres sont à prendre en compte pour déterminer notamment le niveau de réentraînement à l'exercice.

6.1.1 Evaluation physique

Les patients BPCO souffrent dans la plupart des cas de dyspnée initialement à l'effort mais pouvant évoluer vers une dyspnée au repos, ainsi que d'une fatigue musculaire qui entraîne une diminution accrue voire un arrêt complet des activités physiques tant sportives que domestiques (Spruit et al., 2015). Ces symptômes de dyspnée sont notamment la conséquence d'une hyperinflation, d'une diminution de la résistance élastique pulmonaire, et d'un dysfonctionnement du muscle squelettique qui se développe à la suite d'une atrophie des fibres musculaires et d'une prédominance des fibres de type II (faible résistance à la fatigue) au détriment des fibres de type I (forte résistance à la fatigue) (Zeng et al., 2018). Ainsi, le niveau d'endurance, la force physique et la qualité de vie sont les paramètres mesurés pour évaluer la forme physique des patients.

6.1.1.1 Niveau d'endurance

Afin de mesurer le niveau d'endurance, plusieurs méthodes d'évaluations sont disponibles dont le test de marche à vitesse croissante (ISWT de l'anglais *incremental shuttle walking test*), l'épreuve d'exercice habituellement réalisée sur cycloergomètre et le test de marche de 6 minutes (6MWT de l'anglais *6 minute walk test*). Pour le test de marche de 6 minutes, le patient parcourt la plus grande distance possible en marchant à son rythme durant le temps imparti de 6 minutes à la suite desquelles la fatigue, la dyspnée ainsi que la saturation en oxygène artérielle sont mesurées (Enright, 2003; Zeng et al., 2018).

6.1.1.2 Force physique

Les stades sévères de la maladie sont associés à une diminution de la force physique chez les patients (Zeng et al., 2018). Ainsi, plusieurs tests sont disponibles afin de mesurer les contractions volontaires et involontaires. Parmi les techniques volitionnelles, on peut citer le test musculaire manuel (MMT de l'anglais *Manual Muscle Testing*) et la dynamométrie manuelle qui sont des techniques utilisées dans un contexte BPCO afin d'évaluer la force et la fonction musculaire (Bui et al., 2019). Il existe d'autres techniques permettant de mesurer des

paramètres supplémentaires à savoir le poids maximal pouvant être soulevé en une fois et la contraction maximale du quadriceps. En ce qui concerne les techniques non volitionnelles, elles sont fondées sur des méthodes faisant appel à des stimulations nerveuses et magnétiques donnant des informations sur l'état fonctionnel du muscle squelettique (Man et al., 2003).

6.1.1.3 Qualité de vie

Le dernier paramètre étudié pour compléter cette évaluation physique est la qualité de vie. Différentes méthodes d'évaluations sont disponibles. On retiendra les questionnaires standardisés incluant le CDQ (*COPD Diagnostic Questionnaire*), le IPAG-Q (*International Primary Care Airways Group Questionnaire*) et le SF-36 (*36-item short-form*), le questionnaire du St George's Hospital (SGRQ) qui sont remis aux patients afin de mesurer leur état de santé (statut tabagique, fréquence des symptômes respiratoires, anxiété, dépression...) et l'index de capacité BODE (*Body mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise*) qui permet de prédire la mortalité (Stanley et al., 2014).

6.1.2 Entraînement physique

A la suite des évaluations, l'entraînement physique peut démarrer. Il est basé sur les objectifs suivants :

- Le travail d'endurance permettant d'améliorer la fréquence cardiaque de récupération et la fonction musculaire. Il comprend plusieurs exercices tels que la marche, la course et le cyclisme (Gimeno-Santos et al., 2014; Zeng et al., 2018).
- Le travail de force afin de rétablir la force musculaire par des exercices faisant appel à l'utilisation des membres du corps (Calik-Kutukcu et al., 2017)
- La stimulation des muscles respiratoires à l'aide d'appareils spécialisés dans le but de diminuer la dyspnée et ainsi d'améliorer l'endurance (Gosselink et al., 2011)
- La stimulation neuromusculaire électrique qui s'effectue également via des appareils spécialisés et permet d'améliorer les aptitudes physiques (Chen et al., 2016)

Ces entraînements permettent non seulement d'améliorer la condition globale des patients mais aussi de faciliter les tâches de la vie quotidienne.

Outre la réadaptation physique, il existe d'autres procédures mises en place pour prévenir les risques d'aggravation de la maladie. La vaccination saisonnière anti-grippale, la vaccination anti-pneumococcique et plus récemment anti-COVID-19 sont fortement recommandées (Bekkat-Berkani et al., 2017; Sanei and Wilkinson, 2016). Le sevrage tabagique définitif

constitue la mesure thérapeutique essentielle, avec un impact sur la réduction de la morbidité et la mortalité associée à la BPCO. Toutefois, cela ne permet pas la restauration des capacités fonctionnelles respiratoires et l'obstruction bronchique peut continuer à se développer au cours des années suivants l'arrêt du tabac (Roche, 2018; Tonnesen, 2013). Par ailleurs, la diminution de l'exposition à des composés toxiques dans le milieu professionnel ou domestique est également préconisée (Vogelmeier et al., 2017).

6.2 Traitements pharmacologiques

Le choix du traitement pharmacologique est effectué en prenant en compte les symptômes, la présence d'exacerbations, le stade de la maladie et le bénéfice-risque spécifique à chaque patient (**Figure 24 ►**).

6.2.1 Bronchodilatateurs

Il existe deux classes de bronchodilatateurs : les β_2 agonistes et les anticholinergiques administrés principalement par voie inhalée seuls ou en combinaisons. Ils peuvent être prescrits pour une courte durée, notamment durant les épisodes d'exacerbations afin de soulager les patients, mais le plus souvent en longue durée. Ils permettent de diminuer la dyspnée et d'augmenter la capacité physique (Cazzola and Molimard, 2010; Hillas et al., 2020).

6.2.2 Corticostéroïdes inhalés

Les corticostéroïdes inhalés (ICS) sont uniquement utilisés en association avec les bronchodilatateurs à longue durée d'action et ce, dans les cas les plus sévères de la maladie pour lesquels les épisodes d'exacerbations sont récurrents.

6.2.3 Combinaisons LABA/LAMA/CSI

Les bronchodilatateurs seuls permettent de diminuer la dyspnée et de diminuer la fréquence des exacerbations notamment pour les anticholinergiques. Les LAMA (*Long Acting Muscarinic Antagonists*) et les LABA (*Long Acting β -2 Agonists*) sont communément utilisés en monothérapie ou en bithérapie. Tandis que les LAMA agissent en se liant aux récepteurs M des muscles lisses des voies aériennes à la place de l'ACh et bloquent par conséquent la bronchoconstriction, les LABA-2 relaxent les muscles lisses et améliorent la bronchodilatation par stimulation des récepteurs β -2 adrénergiques (Cazzola et al., 2012; Jouneau et al., 2014). Lorsque des exacerbations persistent malgré une bithérapie, il est possible de combiner les

LABA avec les CSI. Une trithérapie LABA/LAMA/CSI peut être envisagée en l'absence d'efficacité clinique de la bithérapie (Vespasiani-Gentilucci et al., 2018).

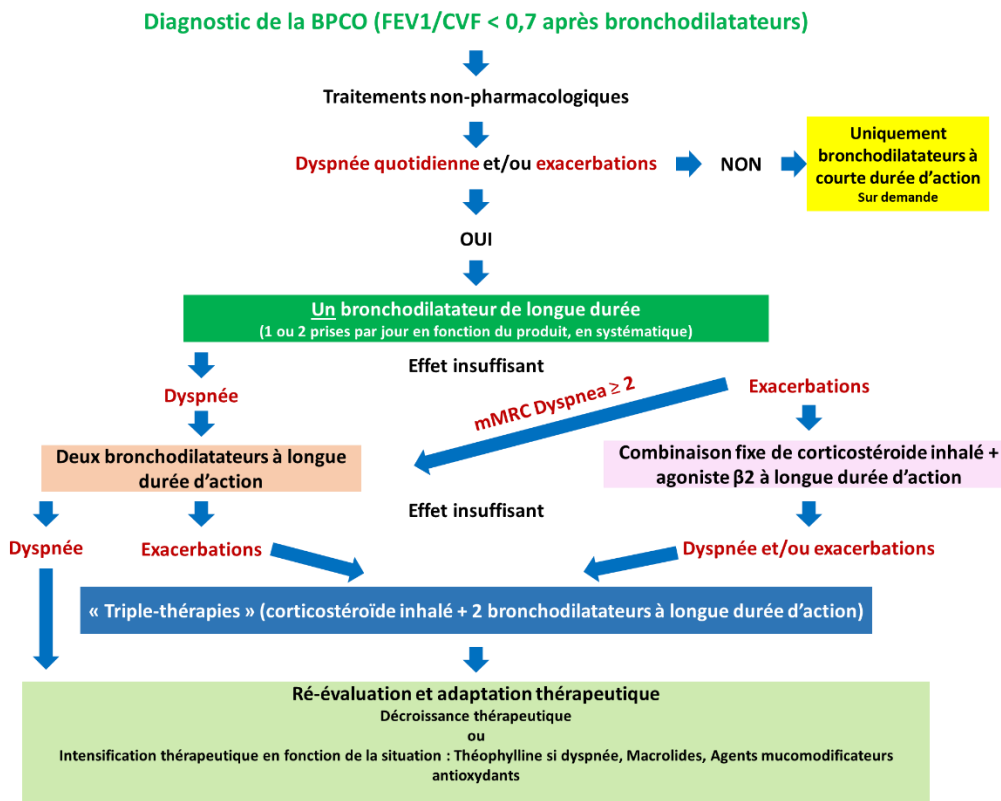


Figure 24 : Algorithme de la prise en charge de la BPCO

(Zysman et al., 2016)

Plusieurs traitements sont donc disponibles pour la prise en charge des patients atteints de la BPCO. Ils ont pour objectif d'améliorer la qualité de vie, de diminuer les symptômes respiratoires et de réduire la fréquence des exacerbations. Néanmoins, l'efficacité des traitements pharmacologiques actuellement disponibles dans la BPCO est limitée, justifiant l'identification de nouvelles cibles moléculaires participant à l'établissement et au développement de la pathologie de manière à proposer une thérapeutique efficace dans la BPCO.

7. Rôle des polymorphismes *CHRNA3/A5* dans la BPCO

Le cluster de gènes *CHRNA3/A5/B4* a été associé à des pathologies pulmonaires dans des GWAS. Plus précisément, les polymorphismes des gènes *CHRNA3/A5* codants pour les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 5$ des nAChRs ont été corrélés à la BPCO : le SNP rs1051730 a été associé à un risque augmenté d'emphysème (Lambrechts et al., 2010), le SNP rs8034191 à l'obstruction bronchique (Pillai et al., 2010) et ces deux variants ont été corrélés à une diminution de la fonction respiratoire chez les fumeurs (Mohamed Hoesein et al., 2013). Le lien entre les polymorphismes des gènes *CHRNA3/A5* et la BPCO ont été rapportés au sein de plusieurs populations mondiales (cohorte coréenne, chinoise, polonaise, mexicaine et norvégienne) (Gabrielsen et al., 2013; Hardin et al., 2012; Lee et al., 2012; Pérez-Morales et al., 2018; Yang et al., 2012). De plus, ils ont également été associés à un risque de cancer pulmonaire et à la dépendance tabagique (Berrettini and Doyle, 2012; Improgo et al., 2013). Il a été suggéré que l'association de ces polymorphismes à l'addiction nicotinique pourrait être une cause de risque de BPCO et de cancer pulmonaire.

En outre, les polymorphismes des gènes *CHRNA3* et *CHRNA5* sont en déséquilibre de liaison. Cela signifie que la fréquence d'un haplotype (groupe d'allèles de différents loci) est supérieure ou inférieure à la fréquence attendue (Pritchard and Przeworski, 2001). Dans notre cas, le SNP rs1051730 du gène *CHRNA3* verrait son effet influencé par le SNP rs16969968 en raison de leur grande proximité. De plus, ce dernier présente statistiquement un risque plus élevé de développer un cancer pulmonaire et, dans une moindre mesure, une BPCO (Amos et al., 2008; Improgo et al., 2013; Saccone et al., 2010). En effet, il a individuellement été associé à une perte de la fonction respiratoire (Gabrielsen et al., 2013), au comportement tabagique (Wen et al., 2016), et au risque de BPCO aussi bien sous sa forme homozygote qu'hétérozygote: odds ratios avec intervalle de confiance à 95% de 1,56 (1,30-1,88) et 1,32 (1,17-1,49) respectivement (Cui et al., 2014).

D : Acide aspartique (GAU ou GAC)
 N : Asparagine (AAU ou AAC)

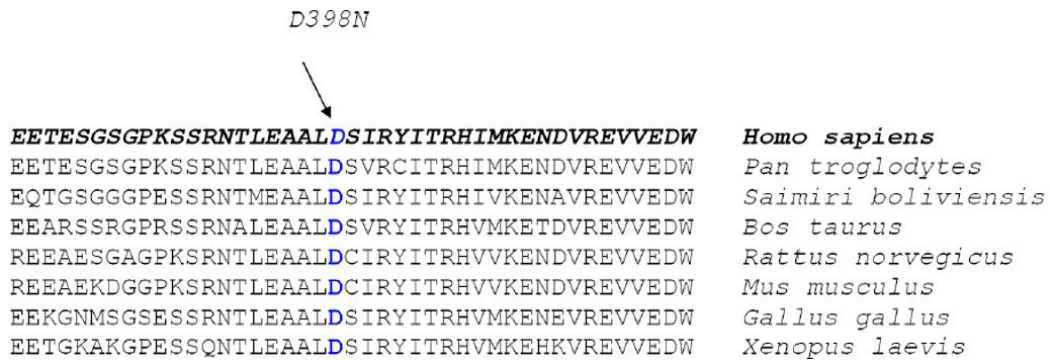


Figure 25 : Analyse comparative de la séquence en acides aminés entourant la position 398 de la sous-unité $\alpha 5$ entre différentes espèces

L'acide aspartique (D) représente l'acide aminé sauvage, il est conservé entre les différentes espèces listées ci-dessus. Le polymorphisme rs16969968 est à l'origine du changement d'acide aminé en position 398 de la protéine $\alpha 5$.

(Bierut et al., 2008)

Ce SNP $\alpha 5$ est dû au remplacement de la guanine par une adénine en position 1354 de l'exon 5 du gène *CHRNA5*. Cette modification aboutit à un remplacement de l'acide aspartique (D) par l'asparagine (N) en position 398 de la protéine finale appelé D398N (Wojas-Krawczyk et al., 2012). Il s'agit d'une mutation non-synonyme. Des alignements de séquences ont permis de montrer que l'expression de l'acide aspartique (D) en position 398 est hautement conservée à travers les espèces incluant les amphibiens, les rongeurs et les primates non-humains suggérant un rôle très important dans le fonctionnement de la sous-unité (**Figure 25 ▲**). (Bierut et al., 2008; Hung et al., 2008). En ce qui concerne la fréquence d'expression, l'allèle A rs16969968 est fréquemment retrouvé chez les populations d'origine européenne alors qu'il est quasiment absent chez les populations d'origine africaine (**Figure 26 ►**) (Bierut et al., 2008).

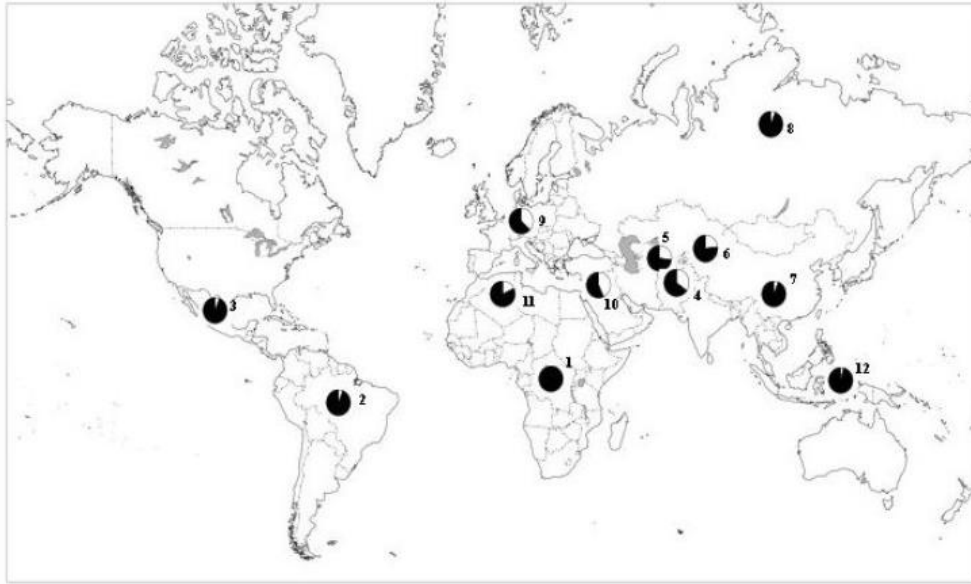


Figure 26 : Fréquence de la distribution allélique du SNP rs16969968 entre différentes populations ethniques

L'allèle A correspondant au polymorphisme est représenté en blanc

(Bierut et al., 2008)

D'un point de vue fonctionnel, des études *in vitro* effectuées sur des cellules HEK (cellules embryonnaires humaines du rein) ont permis de montrer que la présence du SNP $\alpha 5$ ne modifie pas l'expression des récepteurs $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$. En revanche, le polymorphisme est associé à une diminution de la réponse de ces récepteurs face à la stimulation par l'épibatidine, un agoniste des nAChRs, qui se traduit par une réduction des flux calciques (Bierut et al., 2008). La réponse calcique induite par les récepteurs $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5^{D398}$ est diminuée en comparaison des récepteurs $\alpha 3\beta 4^*$ après stimulation par le même agoniste et l'expression du polymorphisme par les récepteurs $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5^{N398}$ diminue d'autant plus cette réponse (Maskos, 2020; Tammimäki et al., 2012). Ces résultats ont pu être confirmés sur d'autres matériels biologiques. Dans des oocytes de xénopes, les récepteurs $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5^{N398}$ présentent une fonctionnalité diminuée comparé aux récepteurs $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5^{D398}$ après stimulation par l'ACh représentée par une baisse de la perméabilité calcique et une augmentation de la désensibilisation à court terme (Kuryatov et al., 2011).

Toutes ces données indiquent que les polymorphismes des gènes *CHNRA3/A5* et principalement le SNP rs16969968 sont directement impliqués dans l'émergence de la BPCO. Toutefois, aucune étude n'a été menée concernant l'effet de ce SNP sur les fonctions biologiques observées dans cette pathologie et de façon plus large, dans les voies aériennes pulmonaires.

Objectifs de thèse

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie respiratoire caractérisée par une limitation non réversible des débits aériens (obstruction bronchique) et une destruction des parois alvéolaires (emphysème) associés à une inflammation chronique. Plus de 90% des patients sont des fumeurs ou d'anciens fumeurs, toutefois seule une proportion de fumeurs (10 à 20%) développera une BPCO au cours de la vie. Ces données suggèrent qu'une susceptibilité génétique pourrait contribuer au développement de la maladie. Des études d'associations pangénomiques ont ainsi permis de corrélérer le polymorphisme rs16969968 (SNP α 5) de la sous-unité α 5 des récepteurs nicotiques à l'ACh (nAChRs) à la dépendance tabagique, la diminution de la fonction respiratoire dans la BPCO et l'émergence de cette pathologie. L'activation des nAChRs par l'ACh participe aux flux ioniques, notamment calciques, impliquées dans plusieurs mécanismes physiologiques tels que la morphogenèse pulmonaire, la prolifération et la migration cellulaire. La sous-unité α 5 agit uniquement en tant qu'accessoire au sein des récepteurs mais en altère la perméabilité ionique en plus de modifier leurs propriétés de désensibilisation.

Bien que la présence des nAChRs dans les voies aériennes ait été confirmée, une cartographie complète de chacune des 16 sous-unités codant ces récepteurs n'a jamais été explorée. De plus, aucune étude ne s'est intéressée à ce jour à l'influence du SNP α 5 sur les événements biologiques pulmonaires. Seules des associations génétiques ont été effectuées entre ce polymorphisme et la pathologie dans différentes populations mondiales. Il convient donc de déterminer l'expression des récepteurs et de déceler le lien entre le SNP α 5 et l'homéostasie pulmonaire étant donné leur importance cruciale dans les mécanismes physiologiques pulmonaires.

Notre objectif a donc été dans un premier temps de déterminer l'expression des transcrits et des protéines des sous-unités codants les nAChRs dans les voies aériennes pulmonaires humaines avant d'étudier l'implication du SNP α 5 sur les remaniements et les altérations de l'épithélium respiratoire chez l'Homme dans un contexte non-BPCO et BPCO. Tout au long de notre étude, les patients homozygotes et hétérozygotes pour le polymorphisme ont été regroupés dans un même groupe appelé SNP α 5.

Pour cela, notre travail a été divisé en 3 axes :

- **Cartographier l'expression des nAChRs dans le poumon :**
 - L'expression des transcrits des sous-unités a été explorée dans le tissu pulmonaire humain dans son ensemble (tissus épithéliaux et non-épithéliaux) en

utilisant des bases de données transcriptomique (*RNA-sequencing* et *Single-cell sequencing*) de patients sans pathologie respiratoire non-fumeurs et fumeurs et en réalisant des RTqPCR sur des cellules épithéliales bronchiques de patients présentant les mêmes caractéristiques.

- La localisation protéique des 16 sous-unités dans les bronches a été élucidée par des immunomarquages avec des anticorps spécifiques de ces sous-unités sur des coupes de tissus pulmonaires humains.
- **Déterminer l'influence du SNP α 5 sur la différenciation épithéliale dans un contexte non-pathologique :**
 - Le génotype de *CHRNA5*, WT α 5 (forme sauvage du gène *CHRNA5*) ou SNP α 5 (formes homozygote ou hétérozygote du gène *CHRNA5*), a été déterminé sur des cellules épithéliales respiratoires issues de polypes nasaux.
 - Les cellules de polypes génotypés ont ensuite été cultivées en interface air-liquide (IAL) afin d'étudier l'effet du SNP α 5 sur la différenciation cellulaire par l'étude de l'expression transcriptomique et protéique de marqueurs caractéristiques de la différenciation : Ck5 et Ck13 (cellules basales), Arl13b et FoxJ1 (cellules ciliées), Muc5ac et Muc5b (cellules mucosécrétrices). L'intégrité épithéliale a été évaluée par mesure de la résistance trans-épithéliale
 - L'état inflammatoire (sécrétion de cytokines et chimiokines) des cellules a été caractérisé au début de la différenciation cellulaire (IAL au jour 7) par dosage de cytokines.
- **Déterminer l'influence du SNP α 5 sur les remaniements épithéliaux associés à la BPCO :**
 - La répartition globale de l'expression du SNP α 5 dans une population non-BPCO vs BPCO a été établie à partir de cellules bronchiques issues de fibroscopies.
 - Le statut génotypique pour le gène *CHRNA5* des patients a été associé aux manifestations cliniques (symptômes respiratoires et fonction pulmonaire).
 - Les remaniements épithéliaux bronchiques (métaplasie malpighienne, hyperplasie des cellules basales, hyperplasie des cellules caliciformes) ont été analysés, le nombre de cellules basales (p63), ciliées (FoxJ1) et en prolifération (Ki67) ont été compté et les mucines (Muc5ac et Muc5b) ainsi que l'utéroglobine (CC10) ont été quantifiées après avoir réalisé des immunomarquages sur des coupes de tissus bronchiques humains.

MATÉRIELS & MÉTHODES

1. Echantillons biologiques et données cliniques

1.1 Fibroscopies

1.1.1 Recrutement

Le recrutement de patients 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 non-BPCO (n=27) 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 aigüe au cours de ce bilan. Les patients BPCO (n=21) 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 : $VEF1 \geq 80\%$, GOLD 2 : $VEF1 \leq 50\%$, GOLD 3 : $VEF1 \leq 30\%$, GOLD 4 : $VEF1 < 30\%$). 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). 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 effectuée. Le recueil, l'analyse et l'anonymisation des données ont été réalisés 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.

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.

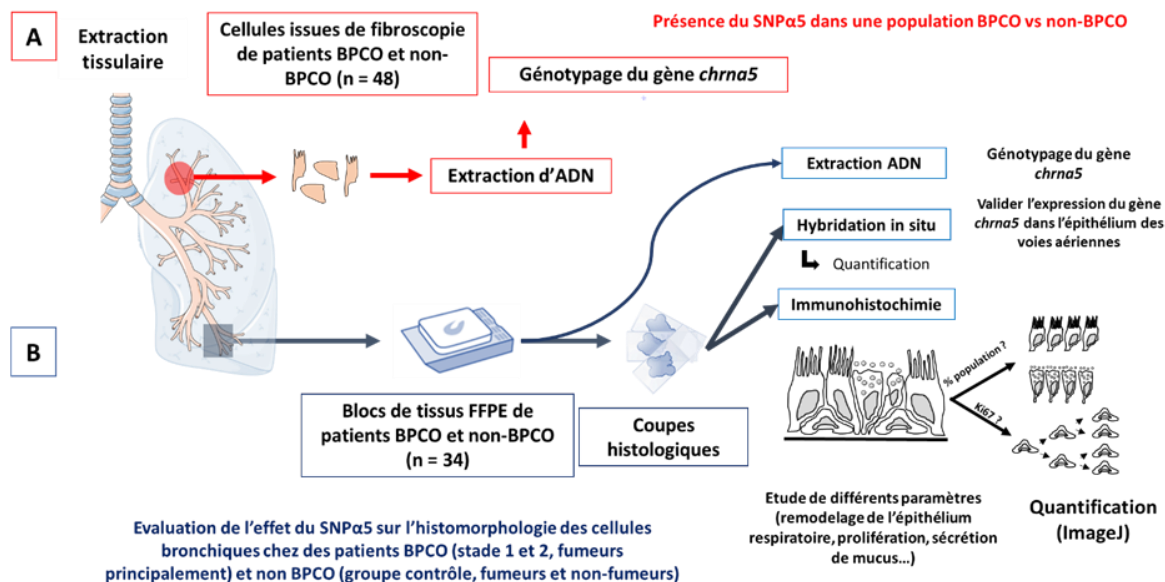


Figure 27 : Plan expérimental de l'étude de l'expression du SNPα5 dans une population BPCO vs non-BPCO

À partir de fibroscopies (A) et de l'effet de ce polymorphisme sur l'histomorphologie des cellules bronchiques à partir de résections pulmonaires (B)

1.1.2 Isolement des cellules épithéliales

Les cellules présentes sur les brosses bronchiques, réceptionnées après fibroscopie, sont remises en suspension mécaniquement (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 foetal (SVF) suivi d'une centrifugation (2x 12 500 RPM, 5 min). Le culot est repris durant 1 min dans 1 mL de Trypsine Versène® avant 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 centrifugées (12 500 RPM, 5 min) et le culot cellulaire est immédiatement placé à -20°C.

Ces échantillons sont utilisés pour établir la répartition globale de l'expression du polymorphisme rs16969968 (SNP α 5) des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) dans une population non-BPCO vs BPCO par génotypage (**Figure 27 A ◀**) et pour quantifier l'expression transcriptomique des sous-unités des nAChRs dans les bronches (**Figure 28 A ▼**).

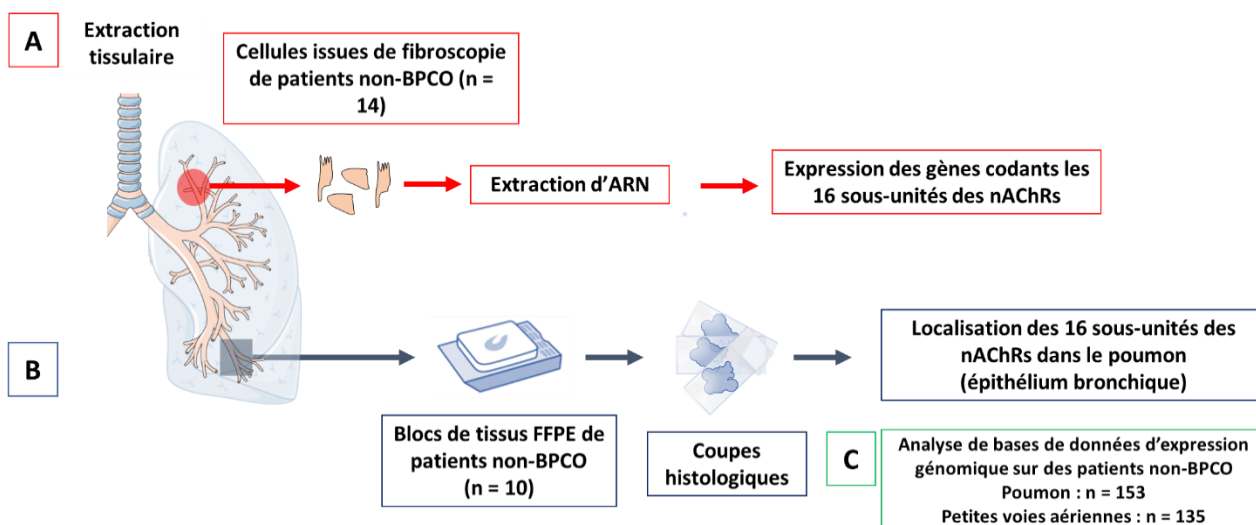


Figure 28 : Plan expérimental de l'étude de l'expression transcriptomique et protéomique des sous-unités des nAChRs

À partir de fibroscopies (A), résections pulmonaires (B) bases de données transcriptomiques (C)

1.2 Polypes nasaux

Les cellules utilisées pour la culture primaire sont issues de polypes nasaux de patients (n=14) 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 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.

Les cultures primaires sont réalisées dans le but d'élucider l'influence du SNP α 5 sur le remodelage épithélial au cours de la différenciation cellulaire (**Figure 29 A ▼**) et sur l'intégrité de la barrière épithéliale (**Figure 29 B ▼**).

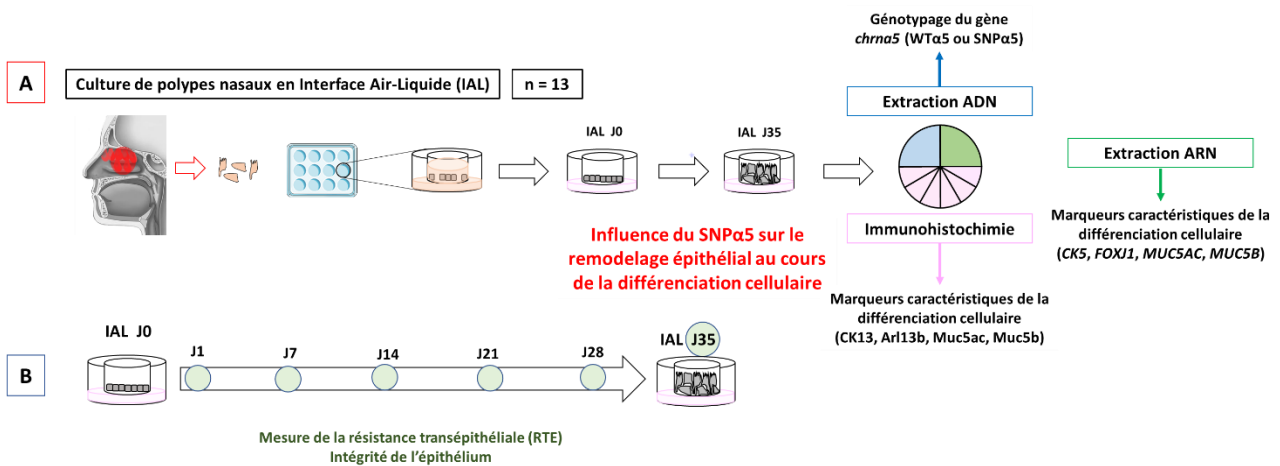


Figure 29 : Plan expérimental de culture cellulaire en IAL

L'étude du SNP α 5 sur le remodelage épithélial (A) et sur l'intégrité de la barrière épithéliale (B) au cours de la différenciation cellulaire à partir de polypes nasaux préalablement génotypés. WT = Wild-Type ; HT = Hétérozygote et HM = Homozygote

1.3 Résections pulmonaires

Les résections de tissus pulmonaires sont issues de patients atteints ou non de BPCO (n=34) 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). Ces blocs de tissus FFPE sont issus de la collection du CRB (Centre de Ressources Biologiques) de Reims et conservés à température ambiante. Les blocs FFPE sont coupés 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 tissus FFPE sont le matériel utilisé afin d'étudier l'effet du SNP α 5 sur le remodelage épithélial bronchique (**Figure 27 B ◀**) et localiser l'expression des sous-unités des nAChRs dans les voies aériennes (**Figure 28 B ◀**).

2. Culture cellulaire primaire

2.1 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 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 28 A ◀**). 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 recouverte 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.

2.2 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 équilibrée au préalable 1 h dans du PnC-ALI avant mesure. Chaque insert est déposé dans un puits 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 ($\Omega \times \text{cm}^2$).

3. Analyses génomiques

3.1 Extraction d'ADN

3.1.1 Culots cellulaires

L'ADN de cellules épithéliales issues de culots cellulaires (fibroscopies et polypes) est extrait grâce au kit *GenEluteTM RNA/DNA/Protein Plus Purification Kit* (#RDP300, SIGMA) selon les recommandations du fabricant. Pour cela, les culots cellulaires congelés à sec à -20°C sont déposés dans un tube collecteur puis mis en contact avec le tampon de lyse pendant 5 min pour libérer l'ADN des noyaux cellulaires. La solution passe ensuite sur une colonne de purification et une première centrifugation permet la capture de l'ADN dans la résine (1 min ; 14 000 g). L'ADN retenu sur la colonne est lavé 3 fois (3 x 1 min ; 14 000 RPM), séché (2 min ; 14 000 RPM) puis élué dans un volume final de 25µL d'eau stérile par centrifugation (2 min ; 2000 g puis 1 min ; 14 000 RPM). La concentration de l'ADN élué est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (NanoDrop-1000, Thermo Scientific).

3.1.2 Tissus FFPE

L'ADN des tissus pulmonaires FFPE est extrait grâce au kit *GenElute™ FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit* (#RDP300, SIGMA) selon les recommandations du fabricant. Pour cela, quatre sections de 20 µm chacune sont coupées à partir de tissus FFPE et récupérées dans un tube collecteur. Elles sont ensuite déparaffinées par un bain de xylène à 50°C pendant 5 min et centrifugées (2 min ; 14 000 RPM). Le culot cellulaire est récupéré et lavé à l'éthanol avant d'être centrifugé (2 min ; 14 000 RPM). L'éthanol est ensuite éliminé, le culot cellulaire est séché pendant 10 min à température ambiante (RT), repris dans de la protéinase K diluée dans un tampon de digestion et incubé pendant 1h à 55°C puis 2h à 90°C. Le culot cellulaire est ensuite repris dans un tampon, appliqué dans une colonne de purification d'ADN et centrifugé (1 min ; 14 000 RPM). La colonne est rincée 3 fois par centrifugation (3 x 1 min ; 14 000 RPM), séchée (2 min ; 14 000 RPM) puis l'ADN retenu sur la colonne est élué dans un volume final de 25µL d'eau stérile par centrifugation (2 min ; 2 000 RPM puis 1 min ; 14 000 RPM). La concentration de l'ADN élué est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (NanoDrop-1000, Thermo Scientific).

3.2 Génotypage

Le génotypage SNP α 5 a été réalisé après les extractions d'ADN de culots cellulaires (fibroscopies et polypes) et de tissus FFPE.

3.2.1 Amplification par PCR

La séquence contenant la substitution nucléotidique est amplifiée. En résumé, l'ADN est dilué dans de l'eau afin de réaliser des solutions à 2 ng/µl. Des échantillons de 10 ng sont ensuite utilisés pour procéder à la PCR. La PCR est réalisée à l'aide du kit TaKaRa (R001A, TAKARA Bio inc, Japon). Le gène codant la sous-unité α 5 des nAChRs est amplifié à l'aide de l'ADN polymérase TaKaRa LA Taq™ en présence d'amorces spécifiques : sens 5'-AGTCATGTAGACAGGTTCACTCAG-3' et antisens 5'-TGGAAGAAGATCTGCATTTG-3'. La réaction de polymérisation en chaîne est effectuée selon le programme suivant : 3 min à 95°C ; (45 sec à 94°C, 45 sec à 56°C, 45 sec à 72°C) x 35 ; 5 min à 72°C. Le produit amplifié par les amorces est de 192 kb.

3.2.2 Digestion enzymatique

Afin de déterminer le génotype du gène *CHRNA5*, 10 µl de produit d'amplification sont digérés avec l'enzyme de restriction Taq1 (1U, 0,1µl ; *Thermus aquaticus* YT-1 ; Roche Life Science), reconnaissant la séquence suivante : 5'...T C G A...3', 3'...A G C T...5' en présence du tampon de digestion de l'enzyme (10X buffer Taq1, 2µl ; Sigma Aldrich). La séquence reconnue est uniquement présente chez les *Wild-Type* (WT). La réaction de digestion est effectuée dans un volume final (H₂O) de 20µl, à 65°C pendant 1h. Deux fragments de 89 et 93 kb chacun sont obtenus en cas de digestion de la séquence d'ADN.

3.2.3 Migration sur gel d'agarose

Pour la révélation des produits de digestion enzymatique, un volume arbitraire de 8µl du mélange réactionnel est mélangé avec du tampon de charge (eau, 25g de Ficoll 400, 0,25g de bleu de bromophénol, NaOH ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) concentré 5X et l'ensemble est séparé en gel d'agarose 3% (Promega, Etats-Unis) en présence de tampon TBE (Tris, Borate, EDTA ; 10X, Invitrogen, Fisher Scientific) durant 1h à 110V. L'image des gels est obtenue à l'aide de l'imageur LAS-1000 (Fujifilm, Stamford, Etats-Unis) et analysée avec le logiciel Image J. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 30 ▼**.

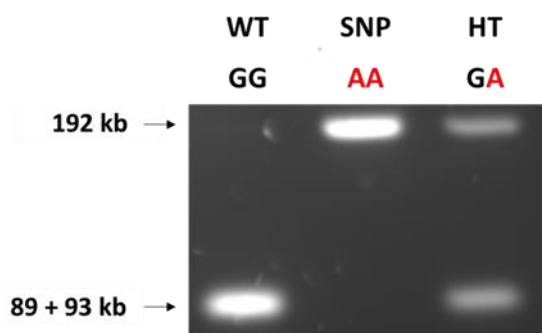


Figure 30 : Exemple de résultats obtenus après génotypage

Le génotypage a été réalisé sur l'ADN issu de fibroscopies, de polypes nasaux et de tissus FFPE et peut indiquer 3 profils différents : l'expression du gène sous sa forme sauvage (WT, allèles GG) est identifiée par la présence de deux bandes sur le gel d'agarose d'une taille de 89 kb et 93 kb chacune en raison de la digestion enzymatique réalisé par l'enzyme de restriction TaqI. L'expression du gène sous sa forme hétérozygote (HT, allèles GA) identifiée par trois bandes d'une taille de 89kb, 93kb et 192kb. Enfin, l'expression du gène sous sa forme homozygote (SNP, allèles AA) est identifiée par une seule bande d'une taille de 192kb.

4. Analyses transcriptomiques

4.1 Hybridation *in situ*

L'expression des ARNm codants le gène *CHRNA5* est évaluée par hybridation *in situ* grâce au kit RNAscope® Technology (Advanced Cell Diagnostics, Inc). Cette technique est basée sur l'observation *in situ* de molécules d'ARNs cibles par amplification simultanée du signal de détection et suppression du bruit de fond (**Figure 31 ▼**). Pour cela, les coupes de tissus FFPE sont incubées à 60°C pendant 2h afin d'effectuer un pré-déparaffinage qui est finalisé par deux incubations au xylène (2x5 min). Les lames sont ensuite séchées pendant 5 min à RT avant d'être prétraitées par le peroxyde d'hydrogène pendant 10 min à RT. Les lames sont incubées dans un bain contenant une solution de démasquage des sites cibles dans un autocuiseur pendant 15 min. Par la suite, les lames sont transférées dans un bain d'alcool pendant 3 min et séchées une nuit à RT. Le lendemain, les lames sont prétraitées à la protéase pendant 30 min à 40°C et incubées avec la sonde *CHRNA5* (Réf : 482401) pendant 2h à 40°C. L'amplification de la cible est réalisée par des hybridations successives et le signal est détecté par le substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidine). Enfin, les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline et éosine et déshydratées dans des bains d'alcools (2 min ; 70% puis 2x2 min ; 95% EtOH) et de xylène (5 min) avant d'être montées dans du milieu de montage à base de xylène et analysées à l'aide d'un microscope (Nikon H5505, Eclipse 50i, Japon) relié à une caméra (NikonDigital Sight D5-U3).

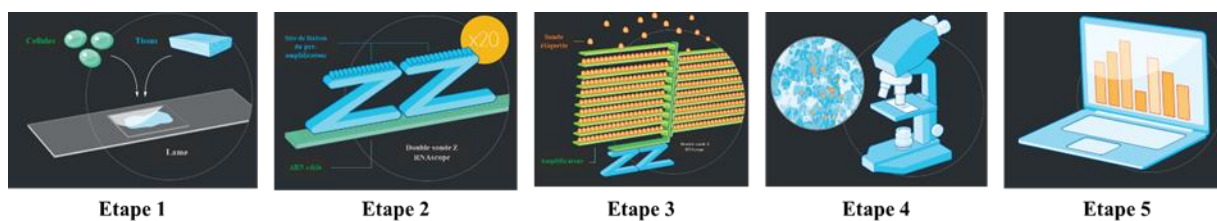


Figure 31 : Principe de détection d'ARN *in situ* par le kit RNAscope technology

Etape 1 : Les coupes histologiques de tissus FFPE sont déparaffinées, prétraitées afin de démasquer les ARNs cibles et perméabilisées. **Etape 2 :** Les sondes d'hybridations spécifiques des ARNs cibles sont établies avec environ 20 doubles sondes Z spécifiques de la cible. **Etape 3 :** Les réactifs de détection amplifient les signaux d'hybridations via des hybridations séquentielles d'amplificateurs et de sonde étiquetées. **Etape 4 :** Chaque point représente une molécule d'ARN et peut être visualisé au microscope. **Etape 5 :** Les signaux sont quantifiés par comptage manuelle sur le logiciel ImageJ.

4.2 RT-qPCR

4.2.1 Extraction des ARNs

4.2.1.1 Cultures Primaires

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.

4.2.1.2 Fibroscopies

Les ARNs des culots brosses de fibroscopies sont extraits grâce au kit *GenElute™ RNA/DNA/Protein Plus Purification Kit* (#RDP300, SIGMA) selon les recommandations du fabricant. En résumé, après fixation de l'ADN dans la colonne de purification adéquate, les ARNs présents dans la solution sont récupérés, lavés à l'alcool et transférés sur une colonne de purification d'ARN permettant la capture de ces derniers dans la résine (1 min ; 6000 RPM). Après un lavage (1 min ; 14 000 RPM), les colonnes sont incubées pendant 15 min avec une solution de DNase à 25°C. Les ARNs retenus sur la colonne sont ensuite lavés 2 fois (2x1 min ; 14 000 RPM), la colonne est asséchée (2 min ; 14 000 RPM) puis éluee dans un volume final de 50µL d'eau stérile par centrifugation (2 min ; 2 000 RPM puis 1 min ; 14 000 RPM). 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.

4.2.2 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.

4.2.3 Polymérisation en chaîne 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 1 ►**. La plaque est ensuite filmée, centrifugée (1 min ; 1,000 g) puis insérée dans le LC480 pour le lancement du programme de PCR : pré-incubation (10 min, 95°C) ; amplification (10 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C ; 1 sec 72°C) sur 40 cycles et refroidissement (30 sec, 40°C).

Gènes	Amorces Sens	Amorces antisens
GAPDH	5'-ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC-3'	5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'
CK5	5'-TTCATGAAGATGTTCTTTGATGC-3'	5'-AGGTTGCGGTGTTGTCC-3'
FOXJ1	5'- CAGATCCCACCTGGCAGA-3'	5'- CGTACTGGGGTCAATGC-3'
MUC5AC	5'- CACGTCCCCTTCAATATCCA-3'	5'- GGCCCAGGTCTCACCTTT-3'
MUC5B	5'- GTACAAATGGCACCTTCTACGG-3'	5'- CTGACATTGCACCGTTGG-3'
CHRNA1	5'- GTCCACACAAGCTCCGGTA-3'	5'- CAGACGGGTCTCATGTTTCG-3'
CHRNA2	5'- CTGTGGTGGCTCCTTCTGA-3'	5'- GGGAGAGGAGAGTGGGTCTC-3'
CHRNA3	5'- TGAAATGGAACCCCTCTGAC-3'	5'- GAAATCCCCAACAGCATTGT-3'
CHRNA4	5'- GCCGGACATCGTCCTCTAC-3'	5'- TGCAGGAGCTCTTGAAATGG-3'
CHRNA5	5'- GACAACAAACGTCTGGTTGAAA-3'	5'- ACAGAGTCTGAAGGAACACGTATAAC-3'
CHRNA6	5'-TTCATGGGGGCTTGTGTC-3'	5'- GAGCCTCTCCTCAGTTGCAC-3'
CHRNA7	5'- CAATGACTCGCAACCACTCA-3'	5'- GTGATCTGTCCAAGACATTTGC-3'
CHRNA9	5'-TCAGAAAATGTGCCCTGAT-3'	5'- GGCCCCACAGAAGTGGATA-3'
CHRNA10	5'- CCCAGATCATCGACATGGA-3'	5'- CCCATCGTAGGTAGGCATCT-3'
CHRN1	5'- CACAAAGGTGTACTTAGACCTGGA-3'	5'- TTCAGTAGCACCACGTCAGG-3'
CHRN2	5'- CTGGCCAGCTCATCAGT-3'	5'- TCCAGGTGAGGCGATAATCT-3'
CHRN3	5'- GGTCCGCCCTGTATTACATTC-3'	5'- TCAGCTGATTCTTTTCATCCAC-3'
CHRN4	5'- TGACGATGAAGACCAGAGTGTC-3'	5'- GGACGCACACAAACATGAAC-3'
CHRNA	5'- GTGTAAGGCTGCCACCTG-3'	5'- GCCGTATACTTGAGGGAAGTGA-3'
CHRNE	5'- TGCTGCTCGCTACTTCC-3'	5'- GGAACAAGAAGACGGTCTGG-3'
CHRNA	5'- AGCAGAGTCACTTTGACAATGG-3'	5'- GTAGTGGGCCATGAGGAAGA-3'

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'étude des différents gènes d'intérêts en PCR

4.2.4 Analyse des données

Les résultats sont normalisés à l'expression du gène de ménage GAPDH puis une quantification relative rapportée aux WTα5 pour chaque temps 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 – CP gène ménage) – (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.

5. Immunomarquage et analyses par microscopie

5.1 Coupes FFPE (IF)

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 les 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 IF est détaillée dans le **tableau 2 ►**.

Anticorps	Espèces	Références	Companies	Concentrations
FoxJ1	Souris	14-9965	Fisher Scientific	IF – 1:100
Ki67	Souris	M7240	Agilent Dako	IF – 1:50
Arl13b	Lapin	17711-1-ap	ProteinTech	IF – 1:200 WMIF – 1:200
Utéroglobine	Lapin	10490-1-ap	ProteinTech	IF - 1:50
P63	Chèvre	AF1916	R&D systems	IF - 1:100
Muc5b	Lapin	E-AB-15988	Elabscience	IF – 1:100 WMIF – 1:100
Muc5ac	Souris	NBP2-15196	Novus Biological	IF – 1:100 WMIF – 1:100
Vimentine	Souris	M0725	Agilent Dako	IF – 1:100
CK13	Chèvre	NBP-1 06047	Novus Biological	WMIF – 1:50
α1	Lapin	HPA071554	Sigma-Aldrich	IF – 1:100
α2	Souris	NBP2-61667	Novus Biological	IF – 1:50
α3	Lapin	HPA029430	Sigma-Aldrich	IF – 1:100
α4	Souris	NBP2-61674	Novus Biological	IF – 1:100
α5	Lapin	HPA054381	Sigma-Aldrich	IF – 1:50
α6	Souris	NBP2-61679	Novus Biological	IF – 1:100
α7	Souris	NBP2-61738	Novus Biological	IF – 1:100
α9	Lapin	26025-1-AP	Proteintech	IF – 1:100
α10	Souris	NBP2-61666	Novus Biological	IF – 1:50
β1	Lapin	HPA005822	Sigma-Aldrich	IF – 1:100
β2	Lapin	17844-1-AP	Proteintech	IF – 1:50
β3	Lapin	APrEST8441 3	Novus Biological	IF – 1:100
β4	Souris	NBP2-61742	Novus Biological	IF – 1:100
δ	Lapin	HPA056404	Sigma-Aldrich	IF – 1:100
ϵ	Lapin	NBP1-79951	Novus Biological	IF – 1:100
γ	Lapin	NBP1-79952	Novus Biological	IF – 1:100

Tableau 2 : Listes des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages

IF : Immunofluorescence sur tissus FFPE ; WMIF : Immunofluorescence sur membranes d'inserts

5.2 Membranes d'inserts (WMIF)

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 12^{ème} 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 (WMIF) est détaillée dans le **tableau 2** ◀. 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.

5.3 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.

5.3.1 Analyse des coupes FFPE

Les images sont traitées en utilisant le logiciel ImageJ. Cinq zones représentatives de chacune des lames sont acquises. Pour l'étude de l'expression des nAChRs, la localisation de chacune des sous-unités est évaluée. En ce qui concerne l'étude de l'effet du SNP α 5 sur le remodelage épithélial, plusieurs paramètres sont évalués pour chaque image :

- La hauteur de l'épithélium ainsi que le pourcentage d'épithélium non-remodelé et remodelé (métaplasie malpighienne, hyperplasie des cellules basales, hyperplasie des cellules caliciformes) sont mesurés
- L'index de prolifération (nombre de cellules Ki67 positives ramené au nombre de noyaux) ainsi que le nombre de cellules basales et de cellules ciliées sont calculés (nombre de cellules p63 et FoxJ1 positives ramené à la longueur de l'épithélium)

- Le taux de Muc5ac, Muc5b et utéroglobine est quantifié en utilisant les niveaux de gris moyen sur le canal d'acquisition de fluorescence d'intérêt après avoir retiré le bruit de fond

5.3.2 Analyse des immunomarquages sur membranes d'inserts

Les images sont traitées en utilisant le logiciel Image J. Cinq zones représentatives de chacune des lames sont acquises. Afin d'étudier l'effet du SNP α 5 sur la différenciation de l'épithélium respiratoire, la quantité de cellules basales (CK13), ciliées (Arl13b) et mucosécrétrices (Muc5ac ou Muc5b) est quantifiée en utilisant les niveaux de gris moyen sur le canal d'acquisition de fluorescence d'intérêt après avoir retiré le bruit de fond sur cinq images représentatives de la membrane avec le logiciel ImageJ.

6. Analyses protéomiques

L'étude d'expression cytokinique est réalisée grâce au kit *Proteome Profiler Human Cytokine Array* (R&D Systems ®) selon les recommandations du fabricant. Ce kit est basé sur la technique de dosage immunologique sandwich sur membrane (**Figure 32 ►**). Des anticorps de capture sont fixés sous forme de spots en duplicats sur une membrane de nitrocellulose et reconnaissent les protéines cibles présentes dans l'échantillon. Ces membranes sont incubées pendant 1h sous agitation à RT dans un tampon de blocage. En parallèle, 500 μ l des surnageants apicaux et basaux congelés à -20°C sont récupérés et incubés dans un cocktail d'anticorps pendant 1h à RT. Le tampon de blocage est ensuite retiré et les membranes incubées avec les mélanges de surnageants/anticorps sous agitation lente une nuit en chambre froide. Après 3 rinçages de 10 min, les membranes sont incubées avec la Streptavidine couplée à l'HRP (peroxydase de raifort de l'anglais *Horseradish peroxidase*) pendant 30 min sous agitation. Elles sont ensuite de nouveau rincées 3x10 min avant d'être incubées dans un réactif de chimioluminescence pendant 1 min dans l'obscurité. Les signaux chimioluminescents sont détectés à l'aide d'un ImageQuantTM LAS-4000 munie d'une caméra CCD refroidie à -30°C (GE Healthcare). L'analyse quantitative des signaux chimioluminescents obtenus est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. La densité de pixels présents sur chaque spot est rapportée à la densité de protéines de références incluses sur la membrane.

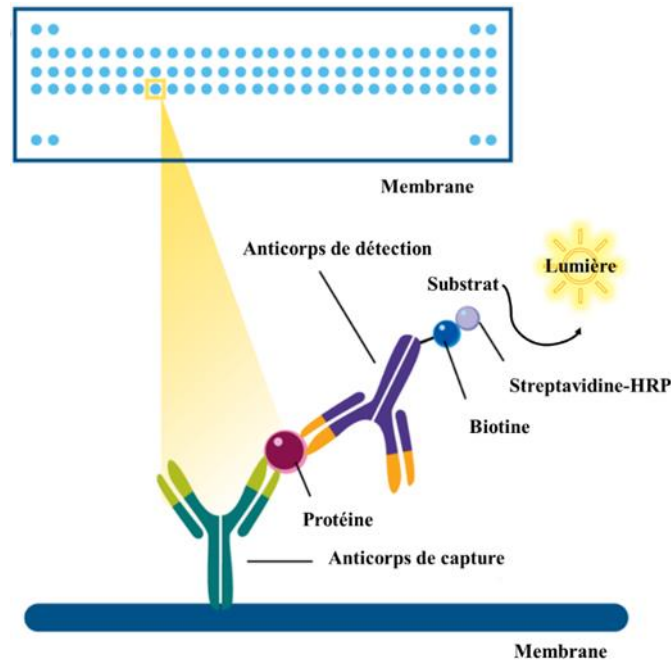


Figure 32 : Principe de détection des protéines par le kit Proteome profiler array

HRP : Horseradish peroxidase = peroxydase de raifort

7. Analyse de données

7.1 Données en RNA-sequencing

L'expression génique d'échantillons tissulaires de poumon et d'échantillons bronchoscopiques des petites voies aériennes de patients fumeurs et non-fumeurs qui ne présentent pas de pathologies respiratoires chroniques a été collectée à partir de bases de données disponibles sur Internet (GEO database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession numbers: GSE103174, GSE76925, GSE47460, GSE11784).

Afin de comparer les données transcriptomiques extraites des diverses bases de données ou des réactions de PCR, les valeurs absolues ont été formatés en échelle de pourcentage. En ce qui concerne la détection de gènes, les valeurs d'expressions les plus basses et les plus élevées pour chaque gène chez les non-fumeurs et les fumeurs ont été identifiées afin de fixer la valeur maximale à 100%. Après avoir exprimé proportionnellement chaque valeur d'expression de toutes les sous-unités, 4 groupes ont été définis : (1) très forte expression, la moyenne de pourcentage d'expression est supérieure à 75% de la valeur maximale ; (2) forte expression, la moyenne de pourcentage d'expression est comprise entre 50 et 75% de la valeur maximale; (3) expression moyenne, la moyenne de pourcentage d'expression est comprise entre 25 et 50% de la valeur maximale ; (4) faible expression, la moyenne de pourcentage d'expression est inférieur à 25 % de la valeur maximale.

En ce qui concerne la répartition des gènes, l'expression totale des valeurs absolues de toutes les sous-unités des nAChRs a été additionnée pour chaque patient afin d'exprimer la proportion d'expression de chaque sous-unité. La moyenne comparative de pourcentage d'expression de chaque sous-unité de tous les patients est représentée en diagramme circulaire.

7.2 Single cell sequencing

La base de données publiée peut être trouvée sur lungcellatlas.org. Nous avons retenu les clusters de cellules en fonction des études originales et uniquement pris en compte les patients sans pathologies respiratoires.

8. Statistiques

Les comparaisons relatives aux données continues ont été analysées selon le test t de Student relatif aux petits échantillons après vérification des hypothèses de normalité et d'égalité de variance ou alors selon le test de Student à un échantillon à la valeur hypothétique de 1 représentant le groupe WT α 5. Les tests non paramétriques ont été traités selon le test de Mann-Whitney. Tous les tests ont été considérés en bilatéral et la significativité statistique est acceptée pour un risque d'erreur alpha de premier ordre inférieur à 5 %. Elle est représentée par * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. Les données sont ensuite représentées sur le logiciel GraphPad Prism (Version 8, États-Unis).

RÉSULTATS

1. Atlas des sous-unités des nAChRs dans les voies aériennes pulmonaires chez l'Homme

1.1 Publication

Nicotinic Receptor Subunits Atlas in the Adult Human Lung

(Diabasana et al., 2020)

International Journal of Molecular Sciences: 9;21(20):7446

1.2 Résumé

Les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) sont des récepteurs membranaires exprimés dans les cellules neuronales et non-neuronales. Ils sont composés de 5 sous-unités organisées en homopentamères ou hétéropentamères qui délimitent un canal perméable aux cations monovalents et divalents (Na^+ , Ca^{2+} , K^+). On dénombre 16 sous-unités chez les mammifères : $\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, δ , ϵ , et γ codées par les gènes *CHRN*. Dans le poumon, ces récepteurs sont impliqués dans la morphogenèse, la régénération épithéliale et la régulation de l'inflammation. En raison de l'absence d'études complètes de l'expression de ces récepteurs dans le poumon et de leur rôle important dans les processus cellulaires, nous avons décidé de déterminer l'expression transcriptomique et protéomique des sous-unités des nAChRs dans les voies aériennes pulmonaires chez l'Homme.

L'expression transcriptomique des récepteurs pulmonaires a été déterminée en utilisant des bases de données de patients fumeurs et non-fumeurs sans pathologies respiratoires associées à des RTqPCR réalisées à partir d'ARN de cellules bronchiques issues de fibroscopies. Enfin, la localisation des sous-unités a été déterminée par immunomarquages de bronches pulmonaires de tissus FFPE.

Nos résultats démontrent que les 16 sous-unités des nAChRs sont exprimées dans les tissus pulmonaires et dans les petites voies aériennes, à l'exception de l' $\alpha 7$ qui n'est pas détecté dans les tissus pulmonaires des sujets non-fumeurs. En revanche, *CHRNA1/A2/A4/B3/D* n'ont pas été détectées dans les larges voies aériennes aussi bien chez les fumeurs que les non-fumeurs. De manière générale, les niveaux d'expression étaient variables entre les sous-unités et en fonction du statut tabagique. A l'échelle de la cellule unique, les transcrits *B3/D/G* n'ont pas été détectés contrairement aux autres sous-unités avec encore une fois des niveaux d'expressions variables entre les sous-unités et en fonction des compartiments cellulaires étudiés (tissus épithéliaux et non-épithéliaux). En ce qui concerne leur expression protéique dans l'épithélium bronchique, les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 3$ et γ n'ont pas été détectées. La sous-unité $\alpha 3$ est localisée au pôle apical des cellules différenciées tandis que l' $\alpha 5$ est localisée dans les noyaux cellulaires ainsi qu'au pôle apical des cellules différenciées. Les sous-unités $\alpha 6$ et $\alpha 9$ présentent une distribution similaire tout comme les sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$, δ et ϵ .

En conclusion, nous avons apporté la première étude approfondie des transcrits et de la localisation des sous-unités des nAChRs dans les voies aériennes pulmonaires chez l'Homme. Nous avons mis en évidence une expression différentielle de certaines sous-unités entre sujets fumeurs et non-fumeurs et entre les différents compartiments pulmonaires.



Article

Nicotinic Receptor Subunits Atlas in the Adult Human Lung

Zania Diabasana ¹, Jeanne-Marie Perotin ^{1,2}, Randa Belgacemi ¹, Julien Ancel ^{1,2},
Pauline Mulette ^{1,2}, Gonzague Delepine ^{1,3}, Philippe Gosset ⁴, Uwe Maskos ⁵,
Myriam Polette ^{1,6}, Gaëtan Deslée ^{1,2} and Valérian Dormoy ^{1,*}

¹ Inserm UMR-S1250, P3Cell, University of Reims Champagne-Ardenne, SFR CAP-SANTE, 51092 Reims, France; zania.diabasana@inserm.fr (Z.D.); jimperotin-collard@chu-reims.fr (J.-M.P.); randa.belgacemi@univ-reims.fr (R.B.); jancel@chu-reims.fr (J.A.); pmulette@chu-reims.fr (P.M.); gdelepine@chu-reims.fr (G.D.); myriam.polette@univ-reims.fr (M.P.); gdeslee@chu-reims.fr (G.D.)

² Department of Respiratory Diseases, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Hôpital Maison Blanche, 51092 Reims, France

³ Department of Thoracic Surgery, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Hôpital Maison Blanche, 51092 Reims, France

⁴ CNRS UMR9017, Inserm U1019, University of Lille, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Institut Pasteur, CIIL—Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France; philippe.gosset@pasteur-lille.fr

⁵ Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, Institut Pasteur, CNRS UMR 3571, 75015 Paris, France; uwe.maskos@pasteur.fr

⁶ Department of Biopathology, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Hôpital Maison Blanche, 51092 Reims, France

* Correspondence: valerian.dormoy@univ-reims.fr; Tel.: +33-(0)3-10-73-62-28; Fax: +33-(0)3-26-06-58-61

Received: 17 September 2020; Accepted: 6 October 2020; Published: 9 October 2020



Abstract: Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are pentameric ligand-gated ion channels responsible for rapid neural and neuromuscular signal transmission. Although it is well documented that 16 subunits are encoded by the human genome, their presence in airway epithelial cells (AECs) remains poorly understood, and contribution to pathology is mainly discussed in the context of cancer. We analysed nAChR subunit expression in the human lungs of smokers and non-smokers using transcriptomic data for whole-lung tissues, isolated large AECs, and isolated small AECs. We identified differential expressions of nAChRs in terms of detection and repartition in the three modalities. Smoking-associated alterations were also unveiled. Then, we identified an nAChR transcriptomic print at the single-cell level. Finally, we reported the localizations of detectable nAChRs in bronchi and large bronchioles. Thus, we compiled the first complete atlas of pulmonary nAChR subunits to open new avenues to further unravel the involvement of these receptors in lung homeostasis and respiratory diseases.

Keywords: nicotinic receptors; airway epithelial cells; lung

1. Introduction

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated (cation-permeable) proteins expressed in the brain and non-neuronal cells, including lung airway epithelial cells (AECs), macrophages, neutrophils, and muscle cells [1]. These receptors are composed of five subunits organized as homo- or hetero-pentamers forming a channel permeable to monovalent and divalent cations (predominantly Na⁺, K⁺, and Ca²⁺) [1,2]. There are 16 mammalian subunits, namely α 1– α 7, α 9– α 10, β 1– β 4, δ , ϵ , and γ (the corresponding gene names are, respectively, CHRN (cholinergic receptors nicotinic subunits)

A1–A7, A9–A10, B1–B4, D, E, and G) [2]. Each subunit shares a common structure comprising a large amino-terminal segment (about 200 residues), four transmembrane domains TM1, TM2, TM3, and TM4 (less than 30 residues each), a large cytoplasmic loop (90 to 270 residues) localized between TM3 and TM4, and a variable carboxyl tail (10 to 30 residues) [2–4]. Muscle-type nAChRs are generally assembled from $2(\alpha 1)/\beta 1/\delta/\gamma$ or $2(\alpha 1)/\beta 1/\delta/\epsilon$ subtypes depending on muscle innervation [4–7]. Neuronal nAChRs are assembled from $\alpha 2$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$ – $\alpha 10$, and $\beta 2$ – $\beta 4$ [8–10]. In the brain, homomeric $\alpha 7$ and heteromeric $\alpha 4/\beta 2$ subtypes are abundantly detected and are known to play an important role in memory and learning due to their predominance in the hippocampal and cortical neurons [11,12]. Other subtypes such as homomeric $\alpha 9$, heteromeric $\alpha 2/\alpha 6$, $\alpha 7/\beta 2$, and $\alpha 9/\alpha 10$ have also been detected to a lesser extent [1–3,12–18]. The diversity of nAChRs confers differential affinities to the ligands affecting several parameters, including the channel opening and closing duration, the modulation of ionic conductance, and cationic selectivity [1,2,12,14].

From a functional perspective, acetylcholine binding to nAChR at the extracellular interface between two subunits leads to an allosteric conformational change permitting the channel opening, followed by ion fluxes across the plasma membrane that participate in cell survival, differentiation, and proliferation [3,9,19,20]. Nicotine, one of the components of cigarette smoke, acts as an agonist implicated in the inhibition of apoptosis and oxidative stress responses, ultimately leading to lung impairments due to long-term exposure [4,21,22]. Although nicotinic receptors are ionotropic complexes, they may display metabotropic signalling properties via their association with trimeric GTP-binding proteins to regulate downstream pathways and cytokine expression [23,24].

Previous studies have established that multiple single-nucleotide nAChR polymorphisms are associated with risks of lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), highlighting their potential implication in respiratory diseases [19,25,26]. In addition, it has been hypothesized that the nAChRs may play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19) and might represent a therapeutic target, particularly regarding their potential contribution in the regulation of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2), the main receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) [27–29]. Altogether, this underlines the requirement of deciphering the atlas of pulmonary nAChR subunits.

Indeed, if the general expressions of muscle and neuronal nAChRs are well known, little information is available regarding their expression in the lung and particularly in different AECs [30]. Therefore, we conducted a transcriptomic and proteomic analysis of the localization and expression of all human nAChR subunits in the adult lung.

2. Results

2.1. Smoking-Associated Pulmonary nAChR Subunit Transcript Expressions

Considering the whole lung contains all types of tissues, including epithelia, muscle, connective, and nervous tissues (Figure 1a), the 16 nAChRs were detected among non-smoker subjects except for CHRNA7, which was consistent in both datasets containing non-smokers (Figure 1b and Supplemental Table S1). CHRNB1/E were very highly expressed; CHRNA6/A9/A10/B3/D were highly expressed (see Section 4). There was a significant increase in CHRNA1/A2/A7/B3/B4 transcript levels in smokers compared to non-smokers. Interestingly, CHRNA7 was only detected in smokers. On the contrary, CHRNA3/A4/A9/B2/D/G transcript levels were significantly decreased in smokers. The global repartition in non-smokers and smokers favoured CHRNA10/B1/E, representing almost half of all nAChR subunits expressed in lung tissues (Figure 1c and Supplemental Table S2). The differential repartitions of nAChRs between non-smokers and smokers matched their differential expressions.

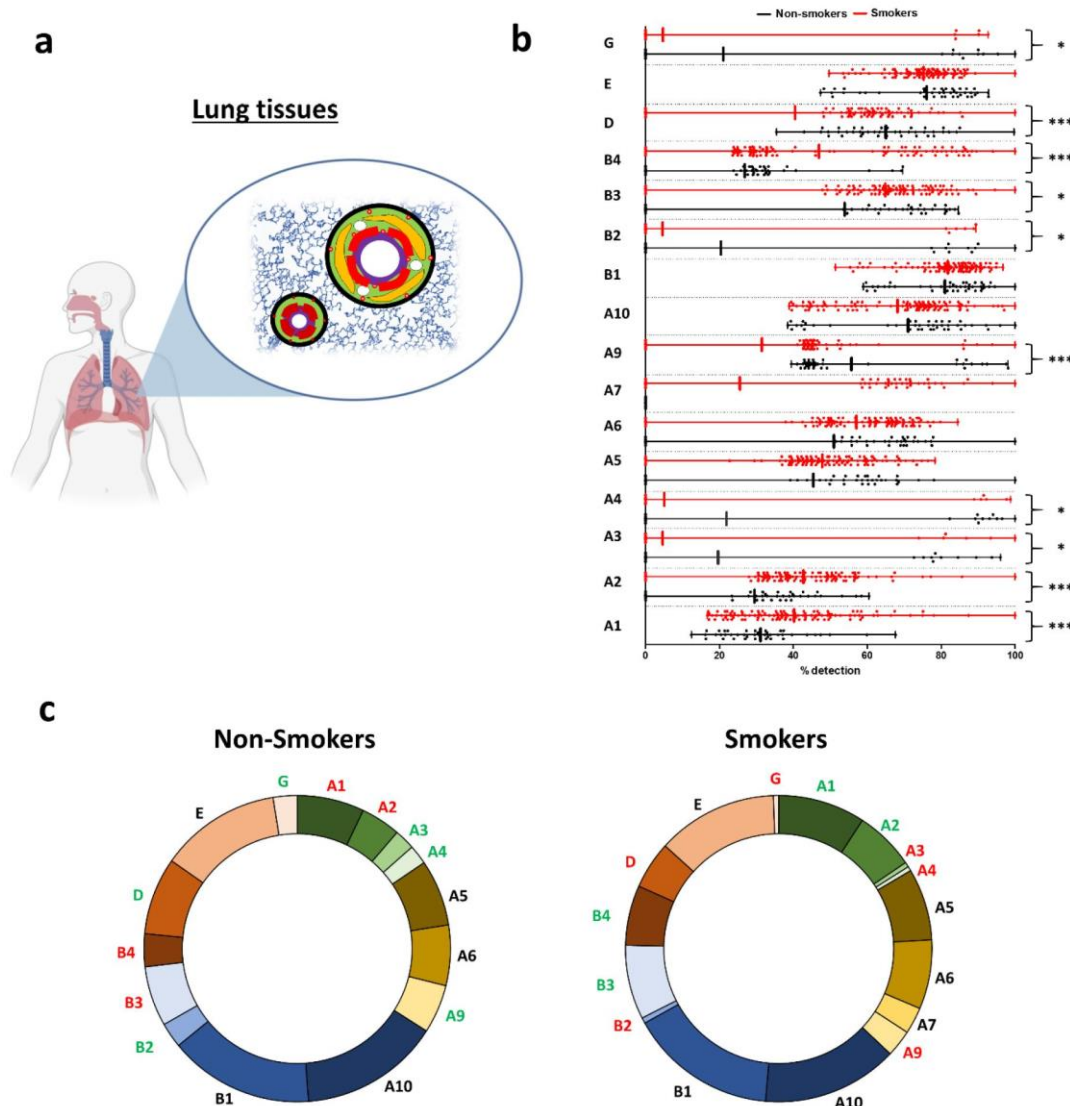


Figure 1. Evaluation of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) transcript levels in human lung tissues. (a) Illustration depicting the origin of the samples. Whole-lung tissues contained all the tissues present in the lung either in parenchyma or in/around bronchi and bronchioles. (b) Histogram showing the detection of nAChRs in non-smokers (black) and smokers (red). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ non-smokers ($n = 42$) vs. smokers ($n = 111$). (c) Pie charts showing the repartition of nAChRs in non-smokers (left) and smokers (right). Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significant.

In large AEC (LAEC) (Figure 2a) CHRNA1/A2/A4/B1/B3/B4/D were not detected in non-smokers (Figure 2b and Supplemental Table S3). CHRNA5 was very highly expressed; CHRNA7/A10 were highly expressed. Interestingly, CHRNB1/B4 were only detected in smokers. There was a significant decrease in CHRNA5/A10 transcript levels in smokers when compared to non-smokers. The global repartition in non-smokers and smokers favoured CHRNA5/A7/A9/A10, representing more than 75% of all nAChRs expressed in LAEC (Figure 2c and Supplemental Table S4). There were no significant differences in terms of nAChR repartitions between non-smokers and smokers.

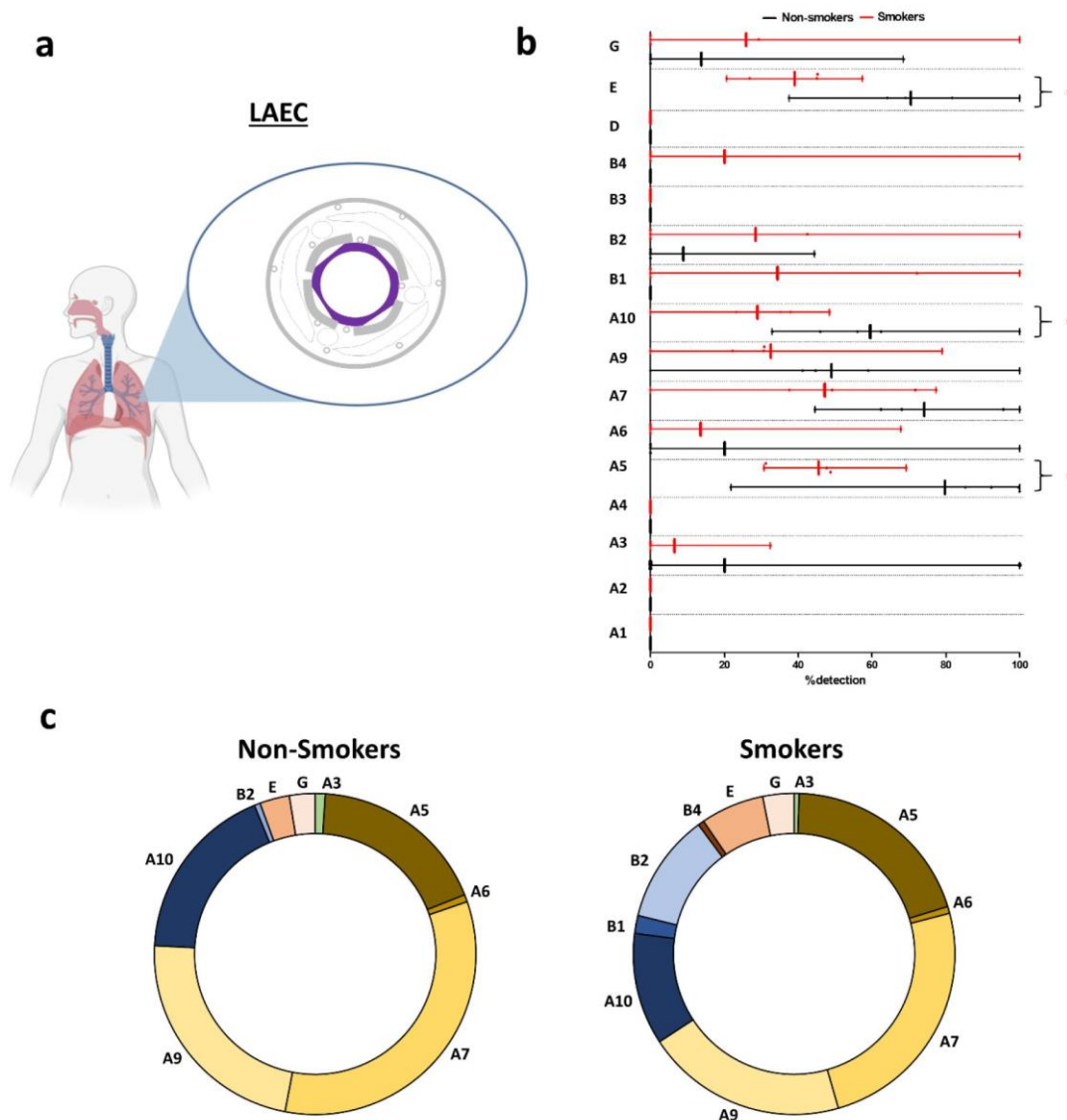


Figure 2. Evaluation of nAChR transcript levels in human large airway epithelial cells (LAECs). (a) Illustration depicting the origin of the samples. Isolated AECs were collected from bronchi. Large airway epithelial cells (LAECs) are depicted in purple. (b) Histogram showing the detection of nAChRs in non-smokers (black) and smokers (red). * $p < 0.05$ non-smokers ($n = 5$) vs. smokers ($n = 5$). (c) Pie charts showing the repartition of nAChRs in non-smokers (left) and smokers (right).

In small AEC (SAEC) (Figure 3a), the 16 nAChRs were detected among non-smokers with moderate or low expressions (Figure 3b and Supplemental Table S5). There was a significant increase in CHRNA5/A7/B2/B3 transcript levels in smokers compared to non-smokers. The global repartition in non-smokers and smokers favoured CHRNA7/A9/A10/B2, representing half of the nAChRs expressed in SAEC (Figure 3c and Supplemental Table S6). There was a significant increase in CHRNA7/B2/B3 and a significant decrease in CHRNA2/A9 in the repartition of nAChRs in smokers compared to non-smokers.

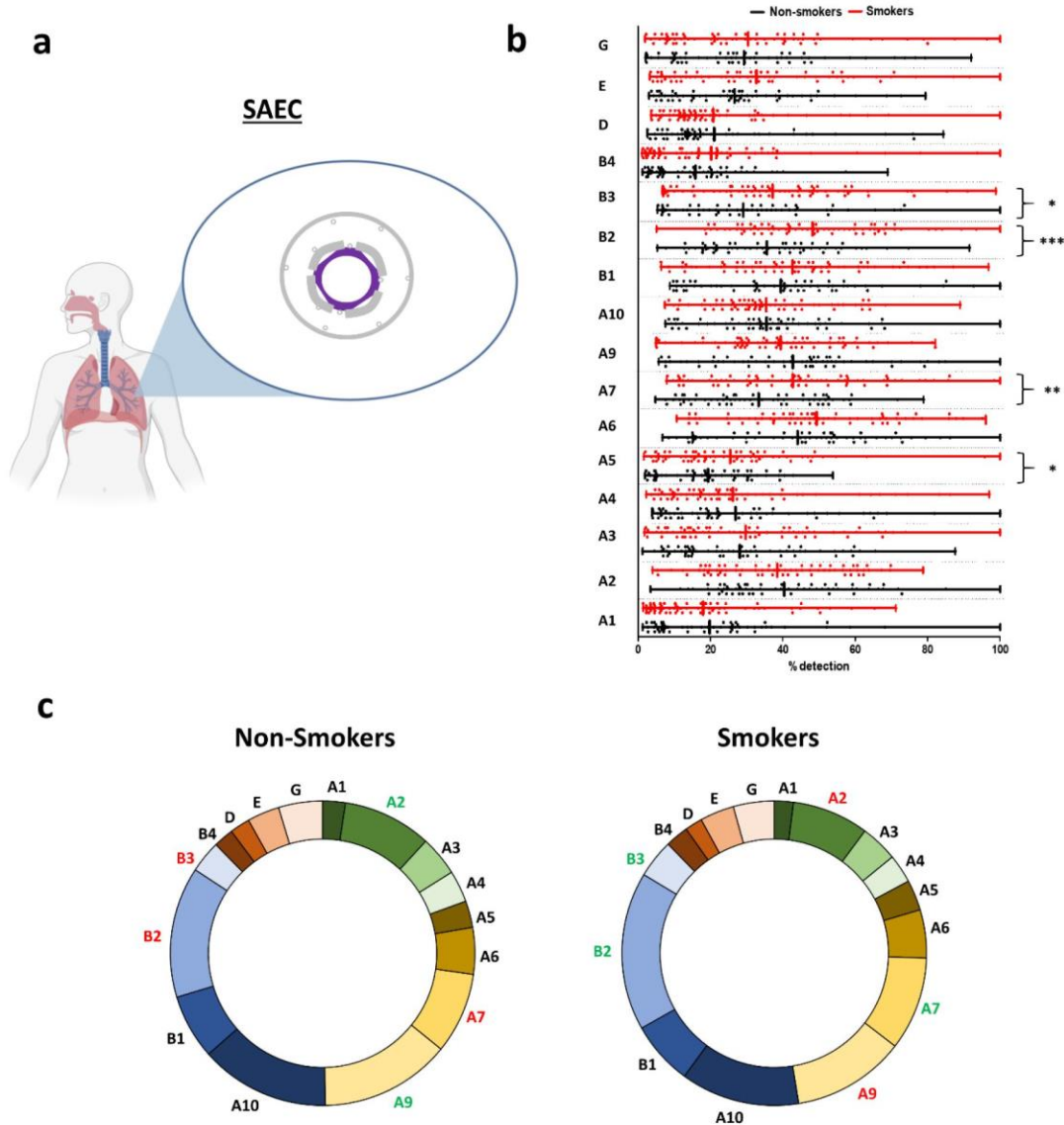


Figure 3. Evaluation of nAChR transcript levels in human small airway epithelial cells (SAECs). (a) Illustration depicting the origin of the samples. Isolated AECs were collected from bronchioles. Small airway epithelial cells (SAECs) are depicted in purple. (b) Histograms showing the detection of nAChRs in non-smokers (black) and smokers (red). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ non-smokers ($n = 63$) vs. smokers ($n = 72$). (c) Pie charts showing the repartition of nAChRs in non-smokers (left) and smokers (right). Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significant.

2.2. Differential Pulmonary nAChRs Transcript Expressions at the Single-Cell Scale

At the level of single-cell transcriptomes (Figure 4), *CHRNA5/A7/A9/A10/B1/E* were highly expressed in most of the AEC populations including alveolar, basal, goblet, multiciliated, and club cells. *CHRNA1/A2/A4/A6/B2/B3/D/G* showed low to no expression in AEC. Interestingly, functional AEC cell populations were distinguished with their nAChR signatures: pneumocytes expressed *CHRNA5/A10/B1*; basal cells expressed *CHRNA5/A7/A10/B1/E*; goblet cells expressed *CHRNA7/A10/B1/E*; multiciliated cells expressed *CHRNA9/10/B1/E*; club cells expressed *CHRNA7/A10/B1*; ionocytes expressed *CHRNA3/B4/E*.

Considering non-epithelial cells, CHRNA1/A3/A5/A10/B1/E were highly expressed in specific populations of immune cells including macrophages, B cells, dendritic cells, and mast cells. CHRNB1 expression was specific to lymphatic cells. CHRNA5/B1/E were highly expressed in fibroblasts; CHRNA3/A10/B1 in smooth muscle cells; CHRNA5/B1/E in endothelial cells and macrophages. B cells and dendritic cells mainly expressed CHRNB1/E.

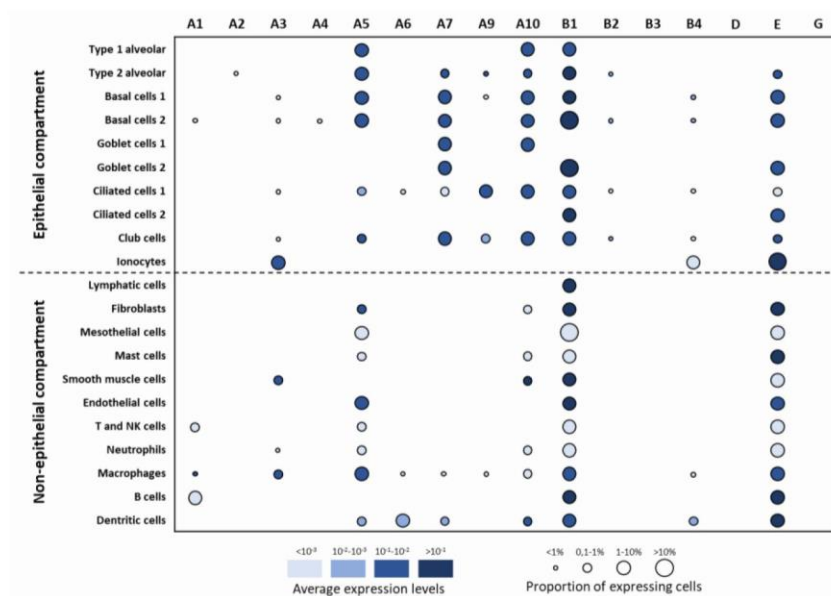
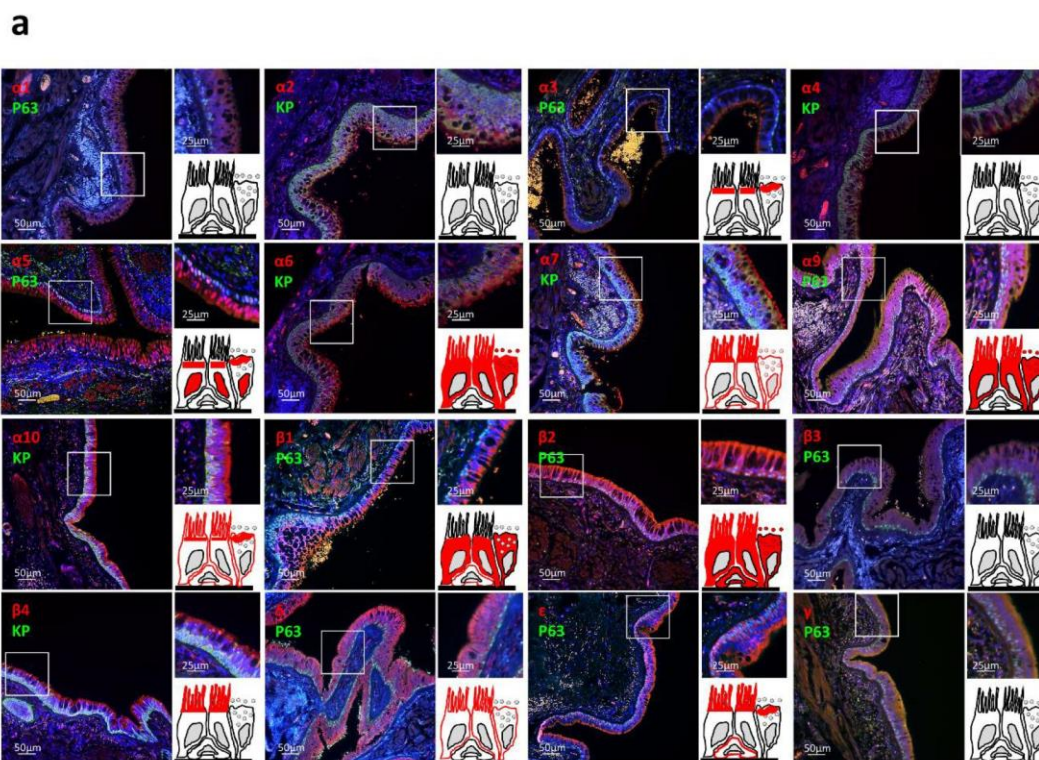


Figure 4. Evaluation of nAChR expressions in lung single-cell populations. Dot plots of nAChR expressions in the epithelial and non-epithelial compartments. The identities of cell populations are shown on the y-axis, and the subunits on the x-axis. The colour intensity represents the average expression level, and the size of the dots represents the proportion of the expressing cells in each population. Raw expression values were normalized, log-transformed, and summarized by published cell clustering.

2.3. Identification of nAChR Subunits in Bronchial and Large Bronchiolar Epithelia

To investigate nAChR subunit localization in the lung, we selected commercially available validated primary antibodies displaying the antigenic sequences demonstrating the lowest percentage of identity with regard to cross-reactivity (Supplemental Tables S7 and S8; Supplemental Figures S1 and S2). We focussed here on bronchi and large bronchioles as well as smooth muscle and blood vessels on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues (Figure 5a,b). Subunits $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 4/\beta 3/\gamma$ were not detected. Subunit $\alpha 3$ seemed restricted to the apical side of differentiated cells. Surprisingly, $\alpha 5$ was systematically found in AEC nuclei and the apical side of differentiated AECs, while its pattern was consistent with membrane-bound receptors on smooth muscle cells. Subunits $\alpha 6$ and $\alpha 9$ presented similar staining in differentiated AECs, such as $\alpha 7/\alpha 10/\beta 1/\beta 2/\delta/\epsilon$, which in addition were found in non-differentiated AECs. Finally, $\beta 4$ appeared in multiciliated cells only. When available, our observations were generally concordant with the data from the Human Protein Atlas (Figure 5b and Supplemental Figure S3).



b

nAChR	Lung localization (S, B, b*)	Cell population	Subcellular localization	Human protein atlas lung detection
α1	-	-	-	-
α2	-	-	-	NA
α3	B, b	Multiciliated and goblet cells	Sub-cilia, apical	Multiciliated cells
α4	-	-	-	NA
α5	S, B, b	Multiciliated, goblet and basal cells Smooth muscle	Epithelial cell nuclei, apical myoepithelial cell membrane	-
α6	B, b	Multiciliated, goblet cells	Cilia, membrane, cytoplasm	NA
α7	S, B, b	Multiciliated, goblet and basal cells Smooth muscle	Cilia, membrane	Multiciliated, goblet, and basal cells
α9	B, b	Multiciliated and goblet cells	Cilia, cytoplasm	NA
α10	S, B, b	Multiciliated, goblet and basal cells Smooth muscle cells	Cilia, membrane	NA
β1	S, B, b	Multiciliated, goblet and basal cells Blood vessels, Smooth muscles	Cytoplasm	Multiciliated and basal cell
β2	B, b	Multiciliated, goblet and basal cells	Cilia, cell membrane	NA
β3	-	-	-	-
β4	B, b	Multiciliated cells	Cilia	NA
δ	B, b	Multiciliated and goblet cells	Cell membrane, cilia	NA
ε	B, b	Multiciliated, goblet and basal cells	Cell membrane	NA
γ	-	-	-	NA

* S, stroma; B, bronchi; b, large bronchioles

Figure 5. nAChR localizations in human respiratory epithelia. (a) Representative micrographs showing the bronchial epithelia on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lung tissues stained for the nAChRs (all red), non-differentiated cells (p63 or pan-cytokeratin, green), and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification corresponding to the selected area is shown. Drawings depict the localization of each nAChR subunit (in red). (b) Table summarizing nAChR subunit cellular and sub-cellular localization and the available microscopic data from the Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). NA, not available; -, no detection.

3. Discussion

This is the first study showing transcript levels and localizations of all nAChR subunits in the human adult lung. Interestingly, we identified distinct variations in terms of nAChR transcript levels between whole-lung tissues, LAEC, and SAEC, as well as important changes between non-smokers and smokers. Since whole-lung transcriptomics encompasses all pulmonary tissues, isolated cell studies represent the ideal strategy to unveil nAChR functions in airways. It has been successfully implemented in the context of AEC differentiation analysis, asthma, and idiopathic pulmonary fibrosis [31–35]. If they summarize the transcriptomic profile of the organ, whole-lung microarray data require tissue or single-cell analyses to distinguish the contribution of each cellular population to the specific gene expression. Otherwise, it would be admitted that a gene is ubiquitously expressed in the lung, while it is only found in one histological tissue. As such, our comparative analysis pointed mainly towards CHRNA5/A7/A10/B2/B3 to tackle the association of nAChR expression and smoking. Furthermore, the impact of smoking could be tied into the associated risks of respiratory diseases, provided complete clinical data are available.

We included in the analysis of nAChR expression levels 298 subjects in three distinct modalities (whole-lung tissues, LAEC, and SAEC) and performed a preliminary identification of single-cell transcriptomic signature. Our immunostaining analyses provided important data regarding the subcellular localization of nAChR subunits in bronchi and large bronchioles. Microscopic observations and transcriptomic analysis were generally concordant. Because of their modalities of association at the cell membrane and their high degree of amino acids identity, nAChR immunostainings were generally sparse, rarely concordant, and performed on murine tissues in the literature [30,36–38]. A careful validation method including heterologous cells overexpressing the different human nAChR subtypes is required to further validate all subunit nAChR antibodies in the human adult lung [39]. Nonetheless, since we selected all our antibodies based on thorough sequence alignments of the antigenic sequences, we provided here a complete description of all nAChRs in bronchi and large bronchioles. Only individual subunits were detected and not the receptors, which are assembled of five subunits; *in vitro* experimental studies will be required to confirm the presence of various pentamers at the cell surface of the lung tissues. Other caveats complicating the identification of nAChRs include their dynamic of assembly/recycling at the cell surface [7,40] and their differential requirement according to the cellular context (quiescence, proliferation, oxidative stress, etc.) [1].

Additional studies on larger cohorts are needed to complement and refine our analysis. Deciphering the cellular and molecular impact of the observed differences in transcript expressions in the context of smoking will be essential to understanding nAChR-associated pathogenesis. It will be particularly insightful for at least three lung diseases where smoking may partly impact homeostasis: lung cancers, COPD, and COVID-19. (i) nAChR single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were associated with lung cancer cells [41,42], and nAChRs were shown to be involved in cancer cell proliferation and survival [43–46]. Interestingly, several subunits (including $\alpha 5$ -7-10/ $\beta 2$ -3) were identified in cancer cell lines, and selective nAChR inhibitors induced anti-tumour effects [47,48]. In addition, acetylcholine-signalling proteins were involved in the progression of lung cancer [49]. Altogether, understanding the repartition and the possible assembly of nAChRs at the cancer cell surface may pave the way towards the design of effective anti-cancer drugs. (ii) nAChR SNPs were also associated with nicotine dependence and COPD [50–54]. CHRNA3/A5/B4 polymorphisms were heavily discussed in the dissection of the genetic origins of COPD, but no functional studies have been published so far [55]. In addition, $\alpha 7$ and its ligands received particular attention as potential inflammatory players in COPD patients [54,56]. Exploring the involvement of nAChRs in COPD pathogenesis and progression in light of their differential distribution in lung cell populations may help improve health care for this pathology lacking treatments. (iii) Nicotine, an exogenous ligand of nAChRs and, more generally, smoking, have been shown *in vitro* and *in vivo* to modulate the expression of hACE2, the main receptor of the SARS-CoV-2 spike S protein [57–60]. In light of the

differential subunit expressions, it will be of interest to analyze the localizations of hACE2 and nAChRs in COVID-19 tissues.

We provided the first atlas of nAChR subunits in the lung and invited cartographers to complete the map in order to provide a fundamental understanding of these crucial actors of homeostasis that may contribute to chronic and acute respiratory diseases. The identification of each potential subunit that may assemble functional channels at the cell surface is a requisite for the optimal design of efficient pharmacological modulations of nAChRs in the context of the pharmacology of the respiratory system.

4. Materials and Methods

4.1. Human Subjects

Patients scheduled for lung resection for cancer (University Hospital of Reims, France) were prospectively recruited ($n = 10$) following standards established and approved by the institutional review board of the University Hospital of Reims, France (IRB Reims-CHU, date of approval: 12 June 2011). In addition, 10 patients who underwent a routine large airway fiberoptic bronchoscopy with bronchial brushings under local anaesthesia according to international guidelines were also recruited (5 non-smokers, 5 smokers) [61]. Informed consent was obtained from all the patients. Subjects were recruited from the Department of Pulmonary Medicine at the 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, date of approval: 31 May 2016) and was conducted in accordance with the ethical guideline of the Declaration of Helsinki. Patients with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cystic fibrosis, bronchiectasis, or pulmonary fibrosis were excluded. At inclusion, age, sex, smoking history, and pulmonary function test results were recorded to exclude patients with an alteration of lung functions. Ex-smokers were considered for a withdrawal longer than 5 years.

4.2. Sample Processing

Fresh airway epithelial cells (AECs) obtained from bronchial brushings (right lower lobe, 5th to 8th divisions) were suspended for 30 min in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) (1% penicillin/streptomycin + 10% Bovine Serum Albumin (BSA)) before centrifugation ($13,500g \times 2$ times). The cell pellet was dissociated in 1 mL of Trypsin Versene (Lonza), centrifuged ($13,500g \times 2$ times), and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further steps.

4.3. RT-qPCR Analyses

Total RNA from AEC bronchial brushings was isolated by a High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics), and 250 ng was reverse-transcribed into cDNA by a Transcriptor First Stand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Quantitative PCR reactions were performed with a Fast Start Universal Probe Master kit and UPL-probe system in a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) as recommended by the manufacturer. Primers listed in Supplementary Table S9 were designed via the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche, Mannheim, Germany). 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'-ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC-3', reverse 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'. We verified that GAPDH transcript detection levels were highly similar between non-smokers and smokers to validate the housekeeping gene (average $Ct = 25.54 \pm 0.17$ in non-smokers vs. 25.35 ± 0.34 in smokers; $p = 0.64$). Relative gene expression was assessed by the $\Delta\Delta Ct$ method [62] and expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. To compare data generated via PCR with RNAseq analysis, we transformed the transcript expressions to a percentage scale considering the highest and lowest values per subunit for the detection, or across all the subunits for the repartition.

4.4. Immunofluorescent Staining and Analyses

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lung tissues distant from the tumour as previously described [63]. Only patients having no respiratory diseases were included (smokers and ex-smokers). Five micrometer sections were processed for hematoxylin and eosin staining and observed on a microscope (×20) to confirm the presence of bronchi and large bronchioles (pseudostratified epithelia). The bronchial epithelium was analysed on the entire slide including 2 to 7 units per patient. FFPE lung tissue section slides were deparaffinised and blocked with 10% BSA in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature. Tissue sections were then incubated with the primary antibodies as listed in Supplementary Table S7 for one night at 4 °C in 3% BSA in PBS. After the PBS wash, a second primary antibody was used to highlight non-differentiated cells on epithelia for 2h at room temperature: p63 (AF1916, 1:200, R&D Systems, Noyal Châtillon sur Seiche, France) or pan-cytokeratin (CK, 1:1000, E-AB-33599, Elabscience, Clinisciences, Nanterre, France). Sections were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies in 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature: Alexa Fluor® (Invitrogen, Fisherscientific, Illkirch, France) donkey anti-rabbit IgG 594 (A21207), donkey anti-goat IgG 488 (A11055), goat anti-mouse IgG 594 (A11005), and goat anti-rabbit IgG 488 (A11008). DNA was stained with DAPI during incubation with the secondary antibodies. Micrographs were acquired on a Zeiss AxioImageur (20× 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 and large bronchioles were taken to evaluate the localization of nicotinic receptors on epithelial and stromal cells. We selected the most suitable primary antibodies directed against each subunit, considering external validations, identity, and staining optimization, to highlight the localization of nAChRs on bronchi and large bronchioles.

4.5. Transcriptome Profiling Microarray Analysis

Gene expressions of non-smoking and smoking subjects with no chronic respiratory diseases were collected from datasets available online (GEO database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) including whole-lung tissue samples in 153 subjects (42 non-smokers, 111 smokers; GSE103174, 76925, and 47460) or small airway bronchoscopic samples (10th to 14th divisions) in 135 subjects (63 non-smokers, 72 smokers; GSE11784).

In order to compare transcriptomic data extracted from various datasets or PCR reactions, we formatted the absolute values to a percentage scale. Concerning the detection of genes, we first identified for each gene the highest and lowest expression values in both non-smokers and smokers to set the maximal value at 100%. After proportionally expressing each of the single expression values for all the subunits, the average was calculated and plotted on a graph. To discuss the relative level of expressions, we arbitrarily categorized 4 groups: (1) very high expressions, the average percentage of expression is over 75% of the maximum; (2) high expressions, the average percentage of expression is between 50 and 75% of the maximum; (3) moderate expressions, the average percentage of expression is between 25 and 50% of the maximum; (4) and low expression, the average percentage of expression is below 25% of the maximum. Concerning the repartition, the total expressions of absolute values for all nAChR were summed for each patient of the considered dataset to express the proportion of each subunit. The comparative average percentage of expression of each subunit for all patients was plotted in a pie chart.

4.6. Single-Cell Sequencing

The published dataset can be found at lungcellatlas.org and <https://www.covid19cellatlas.org>. We retained cell clustering based on the original studies and considered only lung samples (brushing and parenchyma from resected tissues) from subjects with no respiratory disease [33]. An Illumina HiSeq 4000 per 10× Genomics chip position was used ($n = 6$; 2000–5000 cells/sample). Additional sequencing was performed to obtain coverage, or at least mean coverage, of 100,000 reads per cell.

4.7. Statistics

The data are expressed as mean values and percentages. Differences between the two groups (non-smokers and smokers) for each gene were determined using the Student *t* test. A *p*-value < 0.05 was considered significant; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7446/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, V.D.; methodology, V.D.; formal analysis, Z.D., J.-M.P., M.P., P.G., U.M., G.D. (Gaëtan Deslée) and V.D.; investigation, Z.D., R.B. and V.D.; resources, J.-M.P., J.A., P.M., G.D. (Gonzague Delepine) and G.D. (Gaëtan Deslée); data curation, J.-M.P., J.A., P.M. and G.D. (Gaëtan Deslée); writing—original draft preparation, Z.D. and V.D.; writing—review and editing, Z.D., J.-M.P., M.P., P.G., U.M., G.D. (Gaëtan Deslée) and V.D.; supervision, G.D. (Gaëtan Deslée) and V.D.; project administration, V.D.; funding acquisition, P.G., U.M., G.D. (Gaëtan Deslée) and V.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by funding from the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) and a grant from the Research Institute in Public Health (IReSP) in association with the National Institute of Cancer (INCa). It was carried out in the framework of the Federative Research Structure CAP-Santé and benefited from the Project Research and Innovation in Inflammatory Respiratory Diseases (RINNOPARI).

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. The drawings were created with BioRender.com.

Conflicts of Interest: G.D. (Gaëtan Deslée) reports personal fees from Nuvaïra, personal fees from BTG/PneumRx, personal fees from Chiesi, personal fees from Boehringer, personal fees from Astra Zeneca, outside the submitted work. V.D. reports personal fees from Chiesi outside the submitted work. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

nAChRs	Nicotinic acetylcholine receptors
AEC	Airway epithelial cells
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COVID-19	Coronavirus disease 2019
ACE-2	Angiotensin-converting enzyme-2
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
LAEC	Large airway epithelial cell
SAEC	Small airway epithelial cell
SNP	Single-nucleotide polymorphisms
RAS	Renin-angiotensin system

References

- Zoli, M.; Pucci, S.; Vilella, A.; Gotti, C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr. Neuropharmacol.* **2018**, *16*, 338–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dani, J.A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int. Rev. Neurobiol.* **2015**, *124*, 3–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gündisch, D.; Eibl, C. Nicotinic acetylcholine receptor ligands, a patent review (2006–2011). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 1867–1896. [[CrossRef](#)]
- Grando, S.A. Connections of nicotine to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 419–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grassi, F.; Fucile, S. Calcium influx through muscle nAChR-channels: One route, multiple roles. *Neuroscience* **2019**, *439*, 117–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Conti-Tronconi, B.M.; McLane, K.E.; Raftery, M.A.; Grando, S.A.; Protti, M.P. The nicotinic acetylcholine receptor: Structure and autoimmune pathology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *29*, 69–123. [[CrossRef](#)]
- Rudolf, R.; Straka, T. Nicotinic acetylcholine receptor at vertebrate motor endplates: Endocytosis, recycling, and degradation. *Neurosci. Lett.* **2019**, *711*, 134434. [[CrossRef](#)]

8. Kabbani, N.; Nichols, R.A. Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 354–366. [[CrossRef](#)]
9. Papke, R.L.; Lindstrom, J.M. Nicotinic acetylcholine receptors: Conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology* **2020**, *168*, 108021. [[CrossRef](#)]
10. Albuquerque, E.X.; Pereira, E.F.R.; Alkondon, M.; Rogers, S.W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 73–120. [[CrossRef](#)]
11. Baranowska, U.; Wiśniewska, R.J. The $\alpha 7$ -nACh nicotinic receptor and its role in memory and selected diseases of the central nervous system. *Postepy. Hig. Med. Dosw. (Online)* **2017**, *71*, 633–648. [[CrossRef](#)]
12. Bertrand, D.; Terry, A.V. The wonderland of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *151*, 214–225. [[CrossRef](#)]
13. Crespi, A.; Colombo, S.F.; Gotti, C. Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: An update. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1869–1879. [[CrossRef](#)]
14. Medjber, K.; Freidja, M.L.; Grelet, S.; Lorenzato, M.; Maouche, K.; Nawrocki-Raby, B.; Birembaut, P.; Polette, M.; Tournier, J.-M. Role of nicotinic acetylcholine receptors in cell proliferation and tumour invasion in broncho-pulmonary carcinomas. *Lung Cancer* **2015**, *87*, 258–264. [[CrossRef](#)]
15. Koukouli, F.; Rooy, M.; Changeux, J.-P.; Maskos, U. Nicotinic receptors in mouse prefrontal cortex modulate ultraslow fluctuations related to conscious processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 14823–14828. [[CrossRef](#)]
16. Changeux, J.-P.; Corringer, P.-J.; Maskos, U. The nicotinic acetylcholine receptor: From molecular biology to cognition. *Neuropharmacology* **2015**, *96*, 135–136. [[CrossRef](#)]
17. Le Novère, N.; Corringer, P.-J.; Changeux, J.-P. The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* **2002**, *53*, 447–456. [[CrossRef](#)]
18. Wu, J.; Liu, Q.; Tang, P.; Mikkelsen, J.D.; Shen, J.; Whiteaker, P.; Yakel, J.L. Heteromeric $\alpha 7 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 562–574. [[CrossRef](#)]
19. Chen, J.; Cheuk, I.W.Y.; Shin, V.Y.; Kwong, A. Acetylcholine receptors: Key players in cancer development. *Surg. Oncol.* **2019**, *31*, 46–53. [[CrossRef](#)]
20. Maouche, K.; Polette, M.; Jolly, T.; Medjber, K.; Cloëz-Tayarani, I.; Changeux, J.-P.; Burlet, H.; Terryn, C.; Coraux, C.; Zahm, J.-M.; et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 1868–1882. [[CrossRef](#)]
21. Munakata, S.; Ishimori, K.; Kitamura, N.; Ishikawa, S.; Takamami, Y.; Ito, S. Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *99*, 122–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Herman, M.; Tarran, R. E-cigarettes, nicotine, the lung and the brain: Multi-level cascading pathophysiology. *J. Physiol.* **2020**, JP278388. [[CrossRef](#)]
23. Kabbani, N.; Nordman, J.C.; Corgiat, B.A.; Veltri, D.P.; Shehu, A.; Seymour, V.A.; Adams, D.J. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays* **2013**, *35*, 1025–1034. [[CrossRef](#)]
24. King, J.R.; Ullah, A.; Bak, E.; Jafri, M.S.; Kabbani, N. Iontropic and Metabotropic Mechanisms of Allosteric Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Intracellular Calcium. *Mol. Pharmacol.* **2018**, *93*, 601–611. [[CrossRef](#)]
25. Cui, K.; Ge, X.; Ma, H. Four SNPs in the CHRNA3/5 alpha-neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit locus are associated with COPD risk based on meta-analyses. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102324. [[CrossRef](#)]
26. Maskos, U. The nicotinic receptor alpha5 coding polymorphism rs16969968 as a major target in disease: Functional dissection and remaining challenges. *J. Neurochem.* **2020**. [[CrossRef](#)]
27. Sriram, K.; Insel, P.A. A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, bph.15082. [[CrossRef](#)]
28. Oakes, J.M.; Fuchs, R.M.; Gardner, J.D.; Lazartigues, E.; Yue, X. Nicotine and the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2018**, *315*, R895–R906. [[CrossRef](#)]
29. Changeux, J.-P.; Amoura, Z.; Rey, F.A.; Miyara, M. A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic implications. *Comptes Rendus Biol.* **2020**, *343*, 33–39. [[CrossRef](#)]
30. Lam, D.C.-L.; Luo, S.Y.; Fu, K.-H.; Lui, M.M.-S.; Chan, K.-H.; Wistuba, I.I.; Gao, B.; Tsao, S.-W.; Ip, M.S.-M.; Minna, J.D. Nicotinic acetylcholine receptor expression in human airway correlates with lung function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2016**, *310*, L232–L239. [[CrossRef](#)]

31. Reyfman, P.A.; Walter, J.M.; Joshi, N.; Anekalla, K.R.; McQuattie-Pimentel, A.C.; Chiu, S.; Fernandez, R.; Akbarpour, M.; Chen, C.-I.; Ren, Z.; 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*, 1517–1536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schiller, H.B.; Montoro, D.T.; Simon, L.M.; Rawlins, E.L.; Meyer, K.B.; Strunz, M.; Vieira Braga, F.A.; Timens, W.; Koppelman, G.H.; Budinger, G.R.S.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vieira Braga, F.A.; Kar, G.; Berg, M.; Carpaij, O.A.; Polanski, K.; Simon, L.M.; Brouwer, S.; Gomes, T.; Hesse, L.; Jiang, J.; et al. A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1153–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zaragosi, L.E.; Deprez, M.; Barbry, P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 327–336. [[CrossRef](#)]
35. Ruiz García, S.; Deprez, M.; Lebrigand, K.; Cavard, A.; Paquet, A.; Arguel, M.-J.; Magnone, V.; Truchi, M.; Caballero, L.; Leroy, S.; et al. Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development* **2019**. [[CrossRef](#)]
36. Moser, N.; Mechawar, N.; Jones, I.; Gochberg-Sarver, A.; Orr-Urtreger, A.; Plomann, M.; Salas, R.; Molles, B.; Marubio, L.; Roth, U.; et al. Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures: Evaluation of nicotinic receptor antibodies. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 479–492. [[CrossRef](#)]
37. Rommel, F.R.; Raghavan, B.; Paddenberg, R.; Kummer, W.; Tumala, S.; Lochnit, G.; Gieler, U.; Peters, E.M.J. Suitability of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ and Muscarinic Acetylcholine Receptor 3 Antibodies for Immune Detection: Evaluation in Murine Skin. *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, *63*, 329–339. [[CrossRef](#)]
38. Lam, D.C.-L.; Girard, L.; Ramirez, R.; Chau, W.-S.; Suen, W.-S.; Sheridan, S.; Tin, V.P.C.; Chung, L.-P.; Wong, M.P.; Shay, J.W.; et al. Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes in Non-Small-Cell Lung Cancer Reveals Differences between Smokers and Nonsmokers. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4638–4647. [[CrossRef](#)]
39. Garg, B.K.; Loring, R.H. Evaluating Commercially Available Antibodies for Rat $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Histochem. Cytochem.* **2017**, *65*, 499–512. [[CrossRef](#)]
40. Barrantes, F.J. Cell-surface translational dynamics of nicotinic acetylcholine receptors. *Front. Synaptic Neurosci.* **2014**, *6*. [[CrossRef](#)]
41. Amos, C.I.; Wu, X.; Broderick, P.; Gorlov, I.P.; Gu, J.; Eisen, T.; Dong, Q.; Zhang, Q.; Gu, X.; Vijayakrishnan, J.; et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 616–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hung, R.J.; McKay, J.D.; Gaborieau, V.; Boffetta, P.; Hashibe, M.; Zaridze, D.; Mukeria, A.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Lissowska, J.; Rudnai, P.; et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* **2008**, *452*, 633–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sun, P.; Li, L.; Zhao, C.; Pan, M.; Qian, Z.; Su, X. Deficiency of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Attenuates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Mol. Med.* **2017**, *23*, 34–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sun, H.-J.; Jia, Y.-F.; Ma, X.-L. Alpha5 Nicotinic Acetylcholine Receptor Contributes to Nicotine-Induced Lung Cancer Development and Progression. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sun, H.; Ma, X. $\alpha 5$ -nAChR modulates nicotine-induced cell migration and invasion in A549 lung cancer cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2015**, *67*, 477–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bordas, A.; Cedillo, J.L.; Arnalich, F.; Esteban-Rodriguez, I.; Guerra-Pastrián, L.; de Castro, J.; Martín-Sánchez, C.; Atienza, G.; Fernández-Capitan, C.; Rios, J.J.; et al. Expression patterns for nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in smoking-related lung cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 67878–67890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Qian, J.; Liu, Y.; Sun, Z.; Zhangsun, D.; Luo, S. Identification of nicotinic acetylcholine receptor subunits in different lung cancer cell lines and the inhibitory effect of alpha-conotoxin TxID on lung cancer cell growth. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *865*, 172674. [[CrossRef](#)]

48. Witayateeraporn, W.; Arunrungvichian, K.; Pothongsrisit, S.; Doungchawee, J.; Vajragupta, O.; Pongrakhananon, V. α 7-Nicotinic acetylcholine receptor antagonist QND7 suppresses non-small cell lung cancer cell proliferation and migration via inhibition of Akt/mTOR signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *521*, 977–983. [[CrossRef](#)]
49. Friedman, J.R.; Richbart, S.D.; Merritt, J.C.; Brown, K.C.; Nolan, N.A.; Akers, A.T.; Lau, J.K.; Robateau, Z.R.; Miles, S.L.; Dasgupta, P. Acetylcholine signaling system in progression of lung cancers. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *194*, 222–254. [[CrossRef](#)]
50. 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. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000421. [[CrossRef](#)]
51. Pillai, S.G.; Kong, X.; Edwards, L.D.; Cho, M.H.; Anderson, W.H.; Coxson, H.O.; Lomas, D.A.; Silverman, E.K. Loci Identified by Genome-wide Association Studies Influence Different Disease-related Phenotypes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**, *182*, 1498–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cho, M.H.; McDonald, M.-L.N.; Zhou, X.; Mattheisen, M.; Castaldi, P.J.; Hersh, C.P.; DeMeo, D.L.; Sylvia, J.S.; Ziniti, J.; Laird, N.M.; et al. Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: A genome-wide association study and meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* **2014**, *2*, 214–225. [[CrossRef](#)]
53. The Tobacco and Genetics Consortium Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 441–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Douaoui, S.; Djidjik, R.; Boubakeur, M.; Ghernaout, M.; Touil-boukoffa, C.; Oumouna, M.; Derrar, F.; Amrani, Y. GTS-21, an α 7nAChR agonist, suppressed the production of key inflammatory mediators by PBMCs that are elevated in COPD patients and associated with impaired lung function. *Immunobiology* **2020**, *225*, 151950. [[CrossRef](#)]
55. Bray, M.J.; Chen, L.; Fox, L.; Hancock, D.B.; Culverhouse, R.C.; Hartz, S.M.; Johnson, E.O.; Liu, M.; McKay, J.D.; Saccone, N.L.; et al. Dissecting the genetic overlap of smoking behaviors, lung cancer, and chronic obstructive pulmonary disease: A focus on nicotinic receptors and nicotine metabolizing enzyme. *Genet. Epidemiol.* **2020**, *44*, 748–758. [[CrossRef](#)]
56. Yamada, M.; Ichinose, M. The Cholinergic Pathways in Inflammation: A Potential Pharmacotherapeutic Target for COPD. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Cai, G.; Bossé, Y.; Xiao, F.; Kheradmand, F.; Amos, C.I. Tobacco Smoking Increases the Lung Gene Expression of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, rccm.202003-0693LE. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhang, H.; Rostami, M.R.; Leopold, P.L.; Mezey, J.G.; O’Beirne, S.L.; Strulovici-Barel, Y.; Crystal, R.G. Expression of the SARS-CoV-2 ACE2 Receptor in the Human Airway Epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, rccm.202003-0541OC. [[CrossRef](#)]
59. Wang, Q.; Zhang, Y.; Wu, L.; Niu, S.; Song, C.; Zhang, Z.; Lu, G.; Qiao, C.; Hu, Y.; Yuen, K.-Y.; et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* **2020**, *181*, 894–904.e9. [[CrossRef](#)]
60. Russo, P.; Bonassi, S.; Giacconi, R.; Malavolta, M.; Tomino, C.; Maggi, F. COVID-19 and smoking: Is nicotine the hidden link? *Eur. Respir. J.* **2020**, *55*, 2001116. [[CrossRef](#)]
61. Du Rand, I.A.; Blaikley, J.; Booton, R.; Chaudhuri, N.; Gupta, V.; Khalid, S.; Mandal, S.; Martin, J.; Mills, J.; Navani, N.; et al. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: Accredited by NICE. *Thorax* **2013**, *68*, i1–i44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zuo, W.-L.; Yang, J.; Strulovici-Barel, Y.; Salit, J.; Rostami, M.; Mezey, J.G.; O’Beirne, S.L.; Kaner, R.J.; Crystal, R.G. Exaggerated BMP4 signalling alters human airway basal progenitor cell differentiation to cigarette smoking-related phenotypes. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1702553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Perotin, J.-M.; Coraux, C.; Lagonotte, E.; Birembaut, P.; Delepine, G.; Polette, M.; Deslée, G.; Dormoy, V. Alteration of primary cilia in COPD. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1800122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Supporting information

Nicotinic receptor subunits atlas in the adult human lung

Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin¹, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Gonzague Delepine, Philippe Gosset, Uwe Maskos, Myriam Polette, Gaëtan Deslée and Valérian Dormoy

1. Supporting information Tables

Table S1. Percentages of detection of each nAChR subunit in whole lung tissue transcriptomes.

CHR N	Non-Smokers (n=42)		Smokers (n=111)		p
	Detection (%)	SD	Detection (%)	SD	
A1	31.11	11.48	40.17	15.96	***
A2	29.43	18.56	42.70	15.97	***
A3	19.64	35.77	4.65	19.64	*
A4	21.93	39.78	5.04	21.21	*
A5	45.39	27.60	47.80	15.67	ns
A6	50.95	30.07	57.04	16.94	ns
A7	0.00	0.0	25.53	34.62	NA
A9	55.71	19.48	31.49	26.00	***
A10	71.02	17.65	68.19	15.47	ns
B1	80.99	11.40	81.80	9.33	ns
B2	20.37	37.01	4.61	19.40	*
B3	53.87	31.47	64.87	18.65	*
B4	26.84	18.74	46.92	26.15	***
D	65.00	13.14	40.45	31.39	***
E	76.07	13.68	75.21	8.35	ns
G	21.05	38.22	4.73	19.88	*

ns, non-significate; SD, standard deviation ; NA, not applicable. Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significant.

Table S2. Repartitions of the gene expressions of each nAChR subunit in whole lung tissue transcriptomes.

CHR N	Non-Smokers (n=42)		Smokers (n=111)		p
	Expression (%)	SD	Expression (%)	SD	
A1	7.09	2.36	9.20	3.44	***
A2	4.20	2.59	6.32	2.37	***
A3	2.17	3.94	0.51	2.14	***
A4	2.05	3.72	0.47	1.97	***
A5	7.00	4.17	7.59	2.40	ns
A6	6.38	3.76	7.31	2.06	ns

A7	0.00	0.00	2.80	3.81	NA
A9	5.13	2.12	2.84	2.42	***
A10	14.79	3.23	14.34	3.00	ns
B1	15.29	1.72	15.55	1.618	ns
B2	2.66	4.83	0.60	2.51	***
B3	6.33	3.68	7.83	2.17	**
B4	3.47	2.35	6.33	3.64	***
D	8.15	1.79	5.02	3.91	***
E	12.76	1.85	12.73	1.22	ns
G	2.53	4.58	0.56	2.37	***

ns, non-significate; SD, standard deviation ; NA, not applicable. Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significate.

Table S3. Percentages of detection of each nAChR subunit in LAEC transcriptomes.

CHR N	Non-Smokers (n=5)		Smokers (n=5)		p
	Detection (%)	SD	Detection (%)	SD	
A1	0.00	0.00	0.00	0.00	NA
A2	0.00	0.00	0.00	0.00	NA
A3	20.00	44.72	6.48	14.50	ns
A4	0.00	0.00	0.00	0.00	NA
A5	79.80	33.01	45.57	15.82	*
A6	20.00	44.72	13.57	30.33	ns
A7	74.13	23.32	47.17	30.96	ns
A9	49.00	35.99	32.56	28.86	ns
A10	59.49	25.23	28.97	18.51	*
B1	0.00	0.00	34.44	48.17	NA
B2	8.88	19.88	28.50	44.00	ns
B3	0.00	0.00	0.00	0.00	NA
B4	0.00	0.00	20.00	44.72	NA
D	0.00	0.00	0.00	0.00	NA
E	70.50	23.07	39.02	15.03	*
G	13.71	30.65	25.86	43.34	ns

ns, non-significate; SD, standard deviation ; NA, not applicable. Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significate.

Table S4. Repartitions of the gene expressions of each nAChR subunit in LAEC transcriptomes.

CHR N	Non-Smokers (n=5)		Smokers (n=5)		p
	Expression (%)	SD	Expression (%)	SD	
A1	0.00	0.00	0.00	0.00	ns
A2	0.00	0.00	0.00	0.00	ns
A3	1.01	2.26	0.50	1.13	ns
A4	0.00	0.00	0.00	0.00	ns
A5	17.98	9.69	19.73	18.14	ns

A6	0.73	1.63	0.70	1.56	ns
A7	33.29	12.50	24.63	16.38	ns
A9	22.82	14.14	20.23	16.04	ns
A10	18.00	2.99	11.26	7.32	ns
B1	0.00	0.00	1.81	2.63	NA
B2	0.60	1.33	11.02	21.25	NA
B3	0.00	0.00	0.00	0.00	ns
B4	0.00	0.00	0.61	1.37	NA
D	0.00	0.00	0.00	0.00	ns
E	2.99	3.21	6.38	6.25	ns
G	2.58	5.77	3.13	5.15	ns

ns, non-significate; SD, standard deviation ; NA, not applicable.

Table S5. Percentages of detection of each nAChR subunit in SAEC transcriptomes.

CHR N	Non-Smokers (n=63)		Smokers (n=72)		p
	Detection (%)	SD	Detection (%)	SD	
A1	19.76	18.19	17.94	16.64	ns
A2	40.37	19.26	38.47	18.26	ns
A3	28.09	18.87	29.69	21.35	ns
A4	26.91	21.26	26.16	20.95	ns
A5	19.34	12.45	25.44	19.05	*
A6	44.07	22.46	49.31	21.30	ns
A7	33.33	17.59	42.75	23.26	**
A9	42.73	22.00	39.41	17.81	ns
A10	35.52	17.83	35.41	16.35	ns
B1	39.45	21.82	42.64	20.75	ns
B2	35.57	17.80	48.21	20.14	***
B3	29.03	20.59	37.20	21.75	*
B4	15.82	13.51	20.19	20.67	ns
D	21.04	18.37	20.74	16.82	ns
E	26.68	17.79	32.67	23.12	ns
G	29.29	20.95	30.43	23.50	ns

ns, non-significate; SD, standard deviation. Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significant.

Table S6. Repartitions of the gene expressions of each nAChR subunit in SAEC transcriptomes.

CHR N	Non-Smokers (n=63)		Smokers (n=72)		p
	Expression (%)	SD	Expression (%)	SD	
A1	2.41	1.70	2.03	1.68	ns
A2	9.43	3.86	8.13	3.77	*
A3	4.23	2.37	3.95	2.46	ns
A4	3.37	2.22	3.04	2.33	ns

A5	2.83	1.56	3.24	1.81	ns
A6	4.95	2.00	5.11	1.99	ns
A7	8.61	3.46	9.93	4.61	*
A9	13.88	5.53	11.99	4.86	*
A10	13.76	5.08	12.62	4.55	ns
B1	6.87	3.07	6.78	2.81	ns
B2	13.89	4.98	16.81	5.17	**
B3	3.41	1.83	4.09	2.00	*
B4	2.14	1.35	2.46	2.04	ns
D	2.14	1.66	1.86	1.38	ns
E	3.41	2.34	3.62	2.57	ns
G	4.67	2.65	4.34	2.67	ns

ns, non-significant; SD, standard deviation. Coloured subunits indicate upregulation (green) and downregulation (red) in both groups when statistically significant.

Table S7. List of CHRN antibodies.

Antibodies	Species	Reference	Companies	Concentrations
$\alpha 1$	Rabbit	HPA071554	Sigma-Aldrich	1:100
$\alpha 2$	Mouse	NBP2-61667	Novus Biological	1:50
$\alpha 3$	Rabbit	HPA029430	Sigma-Aldrich	1:100
$\alpha 4$	Mouse	NBP2-61674	Novus Biological	1:100
$\alpha 5$	Rabbit	HPA054381	Sigma-Aldrich	1:50
$\alpha 6$	Mouse	NBP2-61679	Novus Biological	1:100
$\alpha 7$	Mouse	NBP2-61738	Novus Biological	1:100
$\alpha 9$	Rabbit	26025-1-AP	Proteintech	1:100
$\alpha 10$	Mouse	NBP2-61666	Novus Biological	1:50
$\beta 1$	Rabbit	HPA005822	Sigma-Aldrich	1:100
$\beta 2$	Rabbit	17844-1-AP	Proteintech	1:50
$\beta 3$	Rabbit	APrEST84413	Novus Biological	1:100
$\beta 4$	Mouse	NBP2-61742	Novus Biological	1:100
δ	Rabbit	HPA056404	Sigma-Aldrich	1:100
ϵ	Rabbit	NBP1-79951	Novus Biological	1:100
γ	Rabbit	NBP1-79952	Novus Biological	1:100

Table S8. List of recognition antigens of CHRN antibodies and their percentages of identity.

s.u.	Antigenic sequences	Position	Identity*
$\alpha 1$	MKLGWTWYDGSVVAINPESDQPDLNFMESGEWVIKESRGWKHSVYSCCPDTPYLDITYH F	189-250	$\alpha 2/3/4/6$
$\alpha 2$	EEAKRPPPRAPGDPLSSPPTALPQGGSHTEEDRLFHKHLFRGYNRWARVPNTSDVVIVRFG LSIAQLIDVDEKNQMMTTNVWLKQEWSDYKLRWNPTDFGNITSLRVPSEMIWIPDIVLYNN	27-264	$\alpha 4$
	ADGEFAVTHMTKAHLFSTGTVHWVPPAIYKSSCSIDVTFFPFQDQCNCKMFKGWSWYDKAKI DLEQMEQTVDLKDYWESGEWAIVNATGTYNSSKYDCCAIEYDPDVTYAFVIRRL		$\alpha 3/5/6$ $\beta 3$
$\alpha 3$	RTPTHTMPSWVKTVFLNLLPRVMFMTRPTSNEGNAQKPRPLYGAELSNLNCFSRAESKGC KEGYPCQDGMCGYCHHRIKISNFSANLTRSSSESVDVAVLSLSALSPEIKEAIQSVKYIAENM KAQNEAKEIQDDWKYVAM	331-473	$\alpha 1/2/6$ $\beta 2/4$
$\alpha 4$	HVETRAHAERLLKLFSGYNKWSRPVANISDVVLRVFLSIAQLIDVDEKNQMMTTNVW VKQEWHDYKLRWDPADYENVTSIRIPSELIWRPDIYLYNNADGDFAVTHLTKAHLFHDGR VQWTPPAIYKSSCSIDVTFFPFQDQCNCTMKFGSWYDKAKIDLVMHRSRVDQLDFWESGE WVIVDAVGTYNTRKYECCAIEYDPDITYAFVIRRL	29-242	$\alpha 2$
			$\alpha 3/5/6$ $\beta 3$
$\alpha 5$	AQRGLSEPSIAKHEDSLLKDLFQDYERWVRPVEHLNDK	33-71	$\beta 3$
			$\alpha 4$
$\alpha 6$	KGCVGCATEERLHFHKLFSHYNQFIRPVENVSDPVTVHFEVAITQLANVDEVNQIMETNLWL RHIWNDYKLRWDPMEYDGIETLRVPADKIWKPDIVLYNNAVGDVQVEGKTKALLKYNGMI TWTPPAIFKSSCPMDITFFPFQDQCNCSLKFQSWYDKAEIDLLIIGSKVDMNDFWENSEWEII DASGYKHDIKYNCCIEYTDITYSFYIRRL	26-239	$\alpha 3$
			$\alpha 2/4/5$ $\beta 3$
$\alpha 7$	LYKELVKNYNPLERPVANSDSQPLTVYFSLQLQIMDVDEKNQVLTNTIWLQMSWTDHYLQ WNVSEYPGVKTFRFPDQGIWKPDILLYNSADE	58-149	$\alpha 2/3/4/10$
$\alpha 9$	HFCGAEARPVPHWARVVILKYMSRVLFVYDVGESCLSPHHSRERDHLTKVYSKLPESNLKA ARNKDLRSRKKDMNKRKLNLDLGCQGNPQEAESYCAQYKVLTRNIEYIAKCLKDHKATNS KGSEWKKVAKVIDRFFMWIFFIMVFVMTILIIARAD	324-479	$\alpha 2/4/6/10$
$\alpha 10$	AEGRALALKLFRDLFANYTSALRPVADTDQTLNVTLEVTLSQIIDMDERNQVLTLYLWIRQEW TDAYLRWDPNAYGGLDAIRIPSSLVWRPDIYLYNKADAQPPGASTNVVLRHDGAVRWDA PAITRSSCRVDVAAFPDAQHCGLTFGSWTHGGHQLDVRPRGAAASLADVENVEWRVVG MPARRRVLTYGCCSEYPDVTFTLLRRRAA	25-237	$\alpha 9$
			$\alpha 3/7$
$\beta 1$	LSVVVLNLHHRSPHHTQMPLWVRQIFIHKLPLYLRLKRPKPERDLMPPEPHCSSPGSGWGR GTDEYFIRKPPSDFLPKPNRFQPELSAPDLRRFIDGPNRAVALLPELREVSSISYIARQLQEQ EDHDALKEDWQF	325-462	$\alpha 3$
			$\beta 2/4$
$\beta 2$	LLRLCSGVWGTDEERLVEHLLDPSRYNKLIRPATNGSELVTVQLMVSLAQLISVHEREQIMT TNVWLTQEWEDYRLTWKPEEFDNMKKVRLPSKHIWLPDVVLYNNADGMYEVSFYNSAVV SYDGSIFWLPPIYKSAKIEVKHFPDQDQCNCTMKFRSWYDRTEIDLVLKSEVASLDDFTPS GEWDIVALPGRNENPDDSTYVDITYD	16-227	$\beta 4$
			$\alpha 2$

$\beta 3$	TGFNSIAENEDALLRHLFQGYQKWVRPVLHSNDTI	20-54	$\alpha 5$
			$\alpha 2/4$
$\beta 4$	CRVANAEKLMDDLLNKTRYNNLIRPATSSSQLISIKLQLSLAQLISVNEREQIMTTNVWLKQ EWTDYRLTWNSSRYEGVNILRIPAKRIWLPDIVLYNNADGTYEVSVYTNLIVRSNGSVLWLP PAIYKSACKIEVKYFPDQQNCTLKFRSWTYDHTEIDMVLMTPTASMDDFTPSGEWDIVALP GRRTVNPQDPSYVDVITYDFIHKRKLPHYT	21-236	$\beta 2$
			$\alpha 3$
			$\beta 3$
δ	LVRSSSLGYISKAEEYFLKSRSDLMFEKQSERHGLARRLTARRPPASSEQAQQELFNELKP AVDGANFIVNHMRDQNNYNEEKDSWNR	374-464	$\beta 2$
ϵ	GLLGRGVGKNEELRLYHHLFNNDYDPSRVPREPEDTVTISLKVTLTNLIS	13-62	$\alpha 6, \gamma$
γ	NYDPNLRPAERDSVNVSLKLTNLISLNEREEALTTNVWIEMQWCDY	36-85	δ
			$\alpha 7, \beta 2/4$

* Range of the percentage of identity obtained from blastp: yellow, 65-80%; light green, 50-65%; dark green, <50%.

Table S9. List of primers.

ENES	GenBank	Forward sequence	Reverse sequence	Amplicon size (b)
CHRNA1	NM_001039523.2	5'- GTCCACACAAGCTCCGGTA-3'	5'- CAGACGGGTCTCATGTTCG-3'	104
CHRNA2	NM_000742.3	5'- CTGTGGTGGCTCCTTCTGA-3'	5'- GGGAGAGGAGAGTGGGTCTC-3'	87
CHRNA3	NM_000743.4	5'- TGAAATGGAACCCCTCTGAC-3'	5'- GAAATCCCCAACAGCATTGT-3'	107
CHRNA4	NM_000744.6	5'- GCCGGACATCGTCCTAC-3'	5'- TGCAGGAGCTCTGTAAATGG-3'	125
CHRNA5	NM_000745.3	5'- GACAACAAACGTCTGGTTGAAA-3'	5'- ACAGAGTCTGAAGGAACACGTATAAC-3'	105
CHRNA6	NM_004198.3	5'- TTCATGGGGGCTTGITGC-3'	5'- GAGCTCTCCTCAGTTGCAC-3'	83
CHRNA7	NM_000746.5	5'- CAATGACTCGCAACCACTCA-3'	5'- GTGATCTGTCCAAGACATTTGC-3'	121
CHRNA9	NM_017581.3	5'-TCAGAAAATGTGCCCTGAT-3'	5'- GGCCCCACAGAAGTGGATA-3'	108
CHRNA10	NM_020402.3	5'- CCCAGATCATCGACATGGA-3'	5'- CCCATCGTAGGTAGGCATCT-3'	90
CHRNB1	NM_000747.2	5'- CACAAAGGTGTACTTAGACCTGGA-3'	5'- TTCAGTAGCACCACGTCAGG-3'	129
CHRNB2	NM_000748.2	5'- CTGGCCCAGTCATCAGT-3'	5'- TCCAGGTGAGGCGATAATCT-3'	94
CHRNB3	NM_000749.4	5'- GGTCCGCCCTGTATTACATTC-3'	5'- TCAGCTGATTCTTTTCATCCAC-3'	95
CHRNB4	NM_000750.4	5'- TGACGATGAAGACCAGAGTGTC-3'	5'- GGACGCACACAAACATGAAC-3'	95
CHRND	NM_000751.3	5'- GGGACCAGAACAATTACAATGAG-3'	5'- GCAGGAAGATCCAGGCTGT-3'	113
CHRNE	NM_000080.4	5'- CGACACAGAGGCCTATACTGAG-3'	5'- GCGGATGATGAGCGAGTAG-3'	93
CHRNG	NM_005199.4	5'- AGCAGAGTCACTTTGACAATGG-3'	5'- GTAGTGGCCATGAGGAAGA-3'	131

2. Supporting information Figures

Figure S1. Constraint-based Multiple Alignment of CHRN antibodies. COBALT alignment is shown for the 16 subunits and antigen sequences of corresponding antibodies are highlighted in grey. Red amino acids are conserved for all subunits.

α1	001	MEPW-----PLLLL-----FSLCS-----AGL-----VLGSEH-----ETRLVAKLFKD--YS	36
α2	001	MGPS-cpvf1SFTKLSLwll1LTPAGGEEakr-ppprAPGdplsspsPTALPQggshte-t-----EDRLFKHLFRG--YN	71
α3	001	M-----gsgplSLPLALSpprllLLLLLSL-----LPV-----ARASEA-----EHR1FERLFFED--YN	47
α4	001	M-----ELGGPGapr-llp-----pl1111GTGLLRasshve-TRAHAERERLKKLFSG--YN	49
α5	001	MAAR-gsgprALRLLL-----vQLVAGRCG-----LAG-----AAGGQRglsepssiakhEDSLKDLFDQ--YE	59
α6	001	MLTSkgqgflHGGLCL-----WLCVFTPF-----FKG-----CVGCAT-----EERLFHKLFVSH--YN	46
α7	001	MRCSpvgvwlALAASLHlg--KATASPPSTppwdpghIPG-----ASVRPAppvsl--qgefQRKLYKELVKN--YN	67
α9	001	-----MNwshsCISF-----CW-----YFAASrlraaetadgkyAQKLFNDLFFED--YS	43
α10	001	-----MGlrrshLSLGLLlfl-lpaeCLG-----AEGRLA1-----K1FRDLFAN--YT	42
β1	001	MTPG-----ALLMLlg--ALGAPL-----APG-----VRGSEA-----EGR1REKLFVSG--YD	39
β2	001	MARRegpvallLGFGL-----LRLCS-----G-----VWGTDT-----EER1VEHL1LDPsrYN	43
β3	001	M-----LPDFML-----vLIVLG-----IPSSAT1qfn--S1aenEDALLRHLFQG--YQ	41
β4	001	MRR--aps1vL--FFL-----VALCG-----RGN-----CRVANA-----EEL1MDDL1NK1rYN	41
γ	001	MHGG-----QG1LLL-----LLAVCL-----G-----AQGRNQ-----EER1LAD1MQN--YD	38
ε	001	MARA-----PLGVLL1-----G-----LLGRGV-gkne-----E1RL1YHHL1FNN--YD	36
δ	001	MEGP-----VLTGLL-----AALAVC-----G-----SWGLNE-----EER1IRHL1FQEKgYN	39
α1	037	SVVRPVEDHRQVVEVTGLQLIQLINVDENVQIVTTNVR1KQgdmvdlprpscvtlgvplfshlqneQWVDYN1KWNPPD	116
α2	072	RWARFVPNTSDVVIVRFGLSIAQLIDVD1EKNQMMTTNVWLKQ-----EWDYK1LRWNPTD	126
α3	048	E1IRFVANVSDPVI1HFVSMSQLVKVDENVQIMETNLWLKQ-----IWN1YK1LKNWPSD	102
α4	050	KWSRFVANISDVLVRFGLSIAQLIDVD1EKNQMMTTNVWLKQ-----EWDYK1LRWDPAD	104
α5	060	RWVRPVEHLNDK1KIKFGLAISQLVDVD1EKNQMLTTNVWLKQ-----EWD1VK1LRWNPPD	114
α6	047	QF1RFVENVSDPVTVHFVAITQLANVDENVQIMETNLWL1RH-----IWN1YK1LRWDPME	101
α7	068	PLERFVANDSQPLTVYFSLSLQIMD1VD1EKNQVLT1TN1WLQ1M-----SWTDH1LQ1WNVSE	122
α9	044	NALRFVEDTDKVLNVTLQ1T1LSQ1K1DM1DERNO1L1TAY1LW1RQ-----IWH1D1AY1L1WDRDQ	98
α10	043	SALRFVADTDQ1TLNV1TEV1TL1SQ1ID1MD1ERNO1V1TL1YL1W1RQ-----EWT1D1AY1LRWDPNA	97
β1	040	SSVRPAREVGD1R1VR1SV1GL1LA1QL1SL1NE1K1DEE1M1ST1KV1Y1LDL-----EWT1DY1RL1SWDPAE	94
β2	044	KL1RF1AT1NG1SEL1TV1QL1M1V1SL1A1QL1SV1HERE1Q1IM1TT1NV1WL1TQ-----EWD1E1Y1RL1TWKPEE	96
β3	042	KWVRFLHSND1TK1VY1FGL1K1IS1QL1VD1VD1EKN1Q1ML1TT1NV1WL1KQ-----EWT1DH1KL1RWNPPD	98
β4	042	NL1RF1AT1SS1QL1S1IK1L1QL1SL1A1QL1SV1NER1EQ1IM1TT1NV1WL1KQ-----EWT1DY1RL1TWNSSR	96
γ	039	PNL1RF1AER1SD1VV1N1SL1K1L1TL1NL1SL1NE1REE1ALT1TN1V1W1IEM-----QW1CD1Y1RL1WDPDR	93
ε	037	PGSRFVRE1P1ED1VT1IS1L1K1V1TL1NL1SL1NE1KEE1TL1TS1V1W1IGI-----DW1QD1Y1RL1WNSKDD	91
δ	040	KEL1RF1VAH1KEE1SD1VAL1A1L1T1SL1NL1SL1L1KE1VEE1TL1TN1V1W1IEH-----GWT1DN1RL1KWNAAE	94
α1	117	YGGVKKIHIPSEKI1WRPDLV1YNNADGDF1A1VK1FT1K1VLL1QYT1GH1T1W1TP1PA1FK1SY1CE1I1V1TH1FP1F1DE1QC1NS1MK1L1GT1WTY	196
α2	127	FGN1ITS1LR1VP1SEMI1W1P1DIV1LYNNADG1EFAV1TH1TKAHL1F1ST1G1TV1HW1VP1PA1YK1SS1C1S1D1VT1FP1PD1Q1NC1MK1F1G1SW1TY	206
α3	103	YGGAE1FR1M1R1VA1QK1I1WK1P1DIV1LYNNAV1G1DF1Q1VDD1K1T1K1AL1KY1T1GE1V1TW1P1PA1FK1SS1C1K1D1VT1FP1PD1Y1QC1NT1MK1F1G1SW1TY	182
α4	105	YEN1V1TS1R1P1SELI1WRPDI1V1LYNNADG1EFAV1TH1TKAHL1F1HD1GR1VOW1TP1PA1YK1SS1C1S1D1VT1FP1PD1Q1NC1MK1F1G1SW1TY	184
α5	115	YGG1K1V1R1V1P1SD1S1W1TP1DIV1L1FD1N1AD1GR1F1EG1T1ST1K1T1V1R1Y1NG1TV1TW1TP1PA1YK1SS1C1S1D1VT1FP1PD1Q1NC1MK1F1G1SW1TY	193
α6	102	YDGI1ET1LR1VP1ADKI1WK1P1DIV1LYNNAV1G1DF1Q1VE1G1TK1AL1LYN1G1MIT1W1TP1PA1FK1SS1C1P1MD1IT1FP1PD1H1QC1NS1L1K1F1G1SW1TY	181
α7	123	YPGVK1TV1RF1PD1GQ1I1WK1E1D1LL1YNSAD1ER1FD1AT1F1HT1NV1LYNN1SS1G1HC1Q1Y1LP1PG1FK1SS1C1Y1D1VR1WF1PF1DV1QH1CL1K1F1G1SW1SY	202
α9	99	YDGLD1S1R1P1SD1L1WRPDI1V1LYNKAD1DES1SE1PV1NT1NV1L1RYD1GL1I1T1W1DA1PA1TK1SS1C1V1D1VT1FP1PD1N1QC1NL1T1F1G1SW1TY	178
α10	98	YGG1L1DA1R1P1SS1L1WRPDI1V1LYNKAD1A1PP1GS1AT1N1V1L1RH1D1GAR1W1DA1PA1TR1SS1C1R1VD1VA1FP1P1DA1QC1GL1T1F1G1SW1TH	177
β1	95	H1DG1ID1SL1R1I1TA1ES1W1LP1DV1V1L1NN1D1GN1FD1VAL1D1IS1V1V1SS1D1G1SV1RW1QP1PG1Y1R1SS1C1I1Q1VT1FP1PD1W1QC1NT1M1F1V1SS1YS1	174
β2	99	F1DN1MK1K1V1RL1P1SK1H1W1LP1DV1V1LYNNAD1G1MY1E1VS1FY1SN1AV1V1S1D1GS1IF1W1LP1PA1YK1S1ACK1E1VK1H1FP1PD1Q1NC1TM1K1F1R1SW1TY	178
β3	97	YGG1I1HS1K1VP1SE1L1W1LP1DIV1L1FENAD1GR1FEG1SL1MT1K1V1K1S1NG1TV1V1W1TP1PA1YK1SS1C1MD1VT1FP1PD1R1QC1NS1MK1F1G1SW1TY	176
β4	97	YEG1VN1L1R1I1PAK1R1I1W1LP1DIV1LYNNAD1G1TY1E1VS1Y1TN1L1V1RS1NG1SV1L1W1LP1PA1YK1S1ACK1E1VK1Y1FP1PD1Q1NC1TL1K1F1R1SW1TY	176
γ	94	YEG1L1W1L1RV1P1ST1M1WRPDI1V1LENN1D1GV1FE1VAL1YCN1V1L1V1SP1D1G1Y1W1LP1PA1FR1S1AC1S1I1SV1TY1FP1PD1W1QC1NS1L1IF1QS1QTY	173
ε	92	F1GG1I1ET1LR1VP1SEL1W1LP1E1IV1LENN1D1G1Q1F1G1V1AY1DAN1V1L1V1YEG1GS1V1TW1LP1PA1YR1S1V1CA1E1VT1FP1PD1W1QC1NS1L1IF1RS1QTY	171
δ	95	FGN1IS1V1L1RL1P1DM1V1W1LP1E1IV1LENN1D1GS1F1Q1IS1Y1SC1NV1L1V1YH1Y1GF1V1W1LP1PA1FR1S1S1C1P1IS1V1TY1FP1PD1W1QC1NS1L1K1F1SS1LKY	174
α1	197	DG1SV1VA1IN1PES1DQ1-----D1L1SN1F1MES1GE1W1V1IK1ES1RG1WK1---H1SV1TY1S1CC1P1DT1p1Y1LD1ITY1HF1V1M1QR1L1PL1FY1V	261
α2	207	DK1AK1ID1LE1QME1QT1V-----D1L1K1DY1W1ES1GE1W1A1V1N1AT1G1TY1NS1---K1KY1D1CCA1E1I1---Y1PD1V1Y1AF1V1R1R1L1PL1FY1TI	270
α3	183	DK1AK1ID1L1V1L1G1SS1M1-----N1LK1DY1W1ES1GE1W1A1I1K1AP1GY1K1---H1D1KY1N1CC1EE1I1---Y1PD1ITY1S1Y1R1R1L1PL1FY1TI	246
α4	185	DK1AK1ID1L1V1M1H1SR1V1-----D1Q1L1D1F1W1ES1GE1W1V1I1V1D1AV1G1TY1N1---R1KY1E1CCA1E1I1---Y1PD1ITY1AF1V1R1R1L1PL1FY1TI	248
α5	194	DG1SQ1VD1I1LED1QD1V-----D1KR1R1D1FD1NG1E1W1E1I1V1S1AT1G1SK1---G1NR1TD1S1CC1W1---Y1PY1V1TY1S1F1V1K1R1L1PL1FY1TL	255
α6	182	DK1AE1ID1L1L1I1G1SK1V1-----D1M1N1D1F1W1E1NS1E1W1E1I1D1AS1GY1K1---H1D1KY1N1CC1EE1I1---Y1TD1ITY1S1FY1R1R1L1PM1FY1TI	245
α7	203	GG1WS1DL1Q1MQE1ADI1-----S1GY1I1PN1GE1W1DL1VG1IP1G1KR1SE1---R1FY1E1C1CK1EP1---Y1PD1VT1FT1V1M1RR1R1T1LY1GL	264
α9	179	NG1NQ1VD1IF1NAL1D1SG1-----D1L1S1DF1I1ED1VE1W1EV1HG1MP1AV1KN1V1---I1SY1GCC1SEP1---Y1PD1VT1FT1LL1K1RR1S1SF1Y1IV	242
α10	178	GG1HQ1LD1VR1PR1G1AAA1-----S1L1AD1F1VEN1VE1W1RV1L1G1MP1ARR1V1---L1TY1GCC1SEP1---Y1PD1VT1FT1LL1L1R1R1AAA1Y1VC	241
β1	175	DS1SE1V1S1L1QT1GL1PD1G1G1G1G1H1Q1---E1I1H1EG1TF1I1ENG1Q1E1I1HK1PS1RL1I1Q1PG1D1PR1GG1REG1Q1---R1QE1V1F1Y1L1I1R1K1PL1FY1L	250
β2	179	DR1TE1ID1L1V1LK1SE1VA1-----S1L1D1D1FT1P1S1GE1W1D1I1VAL1P1GR1R1---N1EN1P1DD1ST1---Y1VD1ITY1D1F1I1R1R1K1PL1FY1TI	239
β3	177	DG1T1M1D1L1L1L1I1N1E1N1V1-----D1KR1R1D1FD1NG1E1W1E1I1N1AK1GM1K1---G1NR1RD1G1V1S1---Y1PF1ITY1S1F1V1L1R1R1L1PL1FY1TL	238
β4	177	DH1TE1ID1M1V1L1MT1PTA1-----S1M1D1D1FT1P1S1GE1W1D1I1VAL1P1GR1R1---T1VN1P1Q1D1PS1---Y1VD1V1TY1D1F1I1R1K1R1K1PL1FY1TI	237
γ	174	ST1NE1ID1L1Q1L1S1Q1ED1G1qt1---I1E1W1I1F1D1E1PA1FT1ENG1E1W1A1I1Q1HR1PA1K1ML1L1---D1PA1PA1Q1E1Ag1HQ1K1V1V1F1Y1L1I1R1K1PL1FY1V	246
ε	172	NA1EE1VE1FT1F1AV1D1ND1G1k1---T1I1N1K1I1D1I1T1E1AY1T1ENG1E1W1A1ID1FC1PG1V1IR1R1---H1HG1G1AT1D1G1P1E1TD1V1I1Y1S1L1I1R1K1R1K1PL1FY1V	245
δ	175	TA1KE1IT1L1SL1K1Q1DA1K1en1r1ty1p1v1ew1i1I1D1PEG1T1ENG1E1W1E1I1V1HR1PAR1V1NV1---D1PR1AP1L1D1S1P1s1R1Q1D1ITY1F1Y1L1I1R1K1R1K1PL1FY1I	251

$\alpha 1$	262	NVII P CLLFSFLTGLVFL P TD S G-EKMTLSISVLLSLTVFLLVIVELIPSTSSAVPLIGKYMLFTMVVFIASIIITVIV	340
$\alpha 2$	271	NLII P CLLISCLTVLVFYL P SD C G-EKITLCSISVLLSLTVFLLLITETIPSTSLVPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFV	349
$\alpha 3$	247	NLII P CLLISFLTVLVFL P SD C G-EKVTLCISVLLSLTVFLLVITETIPSTSLVPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFV	325
$\alpha 4$	249	NLII P CLLISCLTVLVFYL P SE C G-EKITLCSISVLLSLTVFLLLITETIPSTSLVPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFV	327
$\alpha 5$	256	FLII P CI G LSFLTVLVFL P SN E G-EKICLCTSVLVS L TVFLLVIEEII P SSSKV P LIGEYLVFTMIFVTLISIMVTVFA	334
$\alpha 6$	246	NLII P CLFISFLTVLVFL P SD C G-EKVTLCISVLLSLTVFLLVITETIPSTSLVPLVGEYLLFTMIFVTLISIVVTVFV	324
$\alpha 7$	265	NLLI P CVLISALALLVFL P AD S G-EKISLGITVLLSLTVFLLVVAEIMPATSDSVP L IAQYF A STM I IVGLSVVVTVIV	343
$\alpha 9$	243	NLLI P CVLISFLAPLSFY L PA A SG-EK V SLG V TILLAMT V FQ L MVAE I MPA-SE N VPLIGKY I ATMALITASTALT I TMV	320
$\alpha 10$	242	NLL L PCV L ISL L AP L A F HL P AD S G-EK V SLG V T L L A L T V F Q L L A ES M PP-AES V PLIGKY M AT M T M V T ST A L T L I	319
$\beta 1$	251	NVIA P CL I L I T L L A I F V F Y L P D AG-EK M GL S I F ALL T L T V F LL L L A D K V P ET S L S V P II K Y L M F T M V L T F S V IL S V V	329
$\beta 2$	240	NLII P CVLITSLAILVFL P SD C G-EKMTLCISVLLAL T VFLLLISKIV P PTSLDVPLVGK Y LM F T M V L T F S I V T S V C V	318
$\beta 3$	239	FLII P CI G LSFLTVLVFL P SD E G-EKLSLSTSVLVS L TVFLLVIEEII P SSSKV P LIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFV	317
$\beta 4$	238	NLII P CVLITLLAILVFL P SD C G-EKMTLCISVLLAL T F F LLLISKIV P PTSLDVPLIGK Y LM F T M V L T F S I V T S V C V	316
γ	247	NI I AP C V L ISS V AIL I H L PA K AG g Q K CT V A I N V LL A Q T V F FL V AK V P E T S Q A V L ISK Y L T F L L V T L I V N A V V	326
ϵ	246	NI I V P CVLISGLVLLAYFL P AQ AG g Q K T VS I N V LL A Q T V F FL I A Q K I P E T S L S V P LL G R F L I F V M V AT L I M N C V I V	325
δ	252	NIL V PCV L ISFM N LVFL P AD S G-E K TS V A I S V LL A Q S V F LLL L ISK R L P AT S MA I PLIG K FL L GM V L V T M V V I C V I V	330
$\alpha 1$	341	IN T H H RS P ST H V-M P N V WR K V F ID T I P N I M F st M K R PS R E K Q D K I F T E D ID-----IS D IS G K P G P -----	402
$\alpha 2$	350	L N V H RS P ST H T-M P H V WR G AL L GC V PR W LL-----M N R P -----	383
$\alpha 3$	326	L N V H Y R PT T H T -M P S W V K T V FL N LL P RV M E---M T R P T S NE G NA Q PP R PL Y G-a E LS N LC F S R A E SK G CK E G Y PC Q D-	399
$\alpha 4$	328	L N V H RS P RT H T-M P T W VR R V F L D IV P R L LL---M K R P SV V K D NC R RL I ES M H km AS A PR F W P E P E G EP P AT S GT Q SL H -	402
$\alpha 5$	335	IN I H H RS S ST H Na M AP L VR K I F L T LP K LLC---M R SH V DR Y FT-----Q K E T E S G S G P -----	386
$\alpha 6$	325	L N I H Y R PT T H T -M P R W V K T V FL K LL P Q V LL---M R W P -----L D K T R G T G S-d A V P R G L A RR P AK G K L A S H G E P R H L-	392
$\alpha 7$	344	L Q Y H H D PD G G K -M P K W T R V I LL N W C A F W L R---M K R P GE D K V RP A C Q H K Q R R---C S L A S V E M S A V A P P P A S N G N L L Y I g	417
$\alpha 9$	321	M N I H FC G A E A R P-V P H W A R V V LL K Y M S R V L F V Y g VG E SC-----L S P H S R -b R D H L T K V Y S K L P E S N L K A A R N K D L S	391
$\alpha 10$	320	M N L H Y C G P S V R P -V P A W A R ALL G H L A R GL C v r EG P CC Q S R PE L S P S Q S-----P E GG A G P AG P C H E P R C L C -	390
$\beta 1$	330	L N L H RS P HT H Q-M P L W V R Q I F I H K L P L Y L R ---L K R K P E R D L M PE P P H C S ---P G S G W G R G T D E F I R K P P S D F L-	400
$\beta 2$	319	L N V H RS P T T H T -M A P W V K V V F L E K L P ALL F ---M Q Q P R H C A R Q R L R L R R R Q -r E R E G A L F F R E A P G A D S C T-----	388
$\beta 3$	318	IN V H H RS S T Y H h M A P W V K R L F L Q L P K LLC---M K D H V D R Y SS P E K E S Q P V---V K G V L E K K Q Q L S D G E-----	385
$\beta 4$	317	L N V H RS P ST H T-M A P W V K R C FL H K L P T FL F ---M K R P G D SS P A R A F PP S K S c v T K P E A T A T S T S P S N F Y G N S M -----	387
γ	327	L N V S L R S P H T S-M A R G V R K V F L R L L P Q L L R ---M H V R PL A PA A V Q D T Q S R L Q---N G S S G W S I T T G E E V A L C L P R S E L L -	399
ϵ	326	L N V S Q R T P T T H A -M S P R L R H V L E L L P R L L G---S P P P E A P R A S P P R R A S -----V G L L L R A E E L I L K K P R S E L V -	394
δ	331	L N I H F R T P ST H V-L S E G V K L F L E T L P E L L H---M S R P A E D G P S P G A L V R R S S---S L G Y ---T S K A E E Y F L L K R S D L M -	400
$\alpha 1$	403	-----P P M G F H S P L I K H P E V K S A I E -----	422
$\alpha 2$	384	-----pp-p v e l -----c h p-----	392
$\alpha 3$	400	---g m c g y ch r r i k i S N F S A N L T R S S S E S V D A V L S L S A L S P E I K E A I C -----	446
$\alpha 4$	403	-----P P S P S F C V P L D V A E P G P S C K S P S D q l p q q q l e a e k a s p h s g g p c r p h g t q a	457
$\alpha 5$	387	-----K S R N T L E A A L D-----	398
$\alpha 6$	393	---k e c f h ch k---S N E L A T S K R R L S H Q P L Q V V E N S E H S P E V E D V I N-----	434
$\alpha 7$	418	f r g l d g v h c v t p d sg V V C G R M A C S P T H D E H L L H G G Q P E G D P L A K I L E -----	467
$\alpha 9$	392	r k-----K D M N K R L K N D L G -g g k n p q e a e s -----	416
$\alpha 10$	391	-----R Q E A L L H-----	397
$\beta 1$	401	---f g -----k p N R P Q E L S A P D L R R F I D G P N R A V A L L P E L R E V S -----	438
$\beta 2$	389	-----c f v n r a s v Q L G A F G A E P A -P V A G P G R S G E P C G C L R E A V D -----	429
$\beta 3$	386	-----K V L V A F L E K A A D -----	397
$\beta 4$	388	-----y f v n p a s a ASK S P A G S T P V A I P R D F W L R S S G R F R Q D V Q E A L E -----	429
γ	400	---f q q---w q r q q l v A A A L E K L E K G P E L G L S Q F C G S L K Q A A P A I Q A C V E-----	443
ϵ	395	---f e g-----Q R H R Q T W T A A F C Q S L G A A A P E V R C C V D-----	425
δ	401	---f e k---g s e r h g L A R R L T T A R R P E ---A S S E Q A Q Q E L F N E L K P A V D-----	440
$\alpha 1$		-----	
$\alpha 2$	393	---l r l k l s p s y h w l e s n v d a e e r e v v e e d r w a c ag h---v a p-----s v g t l c s h g h l h s g -----	445
$\alpha 3$		-----	
$\alpha 4$	458	p g l a k a r s l s v q h m s s p g e a v e g g v r c r s r s i q v c r d a a e a d g q a a g a l a s r -n t h s a e l p p d q p s p c k t c k e	536
$\alpha 5$		-----	
$\alpha 6$		-----	
$\alpha 7$		-----	
$\alpha 9$	417	-----y c a q y k -----v l t r -----	426
$\beta 1$		-----	
$\beta 2$		-----	
$\beta 3$		-----	
$\beta 4$		-----	
γ		-----	
ϵ		-----	
δ		-----	

$\alpha 1$	423	-----GIKYIAETMKSDQESNNAAEWKYVAMVMDHILLGVFMLVCIIGTLA	469
$\alpha 2$	446	--asgpkaeallqege-----lllsphmqkaleGVHYIADHLRSEDADSSVKEDWKYVAMVIDRIFLWLFIIIVCFLGTIG	518
$\alpha 3$	447	-----SVKYIAENMKQAQNEAKEIQDDWKYVAMVIDRIFLWVFTLVCLIGTAG	493
$\alpha 4$	537	pssvspsatvkrsttkappphlplspaltraveGVQYIADHLKAEDTDFSVKEDWKYVAMVIDRIFLWVFTLVCLIGTAG	616
$\alpha 5$	399	-----SIRYITRHHMKENDVREVVEDWKVIAQVLDLDMFLWTFVSVIVGSLG	445
$\alpha 6$	435	-----SVQPIAENMKSHNETKEVEDDWKYVAMVVDLWVFLVFIIVCVFVTAG	481
$\alpha 7$	468	-----EVRYIANRFRQDESEAVCSSEWKFAACVVDRLCLMAFSVFTIICTIG	514
$\alpha 9$	427	-----NIEYIAKCLKDHKATNSKGEWKVAKVIDRFFFMWIFFIMVEVMTIL	473
$\alpha 10$	398	-----HVATIANTFRSHRAAQRCHEDWKRLARVMDRFFLAIFFSMALVMSLL	444
$\beta 1$	439	-----SISYIARQLQEQEDHDALKEDWQEVAMVVDLWVFLWTFIIFTVSVGTIV	485
$\beta 2$	430	-----GVRFIADHMRSEDDQSVSEDDWKYVAMVIDRFLWVIFVFCVFTIG	476
$\beta 3$	398	-----SIRYISRHHVKEHFISQVVQDWKFAVQVLDLWVFLVIVSVTGSVL	444
$\beta 4$	430	-----GVSFIAQHMKNDEEDQSVVEDWKYVAMVVDLWVFLWVFMVFCVLTGTVG	476
γ	444	-----ACNLIACARHQQSHFDNGNEEWFVLRVLDLWVFLWVFLVFCVLTGTVG	490
ϵ	426	-----AVNFVAESTRDQEQATGEEVSDWVRMGNALDNICFWAALVLFVSVGSSL	472
δ	441	-----GANFIVNHRDQNNYNEEKDSWNRVARTVDRCLFVVTPVMVVGTAW	487
$\alpha 1$	470	VFAGRLIELNQGG-----	482
$\alpha 2$	519	LFLPPLLAGMI-----	529
$\alpha 3$	494	LFLQPLMAREDA-----	505
$\alpha 4$	617	LFLPPLLAGMI-----	627
$\alpha 5$	446	LFVPIYKWANIL---Ipvhignank-----	468
$\alpha 6$	482	LFLQPLLGNTGKS-----	494
$\alpha 7$	515	ILMSAPNFVEAVSkdFA-----	531
$\alpha 9$	474	LIARAD-----	479
$\alpha 10$	445	VLVQAL-----	450
$\beta 1$	486	IFLDATYHLPPPDPf-----p-----	501
$\beta 2$	477	MFLQPLFQNYTTTflHsdhsapssk-----	502
$\beta 3$	445	IFTPALKMW---L---Hsyh-----	458
$\beta 4$	477	LFLPPLFQTHAAS---Egpyaaqrd-----	498
γ	491	IFLMAHYNRVPApfpGdprpy-----	512
ϵ	473	IFLGAYFNRVPLpyaPciqp-----	493
δ	488	IFLQGVYNQPPPQpfpGdpysynvqdkrfihttpswwwncbinlmnihgovttoolscobaltcobaltgicmdgetcob	567
$\alpha 1$		-----	
$\alpha 2$		-----	
$\alpha 3$		-----	
$\alpha 4$		-----	
$\alpha 5$		-----	
$\alpha 6$		-----	
$\alpha 7$		-----	
$\alpha 9$		-----	
$\alpha 10$		-----	
$\beta 1$		-----	
$\beta 2$		-----	
$\beta 3$		-----	
$\beta 4$		-----	
γ	513	-lpspd-----	517
ϵ		-----	
δ	568	altridvbtjjk	579

Figure S2. Negative isotype control staining. Representative micrographs evaluating non-specific staining of the bronchial epithelia on FFPE tissues using anti-isotype matched GFP IgG antibodies (in red) from mouse (up) or rabbit (down), and DAPI (cell nuclei, blue). Magnification corresponding to the selected area is shown.

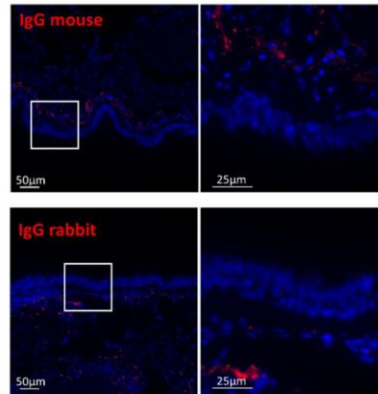
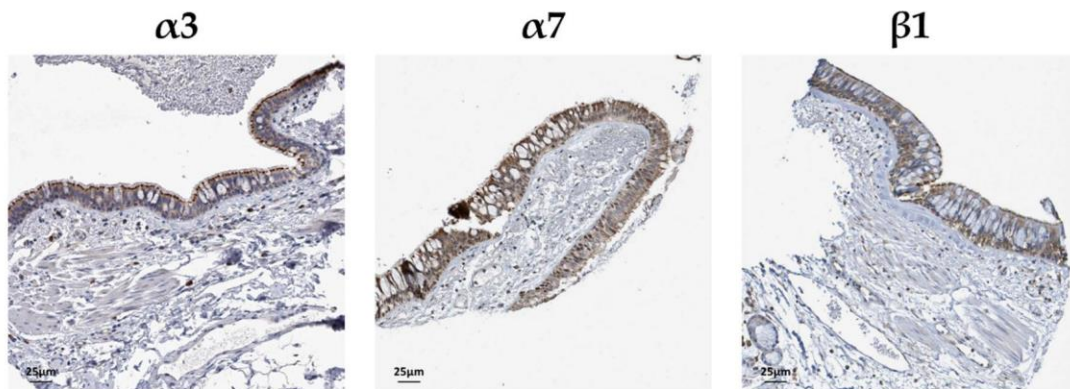


Figure S3. Localization of nAChRs on lung tissues from the Human Protein Atlas. Representative micrographs showing the bronchial epithelia on FFPE lung tissues: immunohistochemistry for $\alpha 3$, $\alpha 7$, and $\beta 1$.



2. Le polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs altère la différenciation cellulaire dans l'épithélium respiratoire

2.1 Publication

Chr15q25 genetic variant (rs16969968) alters cell differentiation in respiratory epithelia

(Diabasana et al., 2021)

Manuscrit soumis à *Thorax*

2.2 Résumé

Les nAChRs sont impliqués dans la régulation de divers processus biologiques tant dans le système nerveux que dans les tissus non-neuronaux. Des études pangénomiques ont permis d'associer des variants des gènes codants pour ces récepteurs dans plusieurs pathologies incluant la maladie d'Alzheimer, des maladies pulmonaires et rénales. Parmi ces variants, le polymorphisme rs16969968 du gène *CHRNA5* codant la sous-unité $\alpha 5$ (SNP $\alpha 5$) des nAChRs a été associé à l'émergence du cancer du poumon, de la BPCO et à la dépendance tabagique. Toutefois, aucune étude n'a permis d'établir un lien biologique entre le SNP $\alpha 5$ et les pathologies pulmonaires. Nous proposons ici de déterminer l'influence de ce polymorphisme sur les remaniements histologiques pulmonaires dans un contexte non-pathologique.

L'expression des ARNm codants le gène *CHRNA5* a été étudiée dans l'épithélium des voies aériennes par hybridation *in situ* à partir de tissus pulmonaires FFPE. Des polypes nasaux et des tissus FFPE ont été génotypés afin d'obtenir le statut génotypique de *CHRNA5*. L'influence du SNP $\alpha 5$ sur la différenciation cellulaire a été évaluée par mesure de la Résistance Transépithéliale (RTE), RT-qPCR et immunomarquages de cellules épithéliales issues de polypes nasaux cultivées en interface air-liquide (IAL). L'effet du SNP $\alpha 5$ sur le remodelage épithélial a été analysé par immunomarquages de tissus FFPE. Enfin, l'association entre ce polymorphisme et l'inflammation a été obtenue par dosage de cytokines sur les surnageants de cultures.

Nos résultats démontrent que le gène *CHRNA5* est exprimé dans l'épithélium des voies aériennes. La RTE se révèle significativement plus élevée en cas d'expression du SNP $\alpha 5$ comparée aux WT au début et à la fin de la différenciation épithéliale. Un retard de différenciation a été observé chez les cellules SNP $\alpha 5$ par diminution significative de transcrits des gènes *CK5*, *FOXJ1*, *MUC5AC* et *MUC5B* à IAL 7, 14 et 35 comparés aux WT et par un retard de ciliogenèse à ALI15 avec un nombre de cellules ciliées inférieur en cas d'expression du polymorphisme. En ce qui concerne le remodelage épithélial, le SNP $\alpha 5$ est significativement associé à un nombre de cellules ciliées inférieur en comparaison des WT. En revanche, le polymorphisme ne semble pas influencer les remaniements épithéliaux bronchiques dans leur globalité. Pour finir, l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules basales est diminuée lorsqu'elles expriment le SNP $\alpha 5$.

Nos données suggèrent que le SNP $\alpha 5$ altère la ciliogenèse de l'épithélium bronchique et des cellules épithéliales en IAL en plus de déréguler la différenciation cellulaire et de diminuer la production de cytokines par les cellules basales témoignant de son potentiel rôle dans le remodelage épithélial.

Thorax

Chr15q25 genetic variant (rs16969968) alters cell differentiation in respiratory epithelia

Journal:	<i>Thorax</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Brief communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Diabasana, Zania; Inserm UMR-S 1250, Marne Perotin, Jeanne-Marie; Department of Respiratory Medicine, INSERM UMRS 1250, University Hospital of Reims</p> <p>Belgacemi, Randa; University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm, P3Cell UMR-S1250</p> <p>Ancel, Julien; University Hospital Centre Reims, Department of Respiratory Diseases</p> <p>Mulette, Pauline; University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm UMR-S1250; CHU of Reims, Hôpital Maison Blanche, Department of respiratory diseases</p> <p>LAUNOIS, Claire; Reims University Hospital, Department of Respiratory Diseases</p> <p>Delepine, Gonzague; University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm, P3Cell UMR-S1250, ; CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Department of thoracic surgery</p> <p>Dubernard, Xavier; University Hospital Centre Reims, Department of otorhinolaryngology</p> <p>Mérol, Jean-Claude; University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm UMR-S1250; University Hospital Centre Reims, Department of otorhinolaryngology</p> <p>Ruaux, Christophe; Clinique Mutualiste La Sagesse, Department of otorhinolaryngology</p> <p>GOSSET, Philippe; University of Lille, CNRS UMR9017, Inserm U1019, CHRU Lille, Pasteur Institute of Lille, CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille</p> <p>Maskos, Uwe; Pasteur Institute of Paris, Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR 3571</p> <p>Polette, Myriam; University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm UMR-S1250; University Hospital Centre Reims, Department of Biopathology</p> <p>Deslee, Gaëtan; University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm, P3Cell UMR-S1250; University Hospital Centre Reims, Department of Respiratory Diseases</p> <p>Dormoy, Valérian; Inserm UMR-S 1250, ; Université de Reims Champagne-Ardenne,</p>
Keywords:	Airway Epithelium, Histology/Cytology

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



I, the Submitting Author has the right to grant and does grant on behalf of all authors of the Work (as defined in the below author licence), an exclusive licence and/or a non-exclusive licence for contributions from authors who are: i) UK Crown employees; ii) where BMJ has agreed a CC-BY licence shall apply, and/or iii) in accordance with the terms applicable for US Federal Government officers or employees acting as part of their official duties; on a worldwide, perpetual, irrevocable, royalty-free basis to BMJ Publishing Group Ltd ("BMJ") its licensees and where the relevant Journal is co-owned by BMJ to the co-owners of the Journal, to publish the Work in this journal and any other BMJ products and to exploit all rights, as set out in our [licence](#).

The Submitting Author accepts and understands that any supply made under these terms is made by BMJ to the Submitting Author unless you are acting as an employee on behalf of your employer or a postgraduate student of an affiliated institution which is paying any applicable article publishing charge ("APC") for Open Access articles. Where the Submitting Author wishes to make the Work available on an Open Access basis (and intends to pay the relevant APC), the terms of reuse of such Open Access shall be governed by a Creative Commons licence – details of these licences and which [Creative Commons](#) licence will apply to this Work are set out in our licence referred to above.

Other than as permitted in any relevant BMJ Author's Self Archiving Policies, I confirm this Work has not been accepted for publication elsewhere, is not being considered for publication elsewhere and does not duplicate material already published. I confirm all authors consent to publication of this Work and authorise the granting of this licence.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Chr15q25 genetic variant (rs16969968) alters cell differentiation in respiratory epithelia**

2

3 Zania Diabasana¹, Jeanne-Marie Perotin^{1,2}, Randa Belgacemi¹, Julien Ancel^{1,2}, Pauline
4 Mulette^{1,2}, Claire Launois²,Gonzague Delepine³, Xavier Dubernard⁴, Jean-Claude Mérol^{1,4},
5 Christophe Ruaux⁵, Philippe Gosset⁶, Uwe Maskos⁷, Myriam Polette^{1,8}, Gaëtan Deslée^{1,2},
6 Valérian Dormoy¹

7

8 ¹University of Reims Champagne-Ardenne, Inserm, P3Cell UMR-S1250, SFR CAP-SANTE,
9 51097 Reims, France

10 ²CHU of Reims, Hôpital Maison Blanche, Department of respiratory diseases, 51092 Reims,
11 France

12 ³CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Department of thoracic surgery, 51092 Reims, France

13 ⁴CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Department of otorhinolaryngology, 51092 Reims, France

14 ⁵Clinique Mutualiste La Sagesse, Department of otorhinolaryngology, 35043 Rennes, France

15 ⁶University of Lille, CNRS UMR9017, Inserm U1019, CHRU Lille, Pasteur Institute of Lille,
16 CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France

17 ⁷Pasteur Institute of Paris, Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR
18 3571, Paris, France.

19 ⁸CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Department of biopathology, 51092 Reims, France

20

21 Correspondence to:

22 Dr Valérian Dormoy

23 Inserm UMR-S 1250

24 University of Reims Champagne-Ardenne

25 CHU Maison Blanche

26 45 rue Cognacq-Jay

27 51092 Reims

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

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

30

31 Brief Title: SNP α 5 in respiratory epithelia

32

33 Word count: 900

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

35 **ABSTRACT**

36 The cluster region *CHRNA3/A5/B4* encoding for nicotinic acetylcholine receptor
37 (nAChR) subunits contains several genetic variants involved in nicotine addiction and brain
38 disorders. The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs16969968 is strongly associated with
39 nicotine dependence and lung diseases. Using immunostaining studies on tissue sections and
40 air-liquid interface airway epithelial cell cultures, *in situ* hybridisation, transcriptomic and
41 cytokines detection, we analysed rs16969968 contribution to airway respiratory epithelial
42 remodelling. Thus, we provide cellular and molecular analyses supporting the genetic
43 association of this polymorphism with lung diseases.

44
45 **Keywords:** SNP α 5; Airway epithelial cells; Differentiation; Remodelling; Inflammation

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

48 **INTRODUCTION**

49 Chronic inflammatory pulmonary diseases are characterised by alterations of lung
50 tissular structures (e.g airway remodelling, inflammation, fibrosis) and pulmonary function.
51 Those alterations can be caused by inhalation of noxious particles including tobacco smoke. In
52 addition to environmental factors, multiple genetic susceptibilities have been associated with
53 the development of pulmonary diseases [1]. The *CHRNA3/CHRNA5/CHRNA4* gene cluster,
54 encoding for $\alpha3$, $\alpha5$ and $\beta4$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits, has drawn
55 interest due to its implication in nicotine dependence and lung cancer.

56 The non-synonymous single-nucleotide *CHRNA5* polymorphism rs16969968 has been
57 identified as clinically significant [2–4]. This mutation is located in the chromosomal region
58 15q25.1 and is caused by the replacement of guanine by an adenine nucleobase leading to the
59 amino acid substitution D398N (aspartic acid to asparagine) in the resulting protein [5]. It is
60 involved in smoking behaviour and represents a risk factor for COPD and lung cancer [6,7].
61 Yet, the effects of rs16969968 polymorphism (SNP $\alpha5$) expression on lung histomorphological
62 patterns are not established. In this study, we aimed to determine whether SNP $\alpha5$ is involved
63 in airway epithelial cell (AEC) differentiation and remodelling in the human lung.

64 **METHODS**

65 For full technical details, see the online supplementary data. AEC from human nasal polyps
66 were processed for analysing: (i) cell barrier integrity by transepithelial electrical resistance
67 (TEER) measurements; (ii) mRNA expression by RT-qPCR; (iii) cell differentiation markers
68 by immunostaining; (iv) and cytokine expression by proteome profiler array. In addition, airway
69 remodelling was assessed by immunostaining on bronchi on whole lung samples obtained from
70 CHRNA5 wild-type (WT α 5) and rs16969968 (SNP α 5) patients with no chronic inflammatory
71 pulmonary disease.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

72 **RESULTS**

73 We first confirmed the detection of *CHRNA5* expression in bronchial epithelial cells using *in*
74 *situ* hybridization on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lung tissues (*online*
75 *supplemental figure S1*) [8]. We next compared epithelial remodeling features on lung tissues
76 obtained from WTα5 and SNPα5 patients. Epithelial height did not differ between the two
77 groups (*figure 1A and 1B*). The percentage of remodeled epithelium including goblet cell
78 hyperplasia, basal cell hyperplasia, and metaplasia, as well as the proliferative index did not
79 show any significant difference between the two groups (*figure 1A-D*). Focusing on the main
80 bronchial epithelial cell populations, we observed that the number of multiciliated cells was
81 significantly decreased in SNPα5 patients compared to WTα5 patients (247.4±15.93 ciliated
82 cells/mm vs 186.9±8.67 ciliated cells/mm, p<0.01) (*figure 1C and 1D*). There was no
83 difference in the number of basal cells or secretory cells (Muc5ac-, Muc5b-, and Uteroglobulin-
84 secreting cells) between the two groups.

85 To dissect the role of rs16969968 during differentiation, we performed a kinetic analysis of
86 AEC cultured at the air-liquid interface (ALI) for 35 days. Transepithelial electrical resistance
87 was significantly higher in SNPα5 compared to the WTα5 group as observed at ALI35
88 (325.1±16.98Ω/cm² vs 169.3±17.55Ω/cm², p<0.01) (*figure 2A*). Focusing on multiciliated,
89 basal, and mucin-secreting cells, we performed comparative quantitative transcriptomic and
90 localization analyses during AEC differentiation. Transcript analyses at ALI-7, ALI-14, and
91 ALI-35 demonstrated a significant decrease of 40 to 85% of *FOXJ1*, *CK5*, *MUC5AC*, and
92 *MUC5B* gene expressions in SNPα5 compared to WTα5 cells (*figure 2B*). SNPα5-ALI cultures
93 had fewer multiciliated cells at ALI-14 (3694±294.0 mean grey value (MGV) in WTα5 vs
94 2681±302.6 MGV in SNPα5-expressing cells, p<0.05) and this pattern was maintained at the
95 end of differentiation, although the difference was not significant (11160±1081 MGV in WTα5
96 vs 9641±620.8 MGV in SNPα5-expressing cells, p=0.43) (*figure 2C and 2D*). SNPα5-ALI
97 cultures had more basal cells at ALI35 (2950±752.6 MGV in WTα5 vs 4672±526.6 MGV in
98 SNPα5-expressing cells) but it did not reach statistical significance (*figure 2C and 2D*). The
99 number of mucin-secreting cells did not significantly differ between the two groups (*figure 2C*
100 *and 2D*).

101 We next analyzed cytokine and chemokine expressions in apical and basal cell culture
102 supernatants (*figure 3A and 3B, and online supplemental figure S2*). On average, there was a
103 two-fold significant decrease in pro- and anti-inflammatory protein expressions in SNPα5-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

104 expressing cells compared to WT α 5, including GR0 α , sICAM-1, IFN γ , IL-2/5/6/10/32 α , IP-10,
105 MCP-1, MIF, RANTES, and SDF-1. In addition, IL-17/17E/1ra/1 α /1 β /4, and MIP-1 α were also
106 detected but the ratios did not statistically differ. The ratios were consistent for both secretory
107 compartments.

108

Confidential: For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

109 **DISCUSSION**

110 Our data provide experimental clues on AEC to fill the knowledge gap in understanding
111 rs16969968 polymorphism and its genetic association with lung diseases. We demonstrated that
112 SNP α 5 expression was associated with structural and functional alterations of airway
113 epithelium. One of the most important findings is SNP α 5-associated alteration of ciliogenesis,
114 which we observed in both bronchial epithelia and AEC ALI cultures. Cell differentiation was
115 deregulated as evidenced by transcript levels of ciliated, basal, and mucous-secreting cells. In
116 addition, basal cell cytokine production was reduced, suggesting a global impairment of the
117 epithelial contribution to the inflammatory response during epithelial cell differentiation.

118 We acknowledge some limitations in our study. As a proof of concept, we focussed here on the
119 respiratory epithelium from patients with no chronic inflammatory pulmonary disease.
120 Expanding the experimental approaches to small airways and lung diseases will allow us to
121 fully decipher the rs16969968 polymorphism susceptibility to lung histological features [9].
122 Furthermore, beside epithelial cells, the recruitment of inflammatory cell populations and their
123 cytokine profiles should also be evaluated in SNP α 5 patients.

124 In conclusion, using a combination of *in vitro* and *ex vivo* approaches, we have obtained
125 compelling evidence in support of rs16969968 directly inducing molecular and cellular changes
126 in AEC, ultimately leading to the remodelling and the impairment of the epithelial-related
127 immune response of the airways.

128

1
2
3 129 **Acknowledgements**

4 130 We thank the members of the Inserm UMR-S 1250 unit and our collaborators for their helpful
5
6 131 comments and insights. We thank the Platform of Cell and Tissue Imaging (PICT) for technical
7
8 132 assistance.
9

10 133
11
12 134 **Contributors**

13 135 ZD performed experiments, analysed the data and wrote the manuscript; JMP collected samples
14
15 136 and analysed the data; RB performed experiment; JA, PM, CL, GoD, XD, JCM, and CR
16
17 137 collected samples; MP, PG and UM contributed to experimental analysis and interpretation of
18
19 138 the results; GaD collected samples, analysed the data and supervised the experiments; VD
20
21 139 designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. All the authors
22
23 140 contributed to the writing and critical appraisal of the manuscript.
24

25 141
26 142 **Funding**

27 143 This work was supported by Funding from University of Reims Champagne-Ardenne (URCA),
28
29 144 the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) and a grant from the
30
31 145 Research Institute in Public Health (IReSP) in association with the National Institute of Cancer
32
33 146 (INCa). It was carried out in the framework of the Federative Research Structure *CAP-Santé*
34
35 147 and benefited from the Project Research and Innovation in Inflammatory Respiratory Diseases
36
37 148 (RINNOPARI).
38

39 149
40 150 **Competing Interests**

41 151 Dr. Deslée reports personal fees from Nuvaïra, personal fees from BTG/PneumRx, personal
42
43 152 fees from Chiesi, personal fees from Boehringer, personal fees from Astra Zeneca, outside the
44
45 153 submitted work. Dr. Dormoy reports personal fees from Chiesi outside the submitted work.
46

47 154
48 155 **Ethics approval**

49 156 Subjects were recruited from the Department of pulmonary medicine at university hospital of
50
51 157 Reims (France) and included in the cohort for Research and Innovation in Chronic
52
53 158 Inflammatory Respiratory Diseases (RINNOPARI, NCT02924818). The study was approved
54
55 159 by the ethics committee for the protection of human beings involved in biomedical research
56
57 160 (CCP Dijon EST I, N°2016-A00242-49) and was conducted in accordance with the ethical
58
59 161 guideline of Declaration of Helsinki.
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

163 **REFERENCES**

164
165 1 Gaffney A, Christiani D. Gene–Environment Interaction from International Cohorts:
166 Impact on Development and Evolution of Occupational and Environmental Lung and
167 Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;**36**:347–57. doi:10.1055/s-0035-
168 1549450
169 2 Stoller JK, Hupertz V, Aboussouan LS. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. In: Adam MP,
170 Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, eds. *GeneReviews*®. Seattle (WA): : University of
171 Washington, Seattle 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1519/> (accessed 29
172 Mar 2021).
173 3 Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An T-H, *et al.* Multiple Independent Loci at
174 Chromosome 15q25.1 Affect Smoking Quantity: a Meta-Analysis and Comparison with
175 Lung Cancer and COPD. *PLoS Genet* 2010;**6**:e1001053.
176 doi:10.1371/journal.pgen.1001053
177 4 Amos CI, Wu X, Broderick P, *et al.* Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a
178 susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008;**40**:616–22.
179 doi:10.1038/ng.109
180 5 Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, *et al.* A Candidate Gene Approach Identifies the
181 CHRNA5-A3-B4 Region as a Risk Factor for Age-Dependent Nicotine Addiction. *PLoS*
182 *Genet* 2008;**4**:e1000125. doi:10.1371/journal.pgen.1000125
183 6 Xu Z-W, Wang G-N, Dong Z-Z, *et al.* CHRNA5 rs16969968 Polymorphism Association
184 with Risk of Lung Cancer - Evidence from 17,962 Lung Cancer Cases and 77,216 Control
185 Subjects. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015;**16**:6685–90.
186 doi:10.7314/APJCP.2015.16.15.6685
187 7 Hopkins RJ, Duan F, Gamble GD, *et al.* Chr15q25 genetic variant (rs16969968)
188 independently confers risk of lung cancer, COPD and smoking intensity in a prospective
189 study of high-risk smokers. *Thorax* 2021;**76**:272–80. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-214839
190 8 Diabasana Z, Perotin J-M, Belgacemi R, *et al.* Nicotinic Receptor Subunits Atlas in the
191 Adult Human Lung. *IJMS* 2020;**21**:7446. doi:10.3390/ijms21207446
192 9 Bonini M, Usmani OS. The role of the small airways in the pathophysiology of asthma and
193 chronic obstructive pulmonary disease. *Therapeutic Advances in Respiratory* 2015;**9**:281–
194 93. doi:10.1177/1753465815588064

195

196 **Figure Legends**

197 **Figure 1. SNP rs16969968 is associated with a decrease of multiciliated cells in bronchi**
 198 **epithelia.**

199 **A.** Representative micrographs showing the bronchial epithelia of WTα5 and SNPα5-
 200 expressing patients stained for haematoxylin and eosin. Magnification corresponding to the
 201 selected area is shown.

202 **B.** Box and whiskers plots (median with min to max, the plus sign (+) represents the mean
 203 value) represent the measurements of epithelium height (μm), and the percentage of non-
 204 remodelling and remodelling (basal cell hyperplasia, goblet cell hyperplasia and metaplasia)
 205 epithelium in WTα5 (black) and SNPα5-expressing (red) groups (n≥7 for each group).

206 **C.** Representative micrographs showing the bronchial epithelia of WTα5 and SNPα5-
 207 expressing patients stained for ciliated cells (Ar113b and FOXJ1, red), intermediate cells
 208 (uteroglobin, red), proliferative cells (Ki67, red), basal cells (P63, green), mucin-secreting cells
 209 (Muc5ac and Muc5b, green), intermediate filaments (vimentin, green) and cell nuclei (DAPI,
 210 blue). Magnification corresponding to the selected area is shown.

211 **D.** Box and whiskers plots (median with min to max, the plus sign (+) represents the mean
 212 value) represent the proportion of FOXJ1- and P63-positive cells per mm, the proliferative
 213 index, and the mean grey values of mucins- and uteroglobin-associated fluorescence in WTα5
 214 (black) and SNPα5-expressing cells (red) (n ≥3 for each group). **p<0.01 WTα5 vs SNPα5.

215
 216

1
2
3 **217 Figure 2. SNP rs16969968 alters respiratory airway epithelial cell differentiation.**

4
5 **218 A.** Curves represent the TEER of AEC (n=13) at ALI-1, ALI-7, ALI-14, ALI-21, ALI-28, and
6
7
8 **219** ALI-35 in WT α 5 (black) and SNP α 5-expressing (red) cells. Means \pm SEM are shown for each
9
10 **220** ALI time point. *p<0.05; **p<0.01 WT α 5 vs SNP α 5.

11
12 **221 B.** Box and whiskers plots (median with min to max, the plus sign (+) represents the mean
13
14 **222** value) represent the relative mRNAs levels during ALI cultures by RT-qPCR (n=13) for
15
16 **223** differentiation markers (CK5, non-differentiated cells; FOXJ1, ciliated cells; and
17
18 **224** MUC5AC/MUC5B, mucous-secreting cells) in SNP α 5-expressing groups. *p<0.05; **p<0.01;
19
20 **225** ***p<0.001 WT α 5 vs SNP α 5.

21
22 **226 C.** Examples of micrographs taken from AEC cultures at ALI-14 and ALI-35 showing
23
24 **227** multiciliated (Arl13b, red) and mucus-secreting (Muc5ac, green) cells on the left, basal (CK13,
25
26 **228** red) and mucus-secreting (Muc5b, green) cells on the right. Nuclei are stained in blue (DAPI).
27
28 **229** Magnification corresponding to the selected area is shown.

29
30 **230 D.** Box and whiskers plots (median with min to max, the plus sign (+) represents the mean
31
32 **231** value) represent the mean grey values of Arl13b-, CK13-, muc5ac- and muc5b-associated
33
34 **232** fluorescence at ALI-14 and ALI-35 in WT α 5 (black) and SNP α 5-expressing cells (red) (n \geq 3
35
36 **233** for each group). *p<0.05 WT α 5 vs SNP α 5.

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
234

235 **Figure 3. Cytokine and chemokine expression in AEC culture supernatants.**

236 **A.** Heat map colors correspond to the SNP α 5/WT α 5 cytokine and chemokine ratios at ALI-7
 237 from apical and basal supernatants obtained from AEC cultures (n=13). Downregulated (blue)
 238 and upregulated (orange) proteins in supernatants from SNP α 5-expressing cells are represented.
 239 Non-detected proteins are represented in white.

240 **B.** Table summarizing the normalized mean grey values of cytokines and chemokines
 241 expression in WT α 5- and SNP α 5-expressing cells at ALI-7. The ratios SNP α 5/WT α 5 are also
 242 presented. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 WT α 5 vs SNP α 5.

243

Confidential: For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

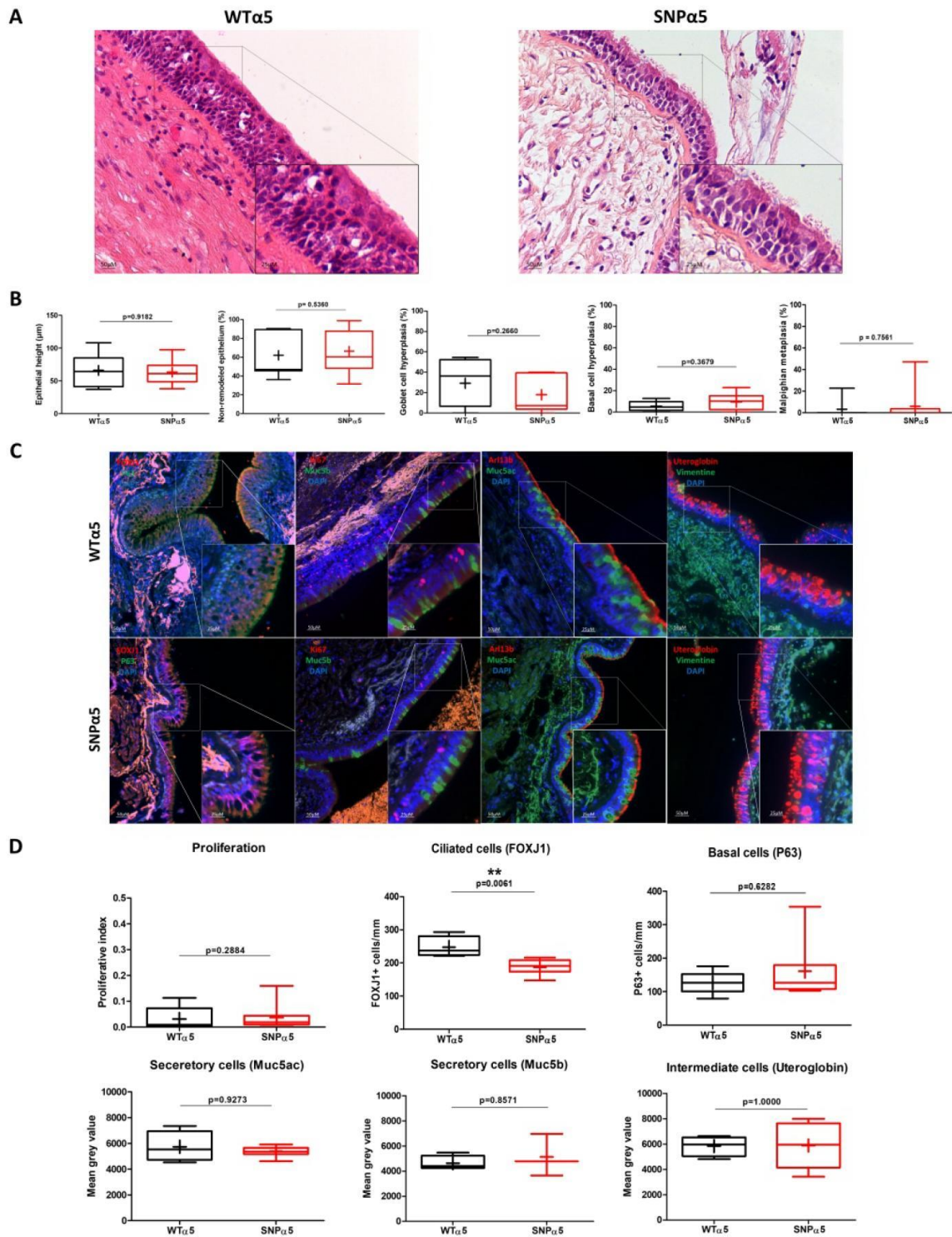


Figure 1. SNP rs16969968 is associated with a decrease of multiciliated cells in bronchi epithelia.

415x555mm (300 x 300 DPI)

Figure 2

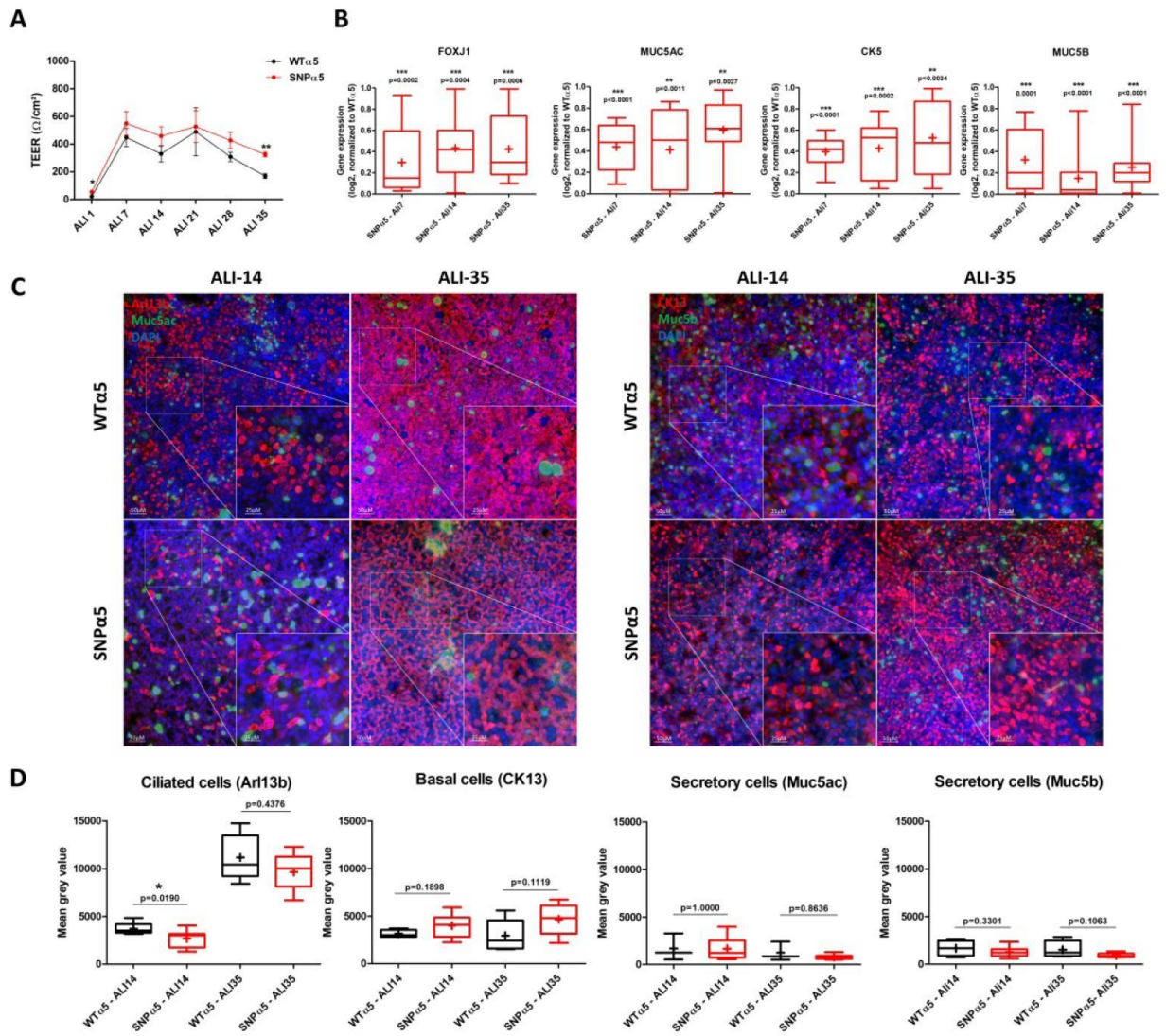


Figure 2. SNP rs16969968 alters respiratory airway epithelial cell differentiation.

415x384mm (300 x 300 DPI)

Figure 3

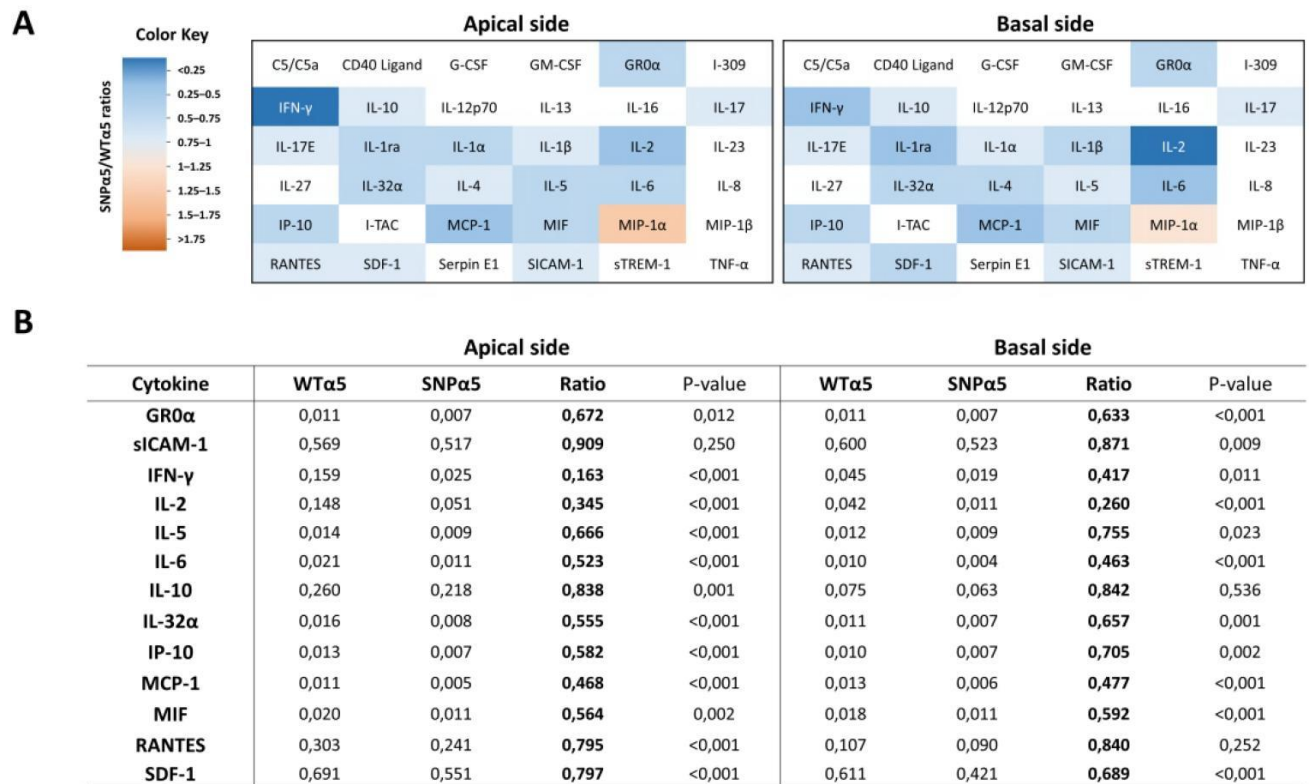


Figure 3. Cytokine and chemokine expression in AEC culture supernatants.

354x232mm (300 x 300 DPI)

Supporting information

Chr15q25 genetic variant (rs16969968) alters cell differentiation in respiratory epithelia

Zania Diabasana¹, Jeanne-Marie Perotin^{1,2}, Randa Belgacemi¹, Julien Ancel^{1,2}, Pauline Mulette^{1,2},
 Claire Launois², Gonzague Delepine³, Xavier Dubernard⁴, Jean-Claude Mérol^{1,4}, Christophe Ruaux⁵,
 Philippe Gosset⁶, Uwe Maskos⁷, Myriam Polette^{1,8}, Gaëtan Deslée^{1,2}, Valérian Dormoy¹

Table of content

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. Detailed material and methods.....	2
1.1. Human subjects.....	2
1.2. Human primary airway epithelial cell cultures.....	2
1.3. TEER measurements.....	2
1.4. RT-qPCR analyses.....	2
1.5. DNA extraction.....	3
1.6. Genotyping.....	3
1.7. Immunohistochemistry and immunofluorescent stainings.....	3
1.8. Whole-mount immunofluorescent immunostaining.....	4
1.9. In situ hybridization.....	4
1.10. Immunoblot analyses.....	4
1.11. Statistics.....	4
2. Supporting information Tables.....	6
Table S1. List of primers.....	6
Table S2. List of antibodies.....	6
3. Supporting information Figures.....	7
Figure S1.....	7
Figure S2.....	8
4. Additional References.....	9

1. Detailed material and methods

1.1. Human subjects

Patients scheduled for lung resection for cancer (University Hospital of Reims, France) were prospectively recruited (n=16) following standards established and approved by the institutional review board of the University Hospital of Reims, France (IRB Reims-CHU 20110612). Informed consent was obtained from all the patients. Patients with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cystic fibrosis, bronchiectasis, or pulmonary fibrosis were excluded. At inclusion, age, sex, smoking history, and pulmonary function test results were recorded.

1.2. Human primary airway epithelial cell cultures

Human primary airway epithelial cells (AEC) were obtained from nasal polyps resected from non-COPD patients (15 donors) to establish air-liquid interface (ALI) cultures as described by us and others [2–7]. Cells were dissociated by overnight pronase incubation (0.5mg/mL, Sigma-Aldrich) and counted with ADAM (NanoEnTek) according to NanoEnTek instructions. 200,000 cells were seeded on 12-well plates containing 0.4µm Transwells (Corning, Fisher Scientific) coated with 0.3 mg/mL collagen type IV from the 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 the basal chamber. The culture medium was changed three times a week and cells were kept in incubators at 37°C, 5% CO₂. Cells and supernatants were collected every 7 days to generate kinetic analysis. Cell morphological changes were weekly evaluated under a microscope.

1.3. TEER measurements

Trans epithelial electrical resistance (TEER) was evaluated every 7 days using an EVOM2 resistance meter with an STX2 electrode (World Precision Instruments Hitchin) at room temperature. The electrode was equilibrated in PnC-ALI for 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 ($\Omega \times \text{cm}^2$).

1.4. RT-qPCR analyses

Total RNA from AEC was isolated by High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics) and 250ng was 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

1
2 manufacturer. Primers used are listed in *Supplementary Table S1*. Results for all expression data
3 regarding transcripts were normalized to the expression of the house-keeping gene GAPDH amplified
4 with the following primers: forward 5'-ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC-3', reverse 5'-
5 TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'. Relative gene expression was assessed by the $\Delta\Delta C_t$ method and
6 expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The transcript levels of WT $\alpha 5$ mRNAs were normalized at 1.00 and the transcript
7 levels of SNP mRNAs were comparatively assessed for each gene and at each time-point.
8

13 1.5. DNA extraction

15 Epithelial cell pellets obtained from dissociated human polyps (GenElute™ RNA/DNA/Protein Plus
16 Purification Kit) or four tissue sections (20 μ m of thickness each) trimmed from formalin-fixed
17 paraffin-embedded (FFPE) lung tissue blocks (GenElute™ FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit)
18 were processed for DNA purification according to the manufacturer's instructions.
19

23 1.6. Genotyping

25 nAChR $\alpha 5$ subunit coding gene *CHRNA5* was amplified with DNA polymerase TaKaRa LA Taq
26 (TAKARA Bio Inc, Japan) using the following primers: forward 5'-
27 AGTCATGTAGACAGGTA CTTCACTCAG-3', reverse 5'- TGG AAGAAGATCTGCATTTG-3'.
28 Amplification products were digested with TaqI enzyme recognizing the following sequence: 5'-
29 TCGA-3', only present in the WT $\alpha 5$ sequence. Digestion products were then separated by agarose
30 gel electrophoresis and gels were imaged using a LAS-1000 Imager for analysis (Aida software,
31 Raytest, Courbevoie, France).
32

37 1.7. Immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescent (IF) stainings

39 Immunohistochemistry and immunofluorescent stainings were performed on FFPE lung tissues
40 distant from the tumor as previously described [8]. Five μ m sections were processed for hematoxylin
41 and eosin staining and analyzed on a microscope (x20) to assess epithelium height and bronchial
42 epithelium remodeling. FFPE lung tissues sections slides were deparaffinized and blocked with 10%
43 BSA in PBS for 30 min at room temperature. Tissue sections were then incubated with the primary
44 antibodies as listed in *Supplementary Table S2* for one night at 4°C in 3% BSA in PBS. After PBS
45 wash, a second primary antibody was used for 2h at room temperature to highlight non-differentiated
46 cells, secretory cells, and intermediate filaments on epithelia: p63 (AF1916, R&D Systems), Muc5ac
47 (NBP2-15196, Novus Biological), Muc5b (E-AB-15988, ElabScience), and Vimentin (M0725,
48 Agilent Dako). Sections were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary
49 antibodies in 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature. DNA was stained with DAPI during
50 incubation with the secondary antibodies. Micrographs were acquired on a Zeiss AxioImageur (20x
51 Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ (National Institutes of Health) for
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 analysis. For each patient, five random fields per section containing bronchi were taken to quantify
3 cell proliferation, differentiated and non-differentiated cell expression, and mucus secretion on the
4 bronchial epithelium. For each field, a threshold was established by subtracting the background with
5 a rolling ball radius of 50.0 pixels setting the minimum at 0.
6
7

8 9 10 **1.8. Whole-mount immunofluorescent immunostaining (WMIF)**

11 Methanol-fixed AEC from ALI cultures were rehydrated by decreasing methanol concentration
12 before a post-fixation with acetone. Cells were then blocked with 10% BSA in PBS for 2 hours at
13 room temperature and incubated for one night at 4°C in 3% PBS/BSA in PBS with the primary
14 antibodies as listed in *Supplementary Table S2*. Cells were washed with PBS and incubated with the
15 appropriate secondary antibodies in PBS for 2 hours at room temperature. DNA was stained with
16 DAPI during incubation with the secondary antibodies. Clarification of cells was achieved by a
17 glycerol gradient (25%/50%/75%) before mounting the slides. Micrographs were acquired on a Zeiss
18 AxioImageur (20x Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ.
19
20
21
22
23
24

25 26 **1.9. In situ hybridization**

27
28 *In situ* hybridization was performed on FFPE lung tissue sections to assess *CHRNA5* mRNA
29 expression. Tissue sections were deparaffinized and pretreated with hydrogen peroxide. Target
30 retrieval was then carried out in a steamer for 15 min and slides were dried overnight at room
31 temperature. After protease pre-treatment, tissue sections were incubated with a *CHRNA5* probe for
32 2 hours at 40°C. Target amplification was then achieved by successive hybridizations and the signal
33 was detected using DAB substrates. The slides were counterstained using hematoxylin and eosin, and
34 dehydrated by alcohol and xylene baths before mounting. Micrographs were acquired on a Nikon
35 Eclipse with NIS-Elements software and processed with ImageJ.
36
37
38
39
40
41
42

43 44 **1.10. Immunoblot analyses**

45 Thirty-six human cytokines and chemokines expression in apical and basal chamber supernatants
46 (500 µL) were assayed by proteome profiler array according to the R&D systems instructions
47 (ARY005B). Final detection was obtained by streptavidin-HRP and chemiluminescence. Membranes
48 were then imaged using ImageQuant™ LAS-4000 (GE Healthcare) for analyses. Detected signals
49 (mean grey pixel values) were digitally quantified using ImageJ. The values were normalized to the
50 positive and negative controls for each membrane and the proteins were considered detected if their
51 mean maximum grey pixel value of detection exceeded the mean maximum grey pixel value of the
52 negative controls by 5%.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1.11. Statistics

The data are expressed as mean values and percentages. Non parametric analyses were performed with Mann-Whitney, differences between groups were determined using the Student *t*-test or the one-sample *t*-test to the hypothetical value of 1.00 representing WTα5 subjects. A p-value <0.05 was considered significant.

Confidential: For Review Only

2. Supporting information Tables

Table S1. List of primers.

GENES	Forward sequence	Reverse sequence
FOXJ1	5'- CAGATCCCACCTGGCAGA-3'	5'- CGTACTGGGGGTCAATGC-3'
CK5	5'-TTCATGAAGATGTTCTTTGATGC-3'	5'-AGGTTGCGGTTGTTGTCC-3'
MUC5AC	5'- CACGTCCCCTTCAATATCCA-3'	5'- GGCCCAGGTCTCACCTTT-3'
MUC5B	5'- GTACAATGGCACCTTCTACGG-3'	5'- CTGACATTGCACCGTTGG-3'

Table S2. List of antibodies.

Antibodies	Species	Reference	Companies	Concentrations
Foxj1	Mouse	14-9965	Fisher Scientific	IF/IHC – 1:100
Ki67	Mouse	M7240	Agilent Dako	IF/IHC – 1:50
Arl13b	Rabbit	17711-1-ap	ProteinTech	IF/IHC – 1:200 WMIF – 1:200
Uterogloblin	Rabbit	10490-1-ap	ProteinTech	IF/IHC - 1:50
P63	Goat	AF1916	R&D systems	IF/IHC - 1:100
Muc5b	Rabbit	E-AB-15988	Elabscience	IF/IHC – 1:100 WMIF – 1:100
Muc5ac	Mouse	NBP2-15196	Novus Biological	IF/IHC – 1:100 WMIF – 1:100
Vimentin	Mouse	M0725	Agilent Dako	IF/IHC – 1:100
CK13	Goat	NBP-1 06047	Novus Biological	WMIF – 1:50

3. Supporting information Figures

Figure S1. CHRNA5 gene is expressed in the human airways

Representative micrograph showing SNP α 5-coding mRNA expression (red dots) in bronchial epithelium. The slides were counterstained with hematoxylin (purple).

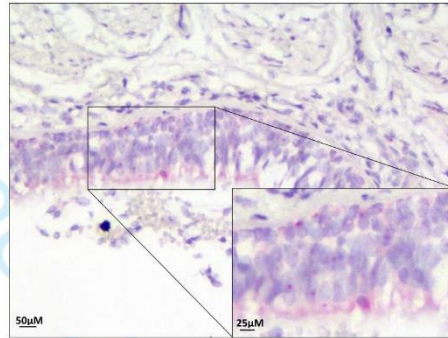


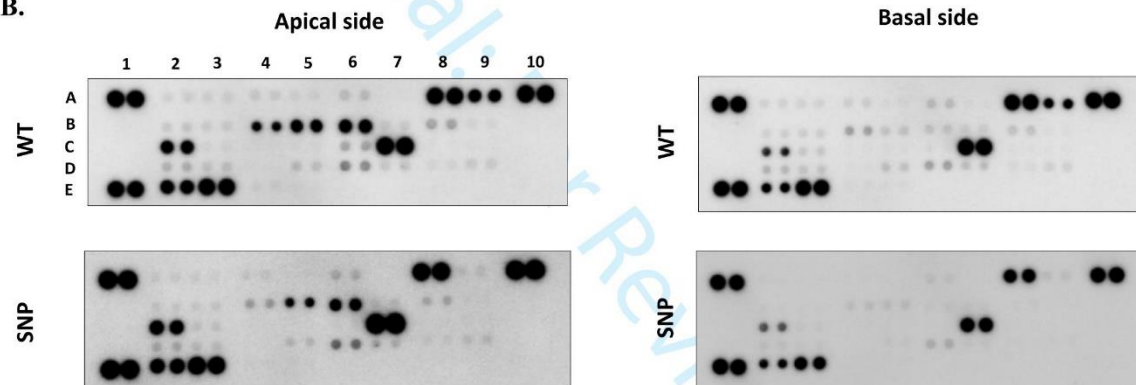
Figure S2. Cytokine expression at an early stage of differentiation

A. Table listing the position of controls and cytokine capture antibodies on the membrane-based sandwich immunoassay. **B.** Examples of nitrocellulose membrane acquisitions displaying cytokine-associated spots. The chemoluminescence produced at each spot is proportional to the amount of cytokine bound.

A.

Position	Cytokine	Position	Cytokine	Position	Cytokine	Position	Cytokine
A1	Reference spot	B2	IL-1 α	C4	IL-13	D6	MIF
A2	C5/C5a	B3	IL-1 β	C5	IL-16	D7	MIP-1 α
A3	CD40 Ligand	B4	IL-1ra	C6	IL-17	D8	MIP-1 β
A4	G-CSF	B5	IL-2	C7	IL-17E	D9	Serpin E1
A5	GM-CSF	B6	IL-4	C8	IL-23	E1	Reference spot
A6	GR0 α	B7	IL-5	C9	IL-27	E2	RANTES
A7	I-309	B8	IL-6	D2	IL-32 α	E3	SDF-1
A8	SICAM-1	B9	IL-8	D3	IP-10	E4	TNF- α
A9	IFN- γ	C2	IL-10	D4	I-TAC	E5	sTREM-1
A10	Reference spot	C3	IL-12p70	D5	MCP-1	E10	Negative control

B.



4. Additional References

- 1 Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, *et al.* British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE. *Thorax* 2013;**68**:i1–44. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-203618
- 2 Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, *et al.* Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. *J Pathol* 2015;**235**:408–19. doi:10.1002/path.4471
- 3 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
- 4 Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, *et al.* Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Sci Rep* 2015;**5**:8163. doi:10.1038/srep08163
- 5 Müller L, Brighton LE, Carson JL, *et al.* Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *J Vis Exp* Published Online First: 8 October 2013. doi:10.3791/50646
- 6 Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, *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
- 7 Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, *et al.* Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development* Published Online First: 26 September 2019. doi:10.1242/dev.177428
- 8 Perotin J-M, Coraux C, Lagonotte E, *et al.* Alteration of primary cilia in COPD. *Eur Respir J* 2018;**52**:1800122. doi:10.1183/13993003.00122-2018

3. Rôle du SNP α 5 dans la BPCO

3.1 Le gène *CHRNA5* est exprimé dans l'épithélium bronchique de patients non-BPCO et BPCO

L'un des objectifs de mon travail de thèse était d'étudier le rôle du polymorphisme rs16969968 (SNP α 5) sur les remaniements de l'épithélium respiratoire associés à la BPCO. Ainsi, nous avons premièrement confirmé et comparé le niveau d'expression du gène *CHRNA5* dans l'épithélium des voies aériennes de patients non-BPCO et BPCO. Pour cela, les transcrits de ce gène ont été marqués par la technique d'hybridation *in situ* sur des coupes de tissus FFPE (Figure 33 ▼).

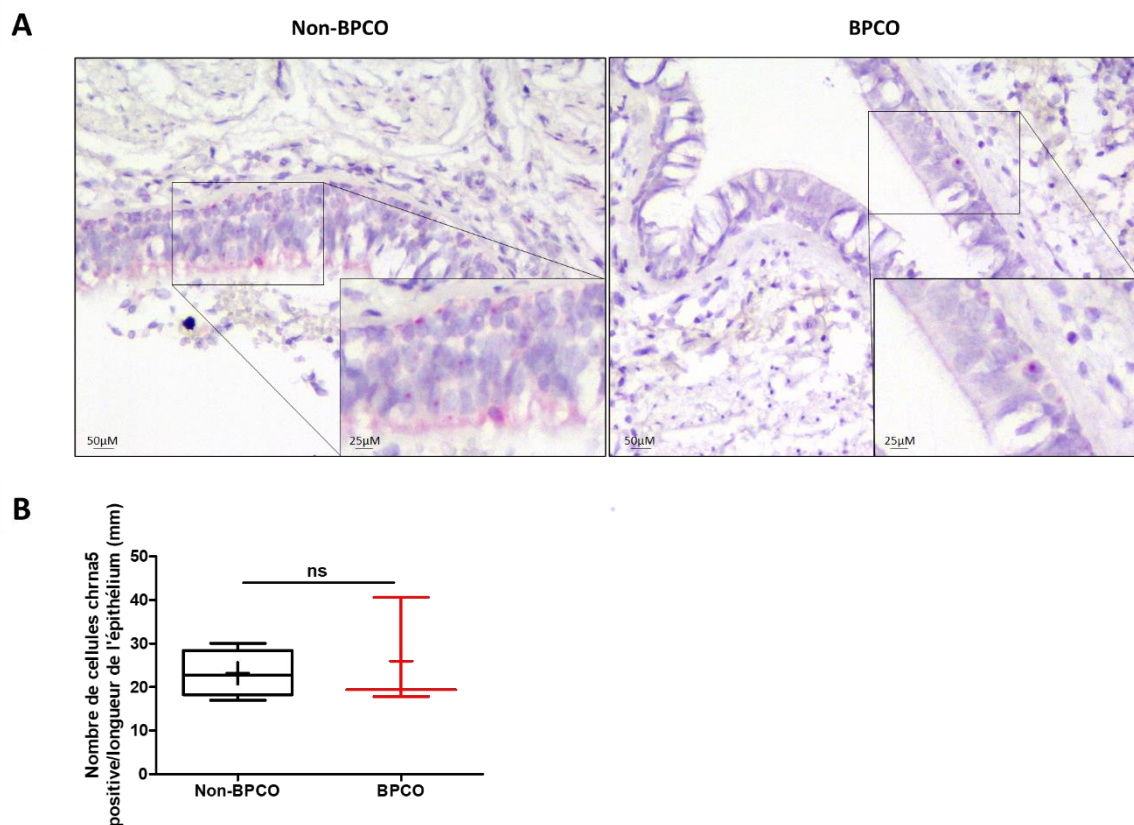


Figure 33 : Le gène *CHRNA5* est exprimé dans l'épithélium bronchique de patients non-BPCO et BPCO

A. Exemple d'images représentant l'expression du gène *CHRNA5* (points roses) dans l'épithélium bronchique de patients non-BPCO et BPCO par hybridation *in situ* effectuée sur des coupes histologiques obtenues de tissus FFPE pulmonaires. Les lames ont été contre colorées à l'hématoxyline et éosine (violet). **B.** Diagramme en boîte (médiane avec les valeurs minimales et maximales, le signe (+) représente la valeur moyenne) représentant l'expression des ARNm codants le gène *CHRNA5* chez des patients non-BPCO (n=4) et BPCO (n=3).

Les transcrits *CHRNA5* sont bien détectés dans l'épithélium bronchique pulmonaire. Par la suite, le nombre de cellules *CHRNA5* positives a été compté : il n'y a pas de différence d'expression entre les patients non-BPCO ($23,15 \pm 2,69$ signaux de détection/mm) et BPCO ($25,96 \pm 7,36$ signaux de détection/mm).

3.2 Répartition de l'expression du SNP α 5 dans les voies aériennes de patients non-BPCO et BPCO

Le gène *CHRNA5* a été génotypé à partir d'ADN extraits de culots cellulaires de fibroscopies de patients non-BPCO (n=27) et BPCO (n=21) afin de déterminer la présence du polymorphisme rs16969968 chez ces deux populations. Les patients hétérozygotes et homozygotes pour le polymorphisme ont été regroupés dans le groupe SNP α 5. Indépendamment de la pathologie, les résultats nous montrent que plus de moitié de la population étudiée exprime le SNP α 5 (**Figure 34 ▼**). Cependant, en étudiant la répartition en fonction du statut, on remarque qu'il y a environ de deux fois moins de patients WT α 5 chez les BPCO (23,81%) comparé aux non-BPCO (55,56%). De plus, les patients SNP α 5 représentent plus de $\frac{3}{4}$ des patients BPCO (76,19%) tandis qu'ils représentent moins de la moitié des patients chez les non-BPCO (44,44%). L'expression du SNP α 5 semble bien associée à la BPCO dans notre cohorte de patients.

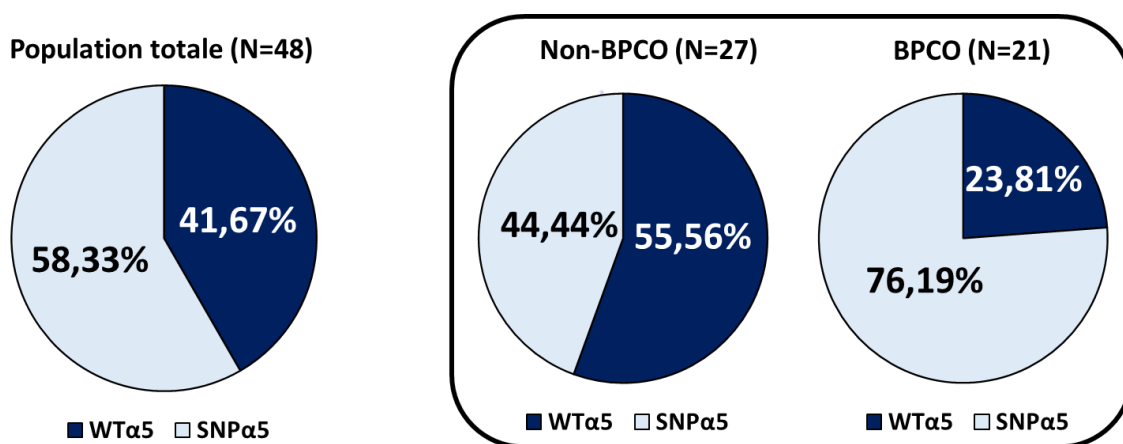


Figure 34 : Répartition du génotype de *CHRNA5* dans les voies aériennes de patients non-BPCO et BPCO

*Graphiques circulaires représentant la répartition du gène *CHRNA5* dans une population non-BPCO (n=27) vs BPCO (n=21) : WT α 5 et SNP α 5 (Homozygote et Hétérozygote).*

3.3 Association du SNP α 5 avec les données cliniques des patients non-BPCO et BPCO

Après le génotypage du gène *CHRNA5*, les données cliniques des patients BPCO et non-BPCO ont été confrontées pour déterminer l'impact du SNP α 5. Plusieurs paramètres ont ainsi été évalués à savoir les symptômes respiratoires, la fonction pulmonaire, les tests sanguins et la scanographie. Différentes comparaisons ont été étudiées afin d'examiner au mieux l'implication du polymorphisme dans les manifestations cliniques respiratoires : les patients WT α 5 et SNP α 5 ont été comparés au sein de chacun des groupes non-BPCO et BPCO et au sein de la population totale (non-BPCO et BPCO regroupés).

Les résultats démontrent que chez les patients non-BPCO, l'expression du SNP α 5 est corrélée à une augmentation non-significative du taux de neutrophiles ($4,4\pm 1,6$ vs $6,1\pm 2,5$, $p=0,065$) et fibrinogènes ($3,8\pm 0,8$ vs $4,9\pm 1,8$, $p=0,075$) sanguins comparés aux patients WT α 5 tandis que le taux d'éosinophiles sanguins dépasse significativement la limite supérieure de la norme chez les SNP α 5 comparés aux WT α 5 (6 patients contre 1 respectivement, $p=0,004$) (**Tableau 3 ►**). L'emphysème est également augmenté chez les patients SNP α 5 ($0,1\pm 0,3$ vs $1,6\pm 3,0$, $p=0,07$) mais de manière non significative. Chez les patients BPCO en revanche, l'expression du polymorphisme est significativement associée à une diminution de l'incidence du cancer du poumon chez les patients WT α 5 comparés aux SNP α 5 (3 patients vs 1 patient respectivement, $p=0,008$) et tend de façon surprenante à augmenter la fonction respiratoire (rapport de Tiffeneau de $48,3\pm 10,5$ vs $54,9\pm 13,9$, $p=0,085$) bien que la différence soit non significative. Contrairement aux patients non-BPCO, aucune différence n'a été observée quant à la formule sanguine/leucocytaire et à l'expression du fibrinogène sanguin.

RESULTATS

	Non-BPCO				BPCO			
	Total	WTα5	SNPα5	<i>p</i> valeur WTα5 vs SNPα5	Total	WTα5	SNPα5	<i>p</i> valeur WTα5 vs SNPα5
n	23	14	9		21	5	16	
Mâle	9	3	6	0.014	15	3	12	0.517
Age, années	53.5 ± 15.7	52.0 ± 19.5	55.8 ± 7.5	0.586	62.5 ± 9.6	60.4 ± 13.0	63.1 ± 8.7	0.593
IMC, kg/m²	28.3 ± 7.3	28.1 ± 6.5	28.8 ± 8.9	0.803	25.5 ± 5.3	22.1 ± 3.7	26.6 ± 5.4	0.101
Statut tabagique								
Non-Fumeurs	16	8	8	0.106	20	5	15	0.567
Ex-Fumeurs	7	3	4	0.486	12	2	10	0.292
Paquets-années	31.3 ± 23.6	22.6 ± 14.4	39.9 ± 28.5	0.149	40.5 ± 16.4	42.4 ± 16.0	39.8 ± 17.0	0.768
Comorbidités								
Maladies cardiovasculaires	10	6	4	0.940	14	2	12	0.147
Cancer du poumon	3	0	3	0.210	4	3	1	0.008
Symptômes respiratoires								
Toux chronique	19	13	6	0.162	16	4	12	0.819
Expectorations	11	7	4	0.888	13	4	9	0.340
Douleur à la poitrine	5	2	3	0.176	7	2	5	0.717
Bronchite Chronique	7	4	3	0.809	11	2	9	0.525
Dyspnée	13	8	5	0.658	20	5	15	0.567
mMRC, n	21	13	8		20			
mMRC 0	5	3	2		0	0	0	
mMRC 1	11	7	4	0.275	7	2	5	0.759
mMRC 2	1	0	1		6	1	5	
mMRC 3	3	3	0		3	0	3	
mMRC 4	1	0	1		4	1	3	
Exacerbations dans l'année					13	1.3 ± 0.6	2.6 ± 2.5	0.424
Antibiotiques dans les 6 derniers mois								
Nombre de patients	10	6	4	0.940	14	3	11	0.717
Nombre de traitements par patients	0.8 ± 1.1	0.9 ± 1.2	0.6 ± 0.7	0.635	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.975
Corticostéroïdes dans les 6 derniers mois								
Nombre de patients	3	1	2	0.295	4	0	4	0.214
Nombre de traitements par patients	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.755	0.2 ± 0.5	0,0000	0.3 ± 0.6	0.268
Traitements inhalés								
Corticostéroïdes	3	3	0	0.180	15	4	11	0.245
	3	3	0	0.171	12	3	9	0.770

Tableau 3 : Associations entre les génotypes WTα5 et SNPα5 de patients non-BPCO et BPCO et les données cliniques

RESULTATS

	Non-BPCO				BPCO			
	Total	WTa5	SNPa5	<i>p</i> valeur WTa5 vs SNPa5	Total	WTa5	SNPa5	<i>p</i> valeur WTa5 vs SNPa5
Fonction pulmonaire								
n	23	14	9		21	5	16	
VEMS, % de la valeur prédite	95.7 ± 16.1	100.2 ± 15.1	88.8 ± 15.9	0.097	58.0 ± 23.8	50.2 ± 28.3	60.3 ± 22.8	0.360
CVF, % de la valeur prédite	97.4 ± 16.4	101.9 ± 16.6	90.5 ± 14.2	0.104	83.0 ± 20.7	75.4 ± 27.1	85.4 ± 18.7	0.343
VEMS/CVF	81.7 ± 8.4	82.2 ± 6.0	80.9 ± 11.6	0.713	53.3 ± 13.2	48.3 ± 10.5	54.9 ± 13.9	0.085
VR, % de la valeur prédite	125.2 ± 46.6	117.5 ± 46.7	138.3 ± 47.0	0.363	190.5 ± 63.9	238.5 ± 72.0	175.7 ± 56.1	0.740
CPT, % de la valeur prédite	101.9 ± 30.4	99.2 ± 35.8	106.7 ± 19.5	0.616	121.7 ± 19.2	124.2 ± 26.1	120.7 ± 17.1	0.472
DLCO, %	66.4 ± 24.1	62.0 ± 25.8	76.2 ± 18.3	0.290	48.9 ± 27.8	39.8 ± 13.5	51.5 ± 30.5	0.511
Gaz du sang artériel de l'air ambiant								
n	18	11	7		18	5	12	
pH	7.41 ± 0.04	7.41 ± 0.02	7.42 ± 0.05	0.918	7.42 ± 0.03	7.43 ± 0.03	7.42 ± 0.36	0.663
PaO ₂ , mm Hg	88.4 ± 14.6	92.8 ± 13.9	81.6 ± 13.9	0.113	70.9 ± 14.6	79.6 ± 12.2	73.2 ± 9.0	0.242
PaCO ₂ , mm Hg	37.1 ± 5.1	36.8 ± 2.9	37.6 ± 7.8	0.772	36.7 ± 5.14	37.2 ± 3.4	39.5 ± 5.1	0.373
SaO ₂ , %	97.8 ± 2.6	98.5 ± 1.4	96.6 ± 3.6	0.112	91.0 ± 22.8	97.2 ± 1.3	96.0 ± 2.3	0.302
Test de marche de 6 minutes à l'air								
n	11	6	4		14	1	12	
Minimal SaO ₂ , %	94.1 ± 2.8	94.3 ± 2.7	93.8 ± 3.3	0.768	91.8 ± 6.2	90.0	92.0 ± 6.5	
Distance, m	427 ± 56	385 ± 178	394 ± 34	0.924	401 ± 130	472,0000	395 ± 135	
Distance, % of predicted value	79.5 ± 14.8	69.6 ± 32.3	77.0 ± 21.0	0.692	74.2 ± 18.7	84.0	73.3 ± 19.4	
GOLD								
Spirométrie								
n	NA	NA	NA		19	5	14	
1	NA	NA	NA		3	1	2	
2	NA	NA	NA		7	1	6	
3	NA	NA	NA		7	2	5	0.754
4	NA	NA	NA		2	1	1	
mMRC	NA	NA	NA		19	5	14	
n	NA	NA	NA		21	5	16	
A	NA	NA	NA		3	1	2	
B	NA	NA	NA		6	2	4	
C	NA	NA	NA		3	2	1	0.178
D	NA	NA	NA		7	0	7	
CAT	NA	NA	NA		16.5 ± 7.6	18.0 ± 11.4	16.1 ± 6.9	0.716
Test sanguin								
n	22				21			
Hémoglobine	14.1 ± 1.7	13.7 ± 1.44	14.6 ± 1.9	0.232	14.4 ± 1.2	14.1 ± 1.0	14.6 ± 1.2	0.422
PN Neutrophiles	5.1 ± 2.1	4.4 ± 1.6	6.1 ± 2.5	0.065	5.3 ± 1.6	5.0 ± 0.6	5.4 ± 1.7	0.480
PN Eosinophiles	0.33 ± 0.57	0.17 ± 0.11	0.57 ± 0.86	0.112	0.4 ± 0.7	0.15 ± 0.06	0.44 ± 0.78	0.852
Eosinophiles ≥ 0.3	7	1	6	0.004	7	0	7	0.101
Fibrinogène	4.2 ± 1.4	3.8 ± 0.8	4.9 ± 1.8	0.075	4.2 ± 1.2	3.5 ± 0.4	4.3 ± 1.3	0.720
CT-scan								
Emphysème, n	22	14	8	0.240	18	5	13	0.389
Quantification de l'emphysème	0.6 ± 1.9	0.1 ± 0.3	1.6 ± 3.0	0.07	7.7 ± 5.6	10.6 ± 6.7	6.7 ± 5.1	0.181

Tableau 3 (suite) : Associations entre les génotypes WTa5 et SNPa5 de patients non-BPCO et BPCO et les données cliniques

Enfin, les patients non-BPCO et BPCO ont été regroupés et l'influence de l'expression du polymorphisme a été évaluée de façon indépendante sur l'ensemble de la cohorte (**Tableau 4 ►**). Le SNP α 5 est significativement associé à un déclin de la fonction respiratoire mis en évidence par la diminution du VEMS ($87,1 \pm 29,2$ vs $70,6 \pm 24,5$, $p=0,049$), de la pression partielle d'oxygène ($88,7 \pm 14,4$ vs $76,3 \pm 11,4$, $p=0,008$) et du taux de saturation en oxygène ($98,1 \pm 1,5$ vs $96,2 \pm 2,8$, $p=0,018$). En ce qui concerne le test sanguin, le SNP α 5 est associé à une augmentation significative du taux de neutrophiles ($4,5 \pm 1,4$ vs $5,6 \pm 2,0$, $p=0,044$), fibrinogène ($3,7 \pm 0,7$ vs $4,5 \pm 1,5$, $p=0,037$), tandis que l'augmentation du taux d'éosinophiles ($0,2 \pm 0,1$ vs $0,5 \pm 0,8$, $p=0,058$) est non-significative. Finalement, le SNP α 5 est significativement liée à la présence d'emphysème (6 patients WT α 5 contre 15 patients SNP α 5, $p=0,03$).

	WT α 5	SNP α 5	<i>p</i> valeur WT α 5 vs SNP α 5
n	19	25	
Mâle	6	18	0.004
Age, années	54.2 \pm 18.0	60.5 \pm 8.9	0.137
IMC, kg/m²	26.4 \pm 6.3	27.4 \pm 6.7	0.635
Statut tabagique			
Non-Fumeurs	13	23	0.045
Ex-Fumeurs	5	14	0.138
Paquets-années	30.2 \pm 17.5	39.8 \pm 21.0	0.173
Comorbidités			
Maladies cardiovasculaires	8	16	0.149
Cancer du poumon	19	25	0.985
Symptômes respiratoires			
Toux chronique	17	18	0.146
Expectorations	11	13	0.767
Douleur à la poitrine	4	8	0.380
Bronchite Chronique	6	12	0.272
Dyspnée	13	20	0.237
mMRC, n	17	24	
mMRC 0	3	2	
mMRC 1	9	9	
mMRC 2	1	6	0.342
mMRC 3	3	3	
mMRC 4	1	4	
Exacerbations dans l'année			
Antibiotiques dans les 6 derniers mois			
Nombre de patients	9	15	0.405
Nombre de traitements par patients	0.8 \pm 1.1	0.8 \pm 0.7	0.747
Corticostéroïdes dans les 6 derniers mois			
Nombre de patients	1	6	0.092
Nombre de traitements par patients	0.1 \pm 0.2	0.2 \pm 0.5	0.153
Traitements inhalés			
Corticostéroïdes	7	11	0.603
	6	9	1

Tableau 4 : Associations entre les génotypes WT α 5 et SNP α 5 et les données cliniques

	WTα5	SNPα5	<i>p</i> valeur WTα5 vs SNPα5
Fonction pulmonaire			
n	19	25	
VEMS, % de la valeur prédite	87.1 ± 29.2	70.6 ± 24.5	0.049
CVF, % de la valeur prédite	94.9 ± 22.4	87.2 ± 17.1	0.204
VEMS/CVF	73.3 ± 16.9	64.3 ± 18.1	0.098
VR, % de la valeur prédite	157.6 ± 65.5	162.6 ± 54.9	0.808
CPT, % de la valeur prédite	113.2 ± 21.6	11.8 ± 18.8	0.700
DLCO, %	60.1 ± 20.2	58.0 ± 29.6	0.823
Gaz du sang artériel de l'air ambiant			
n	16	19	
pH	7.41 ± 0.02	7.41 ± 0.04	0.955
PaO ₂ , mm Hg	88.7 ± 14.4	76.3 ± 11.4	0.008
PaCO ₂ , mm Hg	36.9 ± 2.9	38.8 ± 6.1	0.274
SaO ₂ , %	98.1 ± 1.5	96.2 ± 2.8	0.018
Test de marche de 6 minutes à l'air			
n	7	15	
Minimal SaO ₂ , %	93.7 ± 3.0	92.5 ± 5.7	0.596
Distance, m	452 ± 54	395 ± 114.8	0.226
Distance, % of predicted value	81.6 ± 10.0	74.3 ± 19.1	0.357
GOLD			
Spirométrie			
n	5	14	
1	1	2	0.754
2	1	6	
3	2	5	
4	1	1	
mMRC			
n	19	25	
A	1	2	0.091
B	2	4	
C	2	1	
D	0	7	
CAT			
Test sanguin			
n	18	25	
Hémoglobine	13.8 ± 1.3	14.6 ± 1.5	0.087
PN Neutrophiles	4.5 ± 1.4	5.6 ± 2.0	0.044
PN Eosinophiles	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.8	0.058
Eosinophiles ≥ 0.3			
Fibrinogène	3.7 ± 0.7	4.5 ± 1.5	0.035
CT-scan			
N			
Emphysème, n	6	15	0.030
Quantification de l'emphysème	2.8 ± 5.7	4.9 ± 5.0	0.219

Tableau 4 (suite) : Associations entre les génotypes WTα5 et SNPα5 et les données cliniques

3.4 L'expression du SNP α 5 n'a pas d'effet sur le remodelage de l'épithélium respiratoire des patients BPCO

Afin de compléter les études précédentes, l'influence de l'expression du SNP α 5 sur l'histomorphologie bronchique a été évaluée au sein de populations BPCO WT α 5 et SNP α 5 à partir de tissus FFPE.

Par analogie à l'analyse que nous avons effectuée sur les tissus de patients non BPCO (*cf partie 2.2 de la section de résultats*), nous avons évalué l'impact du SNP α 5 sur le remodelage chez les patients BPCO (**Figure 35 ►**). Les résultats indiquent que la proportion d'épithélium non remodelé n'est pas significativement différente entre les BPCO WT α 5 et SNP α 5 (44,79 \pm 11,19% vs 68,23 \pm 6,43% respectivement, $p=0,07$) bien que le pourcentage d'épithélium non remodelé tende à être supérieur chez les BPCO SNP α 5 comparés aux BPCO WT α 5. Le même constat est observé en comparant les non-BPCO WT α 5 et les BPCO WT α 5 (62,00 \pm 8,81 vs 44,79 \pm 11,19 respectivement, $p=0,26$) et les non-BPCO SNP α 5 et les BPCO SNP α 5 (66,33 \pm 7,86 vs 68,23 \pm 6,43 respectivement, $p=0,85$).

De façon plus détaillée, le pourcentage d'hyperplasie des cellules caliciformes en comparant les BPCO WT α 5 et SNP α 5 (39,77 \pm 13,17% vs 22,74 \pm 7,84% respectivement, $p=0,2618$), les non-BPCO WT α 5 et BPCO WT α 5 (29,24 \pm 8,97 vs 39,77 \pm 13,17 respectivement, $p=0,5324$) et les non-BPCO SNP α 5 et BPCO SNP α 5 (17,97 \pm 5,80 vs 22,74 \pm 7,84 respectivement, $p=0,64$) n'était pas significativement différent. De même, aucune différence dans le pourcentage d'hyperplasie des cellules basales n'a été observée chez les BPCO WT α 5 comparés aux BPCO SNP α 5 (12,05 \pm 5,00% vs 9,04 \pm 3,18% respectivement, $p=0,60$), les non-BPCO WT α 5 et BPCO WT α 5 (5,51 \pm 1,69 vs 12,05 \pm 5,00 respectivement, $p=0,26$) et les non-BPCO SNP α 5 et BPCO SNP α 5 (9,66 \pm 2,56 vs 9,04 \pm 3,18 respectivement, $p=0,88$). Le polymorphisme n'a pas d'influence sur la métaplasie malpighienne (BPCO WT α 5 : 3,40 \pm 2,27% vs BPCO SNP α 5 : 0,00% ; non-BPCO WT α 5 : 3,25 \pm 3,25 vs BPCO WT α 5 : 3,40 \pm 2,26, $p=0,97$; non-BPCO SNP α 5 : 6,04 \pm 5,20 vs BPCO SNP α 5 : 0,00%), la hauteur épithéliale (BPCO WT α 5 : 72,62 \pm 4,66 μ m vs BPCO SNP α 5 : 70,57 \pm 3,19 μ m, $p=0,71$; non-BPCO WT α 5 : 66,07 \pm 9,34 vs BPCO WT α 5 : 72,62 \pm 4,66, $p=0,53$; non-BPCO SNP α 5 : 63,48 \pm 5,98 vs BPCO SNP α 5 : 70,57 \pm 3,19, $p=0,30$) et l'index de prolifération (BPCO WT α 5 : 0,06 \pm 0,02 vs BPCO SNP α 5 : 0,03 \pm 0,01, $p=0,22$; non-BPCO WT α 5 : 0,03 \pm 0,02 vs BPCO WT α 5 : 0,06 \pm 0,02, $p=0,36$; non-BPCO SNP α 5 : 0,04 \pm 0,02 vs BPCO SNP α 5 : 0,03 \pm 0,01, $p=0,70$).

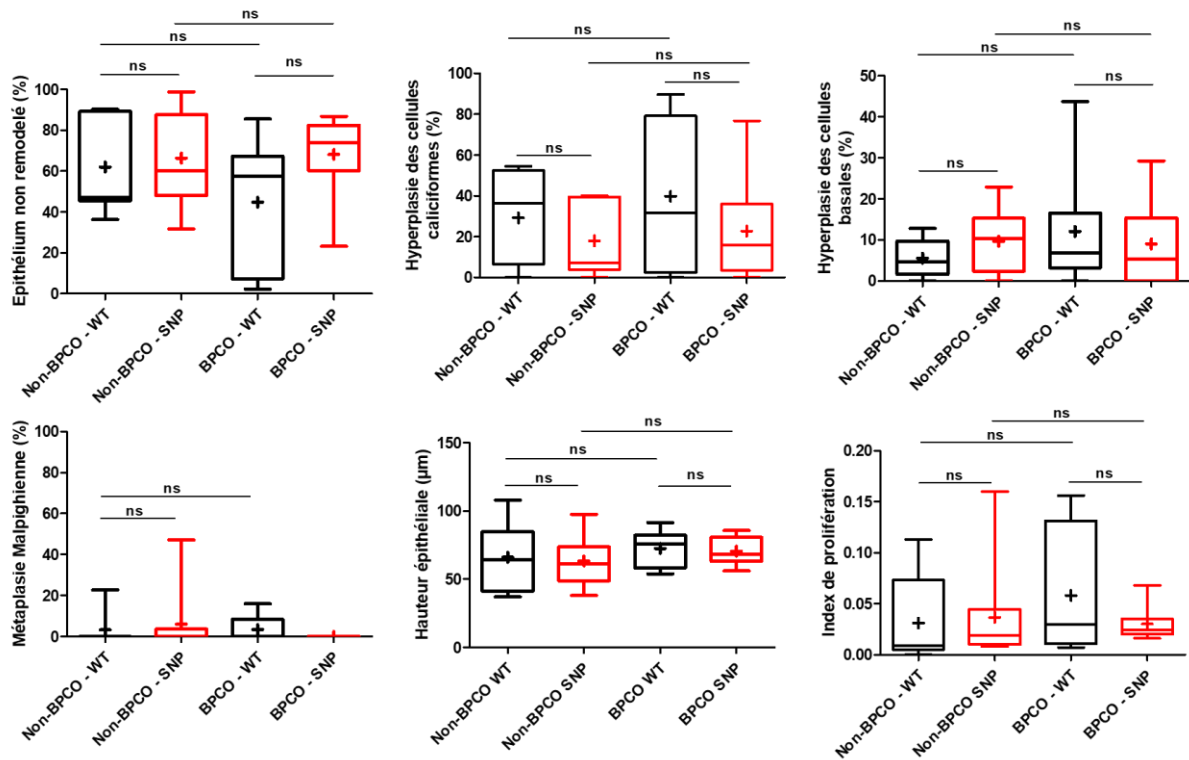


Figure 35 : Le SNP rs16969968 n’influence pas le remodelage épithélial bronchique des patients

BPCO

Diagrammes en boîte (médiane avec les valeurs minimales et maximales, le signe (+) représente la valeur moyenne) représentant le pourcentage d’épithélium non remodelé et remodelé (hyperplasie des cellules basales, hyperplasie des cellules caliciformes et métaplasie malpighienne), la hauteur épithéliale (µm) et l’index de prolifération chez des patients WTα5 (noir) et SNPα5 (rouge) non-BPCO et BPCO.

Enfin, nous avons terminé par l’étude des différentes populations cellulaires bronchiques. Ainsi, les niveaux de gris des mucines (Muc5ac et Muc5b) et de l’utéroglobine ont été quantifiés et le nombre de cellules ciliées et basales a été compté (**Figure 36 ►**). Les résultats indiquent que les valeurs de sécrétions de Muc5ac (BPCO WTα5 : 5601±488,2 vs BPCO SNPα5 : 6508±616,3, p=0,27 ; non-BPCO WTα5 : 5735±592,3 vs BPCO WTα5 : 5601±488,2, p=0,87 ; non-BPCO SNPα5 : 5360±162,1 vs BPCO SNPα5 : 6508±616,3, p=0,06), Muc5b (BPCO WTα5 : 4338±575,1 vs BPCO SNPα5 : 5426±788,1, p=0,35 ; non-BPCO WTα5 : 4659±404,0 vs BPCO SNPα5 : 4338±575,1, p=0,69 ; non-BPCO SNPα5 : 5128±973,7 vs BPCO SNPα5 : 5426±788,1, p=0,83) et d’utéroglobine (BPCO WTα5 : 6285±856,5 vs BPCO SNPα5 : 5239±357,0, p=0,20 ; non-BPCO WTα5 : 5848±388,5 vs BPCO WTα5 : 6285±856,5, p=0,66 ; non-BPCO SNPα5 : 5885±710,2 vs BPCO SNPα5 : 5239±357,0, p=0,40) ne sont pas significativement différentes entre les différents groupes.

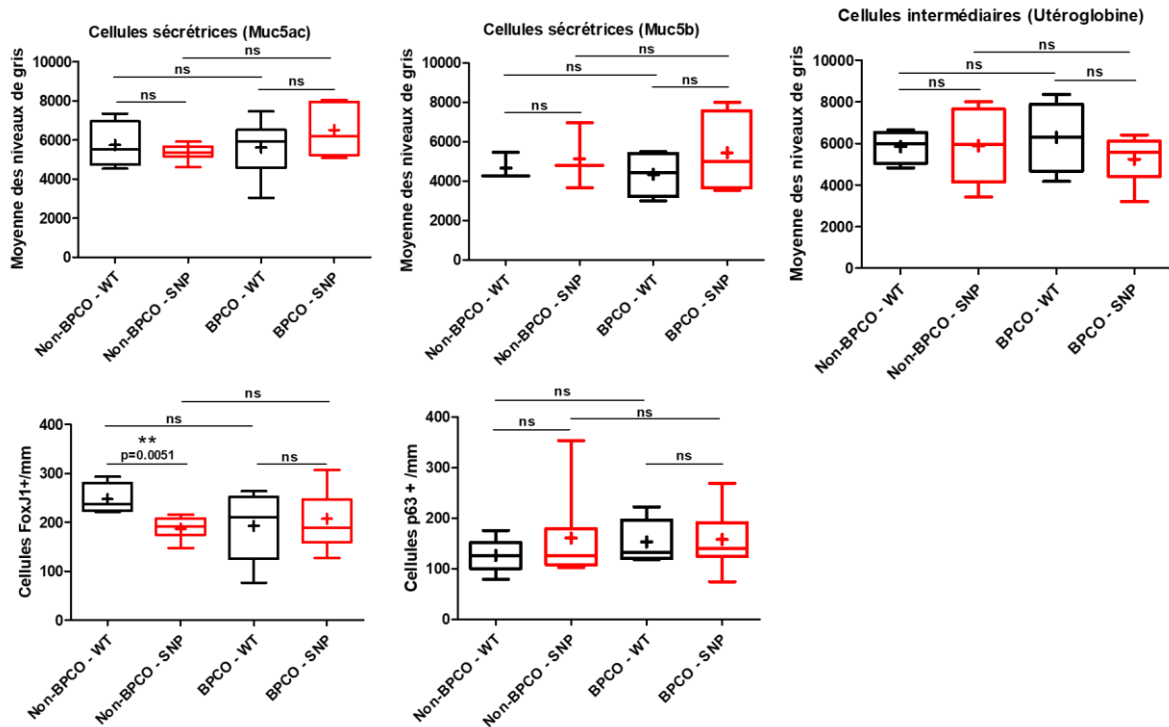


Figure 36 : Le SNP rs16969968 n’influence pas la différenciation cellulaire des patients

BPCO

Diagrammes en boîte (médiane avec les valeurs minimales et maximales, le signe (+) représente la valeur moyenne) représentant les niveaux de gris des mucines (*Muc5ac*, *Muc5b*) et de l’utéroglobine ainsi que le nombre de cellules ciliées et basales chez des patients WTα5 (noir) et SNPα5 (rouge) non-BPCO et BPCO.

Enfin, le même constat a été observé concernant le nombre de cellules ciliées (BPCO WTα5 : 192,9±32,77 cellules ciliées/mm vs BPCO SNPα5 207,3±23,43 cellules ciliées/mm, p=0,72 ; non-BPCO WTα5 : 247,4±15,93 cellules ciliées/mm vs BPCO WTα5 : 192,9±32,77 cellules ciliées/mm, p= 0,21 ; non-BPCO SNPα5 : 186,9±8,67 cellules ciliées/mm vs BPCO SNPα5 : 207,3±23,43 cellules ciliées/mm, p=0,43) et de cellules basales (BPCO WTα5 : 153,1±19,67 cellules basales/mm vs BPCO SNPα5 : 158,1±17,55 cellules basales/mm, p=0,86 ; non-BPCO WTα5 : 126,6±13,57 cellules basales/mm vs BPCO WTα5 : 153,1±19,67 cellules basales/mm, p=0,28 ; non-BPCO SNPα5 : 160,8±33,7 cellules basales/mm vs BPCO SNPα5 : 158,1±17,55 cellules basales/mm, p=0,94).

L’ensemble de ces résultats suggèrent que le SNPα5 n’a pas de rôle dans les remaniements de l’épithélium bronchique chez les patients BPCO.

**DISCUSSION,
PERSPECTIVES ET
CONCLUSIONS**

1. Synthèse des travaux et discussion

Cette thèse a été organisée en deux axes d'études : le premier axe consistait à caractériser les transcrits et les protéines codants les sous-unités des nAChRs dans les voies aériennes pulmonaires chez l'Homme. Les récepteurs neuronaux et musculaires sont à ce jour totalement définis (Kalamida et al., 2007). En revanche, bien que différentes études aient montré la présence de certaines sous-unités dans l'appareil respiratoire, aucune représentation complète des 16 sous-unités codants les nAChRs chez les mammifères n'a été réalisée dans le poumon malgré leur implication dans divers mécanismes pulmonaires (morphogénèse, réparation tissulaire et inflammation) (Mei et al., 2018; Vukelic et al., 2013). Nous avons donc réalisé une cartographie complète dans le poumon humain. Le second axe de notre étude a concerné le polymorphisme rs16969968 (SNP α 5) de la sous-unité α 5 des nAChRs qui a été associé à l'addiction à la nicotine, aux cancers pulmonaires et à la BPCO (Korytina et al., 2016; Wojas-Krawczyk et al., 2012; Zhou et al., 2020). Toutefois aucune étude n'a permis d'établir une corrélation entre l'expression du SNP α 5 et les mécanismes biologiques pulmonaires. Nous avons donc proposé de définir l'influence de ce polymorphisme sur la différenciation et les remodelages épithéliaux dans un contexte non-BPCO et BPCO.

1.1 Cartographie des sous-unités des nAChRs

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'atlas des nAChRs dans le poumon chez l'Homme. L'expression génique des 16 sous-unités codants les nAChRs a été définie en utilisant des données d'expression transcriptomique de patients fumeurs et non-fumeurs ne présentant pas de pathologies respiratoires. Ces études ont été menées dans l'organe pulmonaire dans son ensemble (épithéliums, tissu nerveux, muscles, etc.) chez 153 sujets (42 non-fumeurs et 111 fumeurs) et dans les bronchioles (SAEC) chez 135 sujets (63 non-fumeurs et 72 fumeurs) par la technique de *RNA-sequencing*. En parallèle, nous avons réalisé des RTqPCR sur des cellules bronchiques issues de fibroscopies provenant de 10 sujets (5 fumeurs et 5 non-fumeurs) afin de compléter les données précédentes et de définir l'expression dans les bronches (LAEC). Les patients inclus ne présentaient pas de pathologies respiratoires. Toutes les données brutes ont été formatées afin de pouvoir les comparer entre elles. Nous avons démontré que les 16 transcrits codants les sous-unités sont détectées dans le poumon des patients non-fumeurs et fumeurs à l'exception du transcrit *CHRNA7* qui n'a pas été détecté chez les non-fumeurs. Dans le poumon, *CHRNA10/B1/E* font partie des gènes les plus exprimés tandis que *CHRNA3/A4/B2/G* sont les moins exprimés. Les niveaux de transcrits *CHRNA1/A2/A7/B3/B4*

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

étaient significativement plus élevés tandis que les transcrits *CHRNA3/A4/A9/B2/D/G* étaient significativement moins élevés chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs. Dans les LAEC, les transcrits *CHRNA1/A2/A4/B1/B3/B4/D* n'ont pas été détectés et *CHRNBI/B4* ont uniquement été détectés chez les fumeurs. Globalement *CHRNA5/A7/A9/A10* étaient les transcrits les plus représentés toutefois, et contrairement au poumon, il n'y a pas eu de différence significative d'expression entre les sujets fumeurs et non-fumeurs. Dans les SAEC, toutes les sous-unités ont été détectées chez les fumeurs et les non-fumeurs avec *CHRNA7/A9/A10/B2* les plus représentées et *CHRNA1/A4/A5/B3/B4/D/E* les moins représentés. Chez les fumeurs, les expressions de *CHRNA5/A7/B2/B3* étaient significativement plus élevées et les transcrits *CHRNA2/A9* moins exprimés comparés aux non-fumeurs. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'expression transcriptomique des nAChRs dans le poumon confirmant ainsi leur importance dans la physiologie pulmonaire. De plus, les différences de niveaux de transcrits entre les patients non-fumeurs et fumeurs supportent l'idée que l'expression de ces récepteurs est modulée par la nicotine exogène, comme cela a pu être observé dans la littérature pour l'une ou l'autre des sous-unités en fonction du contexte expérimental (Perez et al., 2008; Rauthan et al., 2017).

Pour affiner la détection des sous-unités des nAChRs dans les compartiments épithéliaux et non-épithéliaux pulmonaires, nous avons exploité les données d'expression génique analysées par *single-cell sequencing* obtenu sur du matériel biologique pulmonaire (brossages tissulaire et parenchyme) de sujets sans pathologies respiratoires (lungcellatlas.org). Dans cette étude, le compartiment épithélial regroupe les PnI, PnII, cellules basales 1 et 2, cellules ciliées 1 et 2, cellules caliciformes 1 et 2, cellules clubs et ionocytes tandis que le compartiment non-épithélial regroupe des cellules immunitaires (cellules lymphatiques, mastocytes, macrophages, LB, LT, NK, neutrophiles et DC), fibroblastes, cellules endothéliales, musculaires lisses et mésothéliales. Les résultats nous ont montré que *CHRNBI/D/G* ne sont exprimés dans aucun des compartiments étudiés. Dans l'épithélium, *CHRNA5/A7/A9/A10/B1/E* étaient exprimés dans la plupart des cellules épithéliales sachant que certaines d'entre elles exprimaient préférentiellement certains sous-types de récepteurs. Le même cas de figure a été observé dans le compartiment non-épithélial. Ici encore, les résultats confirment l'importance des nAChRs dans la physiologie et le système immunitaire pulmonaire (Olofsson et al., 2012) et suggèrent que le type de sous-unité exprimé par les cellules immunitaires influence leurs propriétés fonctionnelles.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Enfin, dans le but de caractériser la localisation protéique des sous-unités, des immunomarquages sur des tissus pulmonaires FFPE ont été réalisés. L'étude immunologique des nAChRs est délicate et controversée en raison des homologies de séquences existantes entre les sous-unités, raison pour laquelle peu d'études se sont penchées sur l'expression protéique des nAChRs (Lam et al., 2016). Cette composante a donc été prise en compte afin de sélectionner au mieux des anticorps les plus spécifiques de chacune des sous-unités. Nous avons constaté que toutes les sous-unités sont exprimées dans l'épithélium bronchique à l'exception des $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 4/\beta 3/\gamma$ qui n'ont pas été détectées. Les sous-unités identifiées présentent une localisation distincte. Ainsi, l' $\alpha 3$ est localisé au pôle apical des cellules différenciées tout comme l' $\alpha 5$ qui a également été identifiée dans le noyau de ces cellules ; l' $\alpha 6$ et $\alpha 9$ présentaient une localisation similaire dans le cytoplasme des cellules multiciliées et caliciformes ainsi que dans les cils ; $\alpha 7/\alpha 10/\beta 1/\beta 2/\delta/\epsilon$ ont été identifiées dans les cellules différenciées et non différenciées ; et pour finir $\beta 4$ a été strictement détectée dans les cils. La localisation différentielle des sous-unités suggère des fonctionnalités et des propriétés distinctes.

1.2 Exploration du rôle de rs16969968 dans les remodelages épithéliaux

Etant donnée l'association de rs16969968 avec l'incidence du cancer du poumon et la réduction de la fonction respiratoire chez les patients BPCO, nous avons exploré son implication dans les remaniements épithéliaux dans un contexte pathologique et non-pathologique.

L'influence du SNP $\alpha 5$ sur le remodelage épithélial a été évaluée *ex vivo* par immunomarquages sur des tissus pulmonaires FFPE de patients non-BPCO et BPCO. Pour commencer, nous avons confirmé l'expression des transcrits du gène *CHRNA5* dans l'épithélium bronchique pulmonaire de ces patients par hybridation *in situ*. Ensuite, plusieurs paramètres ont été évalués : (i) le remodelage épithélial par calcul du pourcentage de métaplasie malpighienne, hyperplasie des cellules basales et hyperplasie des cellules caliciformes, (ii) l'index de prolifération, (iii) le nombre de cellules sécrétant Muc5ac, Muc5b et utéroglobine, (iv) et pour finir le nombre de cellules multiciliées. Aucune différence n'a été observée concernant le remodelage épithélial, l'index de prolifération et les quantités de mucines et d'utéroglobine. Le nombre de cellules multiciliées était significativement diminué chez les patients non-BPCO SNP $\alpha 5$ comparé aux patients non-BPCO WT $\alpha 5$. En revanche, aucune différence n'a été observée dans le groupe BPCO ni entre les deux groupes. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le SNP $\alpha 5$ influence uniquement le processus de ciliogenèse dans l'épithélium bronchique indépendamment de la pathologie.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

En utilisant le modèle *in vitro* de cultures en IAL à partir de cellules isolées de polypes nasaux, nous avons récupéré les surnageants apicaux et basaux à un stade précoce (IAL 7) ainsi que les cellules tout au long du processus de différenciation dans le but de comprendre les phénomènes observés *ex vivo*. L'étude des transcrits a montré qu'en présence du SNP α 5, l'expression des gènes *FOXJ1*, *CK5*, *MUC5AC* et *MUC5B* (marqueurs généraux des populations ciliées, basales et sécrétrices de mucus) est significativement diminuée suggérant une altération de la différenciation cellulaire. Les études immunohistochimiques ont mis en évidence un retard significatif de la ciliogenèse au cours de la différenciation renforçant les études obtenues *ex vivo* ainsi qu'une augmentation non significative de l'expression des cellules basales. Enfin, une diminution globale de l'expression de cytokines et chimiokines inflammatoires (GR0 α , sICAM-1, IFN- γ , IL-1ra/1 α /1 β /2/4/5/6/10/17/17E/32 α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIF, RANTES, SDF-1) a été dosée évoquant une dérégulation de la réponse inflammatoire au cours d'une réparation tissulaire.

Pour finir, la répartition du SNP α 5 dans une population non-BPCO et BPCO a été évaluée par génotypage de culots cellulaires issus de fibroscopies bronchiques (n=48). Les données obtenues indiquent que le polymorphisme est exprimé dans la population globale avec une présence augmentée chez les patients BPCO (76,19% contre 44,44% chez les non-BPCO) confirmant l'association entre le SNP α 5 et l'incidence de la pathologie comme observé dans la cohorte de l'*UK BioBank* bien plus importante (9270 patients) (Hopkins et al., 2021). L'association entre les données cliniques des patients et leur génotype a été étudiée. L'analyse a mis en évidence une implication du SNP α 5 dans l'augmentation de neutrophiles, éosinophiles et fibrinogène sanguins et de l'emphysème chez les patients non-BPCO en comparaison des WT α 5 tandis que la fonction respiratoire est augmentée chez les patients BPCO exprimant le SNP α 5 en comparaison des WT α 5. Sur la globalité de la cohorte, le SNP α 5 est lié à la diminution de la fonction respiratoire et à l'augmentation de l'emphysème et du taux de neutrophiles, éosinophiles et fibrinogène sanguins, indépendamment du statut pathologique. Ces données mises en relation avec les résultats précédemment obtenus (diminution de la ciliogenèse et altération de la différenciation cellulaire) suggèrent une implication du SNP α 5 en amont de l'apparition de la pathologie. Rs16969968 favoriserait la mise en place d'un remodelage épithélial et l'altération de la réponse immunitaire à l'origine du développement de la BPCO pour une sous-population de patients sans pour autant en exacerber le phénotype.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Notre étude pionnière a répertorié les sous-unités des nAChRs exprimées dans le poumon et a mis en évidence leur expression différentielle dans les compartiments non-épithéliaux et épithéliaux. Nous apportons ici les premiers indices liant l'association génétique du SNP α 5 avec les manifestations biologiques de la BPCO caractérisés ici par une diminution de la ciliogenèse *in vitro* et *ex vivo* et une altération de la différenciation épithéliale *in vitro*.

2. Perspectives expérimentales

Les résultats obtenus jusqu'à présent sont originaux et cruciaux pour explorer l'implication de polymorphismes dans la genèse et le développement de la BPCO. Ils nous ont permis d'une part de mettre en lumière l'expression des sous-unités des nAChRs dans le poumon d'un point de vue transcriptomique et protéomique et d'autre part de déchiffrer certaines propriétés du SNP α 5 dans l'homéostasie pulmonaire et la BPCO. Toutefois, de nombreuses caractéristiques et fonctions physiologiques restent à définir et à explorer.

L'analyse transcriptomique des nAChRs dans les LAEC n'a été réalisée que sur 10 patients, une cohorte assez faible comparée aux études réalisées dans le poumon et les SAEC (153 et 135 patients respectivement) en témoigne l'absence de différence significative dans l'expression des transcrits entre les sujets fumeurs et non-fumeurs. Effectuer ces analyses sur un nombre de patients plus conséquent permettra d'établir ces différences et de confirmer les résultats obtenus.

Les données de l'expression des nAChRs ont été obtenues à partir de matériels pulmonaires issus de patients ne présentant pas de pathologies respiratoires. Compte tenu de l'implication de ces récepteurs dans la promotion et la persistance des maladies pulmonaires tels que la BPCO ou le cancer du poumon (Friedman et al., 2019; Yang et al., 2015), il semble primordial de réaliser les mêmes analyses sur des patients BPCO dans le but de déceler de potentiels divergences dans l'expression des sous-unités codants les nAChRs aussi bien dans les niveaux transcriptomiques que dans la localisation protéique. Nos expérimentations n'ont pas permis de mettre en évidence un lien entre l'expression du SNP α 5 et les remaniements épithéliaux bronchiques, élargir les analyses sur les SAEC permettra de déceler la relation entre le polymorphisme et le remodelage bronchiolaire étant donné que les SAEC sont également affectées dans un contexte BPCO (inflammation, fibrose pulmonaire) (Barnes, 2019; Santus et al., 2020).

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Au cours de notre travail, nous avons étudié l'expression des sous-unités individuellement. L'identification des pentamères exprimés dans les voies aériennes pulmonaires sera nécessaire afin de comprendre les processus physiologiques engendrés par leur activation en raison des différences fonctionnelles observées en fonction de la composition du récepteur (Chen et al., 2018; Ton et al., 2015). En effet, leur composition (homo ou hétéropentamères, types de sous-unité, présence ou non d'une sous-unité accessoire, etc.) influe sur l'efficacité des flux ioniques, l'affinité pour le ligand et la période de désensibilisation qui déterminent les processus cellulaires sous-jacents (Arias and Blanton, 2000; Giniatullin et al., 2005). Une relation entre les pentamères et les différents mécanismes biologiques pulmonaires (différenciation cellulaire, sécrétion de mucus, prolifération, etc.) pourrait potentiellement être établie. Ces études complémenteraient les résultats obtenus jusqu'à présent et représenteraient la première analyse approfondie décrivant les pentamères des nAChRs exprimés dans les voies aériennes pulmonaires.

En ce qui concerne le polymorphisme, il a été associé à un retard de la ciliogenèse *in vitro* et *ex vivo*. La confirmation de ces résultats sur une cohorte de polypes nasaux plus large est envisagée tandis que les analyses seront étendues sur les cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires. Etant donné le rôle de la nicotine dans la progression de pathologies pulmonaires via la stimulation de la sous-unité $\alpha 5$ (Chen et al., 2020; Sun et al., 2017), le traitement des cellules à la nicotine en IAL constitue une autre approche expérimentale à explorer dans le but de déterminer l'influence de cet agoniste *in vitro* sur l'intégrité de la barrière épithéliale et le processus de différenciation cellulaire en présence ou non du variant génétique.

Nos expérimentations ont montré que l'expression du polymorphisme rs16969968 est associée à une diminution de l'expression des cytokines par les cellules basales au début de la différenciation cellulaire. Ainsi, un test de cicatrice cellulaire par *wound healing assay* fournirait des informations sur le processus de réparation et préciserait davantage l'influence du contexte inflammatoire sur ce mécanisme indispensable au rétablissement de l'homéostasie pulmonaire. L'étude du profil inflammatoire au cours de la différenciation et à la fin de ce processus nous renseignerait également sur le maintien de ce profil. Le recrutement des cellules inflammatoires ainsi que le profil cytokinique associé au SNP $\alpha 5$ restent à déterminer. Il sera également nécessaire de réaliser une analyse comparative des signatures immunes des patients non-BPCO et BPCO en fonction du génotype.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Enfin, nous savons que l'ajout de la sous-unité $\alpha 5$ sous forme sauvage ou mutée au sein des récepteurs $(\alpha 3\beta 4)_2$ ou $(\alpha 4\beta 2)_2$ modifie la perméabilité calcique (George et al., 2012; Scholze and Huck, 2020). Une des approches à mettre en place est l'établissement de la relation entre l'expression du gène *CHRNA5* sous forme sauvage ou mutée et les flux calciques entrants dans les cellules *in vitro* après stimulation des récepteurs par l'ACh. En outre, une stimulation par la nicotine et d'autres agonistes et antagonistes des récepteurs pourra également être envisagée pour mettre en évidence une stimulation et donc une réponse différentielle des récepteurs en fonction du ligand. De façon plus large, l'analyse mécanistique moléculaire est à considérer afin de définir des informations supplémentaires sur les processus moléculaires enclenchés par les nAChRs et leurs ligands dans les poumons.

A long terme, si l'altération de la perméabilité calcique des nAChRs par le SNP $\alpha 5$ est avérée dans les voies aériennes pulmonaires et également associée à un défaut dans la différenciation cellulaire et le remodelage épithélial précurseurs de la BPCO, une correction de l'effet de la sous-unité $\alpha 5$ exprimant ce variant peut être proposée par l'intermédiaire de modulateurs allostériques positifs comme cela a été exploré pour certaines sous-unités (Chatzidaki and Millar, 2015; Pandya and Yakel, 2011). Cela permettrait de développer des thérapies ciblées dans le traitement de cette pathologie particulièrement grave pour optimiser la prise en charge de la sous-population de patients BPCO présentant le rs16969968.

3. Conclusion

Nous avons apporté la première étude exhaustive de l'expression des sous-unités des nAChRs dans les tissus épithéliaux et non-épithéliaux pulmonaires et avons mis en évidence une expression différentielle entre les sujets non-fumeurs/fumeurs et les différents compartiments tissulaires. Elargir les analyses sur les nAChRs complétera l'atlas que nous avons réalisé et fournira de plus amples informations sur le rôle de ces récepteurs dans les voies aériennes. Concernant le SNP $\alpha 5$, il a été identifié dans des populations non-BPCO et BPCO et corrélé à différents symptômes respiratoires de la BPCO. Pour la première fois, le lien entre l'association génétique et des observations cellulaires et moléculaires a été établi au sein de l'épithélium bronchique. Des études complémentaires visant la caractérisation de l'influence du SNP $\alpha 5$ sur les manifestations biologiques de la BPCO à l'échelle du poumon entier permettront de déterminer la place de rs16969968 dans le diagnostic, le pronostic et l'établissement d'une thérapeutique innovante.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., and Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9, 1869.
2. Adam, D., Perotin, J.-M., Lebargy, F., Birembaut, P., Deslée, G., and Coraux, C. (2014). Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Revue des Maladies Respiratoires* 31, 300–311.
3. Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89, 73–120.
4. Aldonyte, R., Bagdonas, E., Raudoniute, J., and Bruzauskaite, I. (2015). Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *COPD* 995.
5. Allie, S.R., Bradley, J.E., Mudunuru, U., Schultz, M.D., Graf, B.A., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2019). The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nat Immunol* 20, 97–108.
6. Alwis, K.U., deCastro, B.R., Morrow, J.C., and Blount, B.C. (2015). Acrolein Exposure in U.S. Tobacco Smokers and Non-Tobacco Users: NHANES 2005–2006. *Environmental Health Perspectives* 123, 1302–1308.
7. American Thoracic Society and European Respiratory Society (2003). American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 818–900.
8. Amos, C.I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I.P., Gu, J., Eisen, T., Dong, Q., Zhang, Q., Gu, X., Vijayakrishnan, J., et al. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40, 616–622.
9. Antonangeli, F., Soriani, A., Cerboni, C., Sciumè, G., and Santoni, A. (2017). How Mucosal Epithelia Deal with Stress: Role of NKG2D/NKG2D Ligands during Inflammation. *Front Immunol* 8, 1583.
10. Antunes, M.B., and Cohen, N.A. (2007). Mucociliary clearance – a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* 7, 5–10.
11. Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L.B., and Christensen, S.T. (2019). Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 199–219.
12. Ardain, A., Marakalala, M.J., and Leslie, A. (2020). Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology* 159, 245–256.
13. Arias, H.R., and Blanton, M.P. (2000). Alpha-conotoxins. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 1017–1028.
14. Auerbach, A. (2015). Agonist activation of a nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* 96, 150–156.
15. Ayars, G.H., Altman, L.C., Gleich, G.J., Loegering, D.A., and Baker, C.B. (1985). Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J Allergy Clin Immunol* 76, 595–604.

- 16.** Bacher, I., Wu, B., Shytle, D.R., and George, T.P. (2009). Mecamylamine – a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* *10*, 2709–2721.
- 17.** Balmes, J., Becklake, M., Blanc, P., Henneberger, P., Kreiss, K., Mapp, C., Milton, D., Schwartz, D., Toren, K., Viegi, G., et al. (2003). American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* *167*, 787–797.
- 18.** Barnes, P.J. (2000). Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* *343*, 269–280.
- 19.** Barnes, P.J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *138*, 16–27.
- 20.** Barnes, P.J. (2019). Small airway fibrosis in COPD. *Int J Biochem Cell Biol* *116*, 105598.
- 21.** Barnes, P.J. (2020). Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biology* *33*, 101544.
- 22.** Barnes, P.J., Burney, P.G.J., Silverman, E.K., Celli, B.R., Vestbo, J., Wedzicha, J.A., and Wouters, E.F.M. (2015). Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers* *1*, 15076.
- 23.** Bekkat-Berkani, R., Wilkinson, T., Buchy, P., Dos Santos, G., Stefanidis, D., Devaster, J.-M., and Meyer, N. (2017). Seasonal influenza vaccination in patients with COPD: a systematic literature review. *BMC Pulm Med* *17*, 79.
- 24.** Benoun, J.M., Peres, N.G., Wang, N., Pham, O.H., Rudisill, V.L., Fogassy, Z.N., Whitney, P.G., Fernandez-Ruiz, D., Gebhardt, T., Pham, Q.-M., et al. (2018). Optimal protection against Salmonella infection requires noncirculating memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, 10416–10421.
- 25.** Berrettini, W.H., and Doyle, G.A. (2012). The CHRNA5–A3–B4 gene cluster in nicotine addiction. *Mol Psychiatry* *17*, 856–866.
- 26.** Bertrand, D., and Terry, A.V. (2018). The wonderland of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* *151*, 214–225.
- 27.** Bettencourt-Dias, M., Hildebrandt, F., Pellman, D., Woods, G., and Godinho, S.A. (2011). Centrosomes and cilia in human disease. *Trends in Genetics* *27*, 307–315.
- 28.** Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* *40*, 845–859.
- 29.** Bierut, L.J., Stitzel, J.A., Wang, J.C., Hinrichs, A.L., Gruzca, R.A., Xuei, X., Saccone, N.L., Saccone, S.F., Bertelsen, S., Fox, L., et al. (2008). Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* *165*, 1163–1171.
- 30.** Billington, C.K., and Penn, R.B. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res* *4*, 2.
- 31.** Blackwell, T.S., Hipps, A.N., Yamamoto, Y., Han, W., Barham, W.J., Ostrowski, M.C., Yull, F.E., and Prince, L.S. (2011). NF- κ B signaling in fetal lung macrophages disrupts airway morphogenesis. *J Immunol* *187*, 2740–2747.
- 32.** Borriello, F., Granata, F., and Marone, G. (2014). Basophils and skin disorders. *J Invest Dermatol* *134*, 1202–1210.

- 33.** Bosmann, M., and Ward, P.A. (2013). Modulation of inflammation by interleukin-27. *Journal of Leukocyte Biology* *94*, 1159–1165.
- 34.** Boudreau, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1996). Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *93*, 3509–3513.
- 35.** 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.
- 36.** Brody, S.L., Yan, X.H., Wuerffel, M.K., Song, S.K., and Shapiro, S.D. (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* *23*, 45–51.
- 37.** Brusselle, G.G., Joos, G.F., and Bracke, K.R. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* *378*, 1015–1026.
- 38.** Bühring, H.-J., Streble, A., and Valent, P. (2004). The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* *133*, 317–329.
- 39.** Bui, K.-L., Mathur, S., Dechman, G., Maltais, F., Camp, P., and Saey, D. (2019). Fixed Handheld Dynamometry Provides Reliable and Valid Values for Quadriceps Isometric Strength in People With Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Multicenter Study. *Physical Therapy* *99*, 1255–1267.
- 40.** Burgen, A.S.V. (1995). The background of the muscarinic system. *Life Sciences* *56*, 801–806.
- 41.** Bustamante-Marin, X.M., and Ostrowski, L.E. (2017). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*, a028241.
- 42.** Button, B., Okada, S.F., Frederick, C.B., Thelin, W.R., and Boucher, R.C. (2013). Mechanosensitive ATP Release Maintains Proper Mucus Hydration of Airways. *Science Signaling* *6*, ra46–ra46.
- 43.** Byers, D.E., and Holtzman, M.J. (2011). Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest* *140*, 768–774.
- 44.** Calik-Kutukcu, E., Arıkan, H., Sağlam, M., Vardar-Yagli, N., Oksuz, C., Inal-Ince, D., Savci, S., Duger, T., and Coplu, L. (2017). Arm strength training improves activities of daily living and occupational performance in patients with COPD: Activities of daily living in COPD. *Clin Respir J* *11*, 820–832.
- 45.** 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.
- 46.** Caramori, G., Casolari, P., Barczyk, A., Durham, A.L., Di Stefano, A., and Adcock, I. (2016). COPD immunopathology. *Semin Immunopathol* *38*, 497–515.
- 47.** Cazzola, M., and Molimard, M. (2010). The scientific rationale for combining long-acting β 2-agonists and muscarinic antagonists in COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* *23*, 257–267.

48. Cazzola, M., Page, C.P., Calzetta, L., and Matera, M.G. (2012). Pharmacology and Therapeutics of Bronchodilators. *Pharmacol Rev* 64, 450–504.
49. Cecchini, M., and Changeux, J.-P. (2015). The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation. *Neuropharmacology* 96, 137–149.
50. Chairakaki, A.-D., Saridaki, M.-I., Pyrillou, K., Mouratis, M.-A., Koltsida, O., Walton, R.P., Bartlett, N.W., Stavropoulos, A., Boon, L., Rovina, N., et al. (2018). Plasmacytoid dendritic cells drive acute asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 142, 542-556.e12.
51. Changeux, J.P., and Edelstein, S.J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21, 959–980.
52. Chatzidaki, A., and Millar, N.S. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* 97, 408–417.
53. Chen, D.-J., Gao, F.-F., Ma, X.-K., Shi, G.-G., Huang, Y.-B., Su, Q.-X., Sudweeks, S., Gao, M., Dharshaun, T., Eaton, J.B., et al. (2018). Pharmacological and functional comparisons of $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ -nAChRs and $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs heterologously expressed in the human epithelial SH-EP1 cell line. *Acta Pharmacol Sin* 39, 1571–1581.
54. Chen, R., Li, X., Guan, L., Guo, B.-P., Wu, W., Zhou, Z., Huo, Y., Chen, X., and Zhou, L. (2016). Effectiveness of neuromuscular electrical stimulation for the rehabilitation of moderate-to-severe COPD: a meta-analysis. *COPD Volume 11*, 2965–2975.
55. Chen, X., Jia, Y., Zhang, Y., Zhou, D., Sun, H., and Ma, X. (2020). $\alpha 5$ -nAChR contributes to epithelial-mesenchymal transition and metastasis by regulating Jab1/Csn5 signalling in lung cancer. *J Cell Mol Med* 24, 2497–2506.
56. Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y.-H., Ho, Y.-S., DeSouza, M.M., and Wu, R. (2003). Stimulation of Airway Mucin Gene Expression by Interleukin (IL)-17 through IL-6 Paracrine/Autocrine Loop. *Journal of Biological Chemistry* 278, 17036–17043.
57. Cheng, P., Li, S., and Chen, H. (2021). Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. *Cells* 10.
58. Cheng, W.-L., Chen, K.-Y., Lee, K.-Y., Feng, P.-H., and Wu, S.-M. (2020). Nicotinic-nAChR signaling mediates drug resistance in lung cancer. *J Cancer* 11, 1125–1140.
59. Cherian, S.V., Kumar, A., and Estrada-Y-Martin, R.M. (2020). E-Cigarette or Vaping Product-Associated Lung Injury: A Review. *The American Journal of Medicine* 133, 657–663.
60. Chernyavsky, A.I., Shchepotin, I.B., and Grando, S.A. (2015). Mechanisms of growth-promoting and tumor-protecting effects of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. *International Immunopharmacology* 29, 36–44.
61. Cherrier, M. (2014). Les cellules lymphoïdes innées: De nouveaux acteurs de la réponse immune mucoale. *Med Sci (Paris)* 30, 280–288.
62. Chiappinelli, V.A., and Lee, J.C. (1985). kappa-Bungarotoxin. Self-association of a neuronal nicotinic receptor probe. *Journal of Biological Chemistry* 260, 6182–6186.
63. Chinoy, M.R. (2003). Lung growth and development. *Front Biosci* 8, d392-415.
64. Christopoulos, A., Lanzafame, A., and Mitchelson, F. (1998). ALLOSTERIC INTERACTIONS AT MUSCARINIC CHOLINOCEPTORS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25, 185–194.

- 65.** Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* *154*, 3–20.
- 66.** Condon, T.V., Sawyer, R.T., Fenton, M.J., and Riches, D.W.H. (2011). Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *Journal of Leukocyte Biology* *90*, 883–895.
- 67.** Cong, J., and Wei, H. (2019). Natural Killer Cells in the Lungs. *Front. Immunol.* *10*, 1416.
- 68.** Cook, P.C., and MacDonald, A.S. (2016). Dendritic cells in lung immunopathology. *Semin Immunopathol* *38*, 449–460.
- 69.** Cooper, G.E., Ostridge, K., Khakoo, S.I., Wilkinson, T.M.A., and Staples, K.J. (2018). Human CD49a+ Lung Natural Killer Cell Cytotoxicity in Response to Influenza A Virus. *Front Immunol* *9*, 1671.
- 70.** Corringer, P.-J., Novère, N.L., and Changeux, J.-P. (2000). Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *40*, 431–458.
- 71.** Cosio, M.G., and Saetta, M. (2012). Evasion of COPD in smokers: at what price? *Eur Respir J* *39*, 1298–1303.
- 72.** Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.-M., Hernandez, M.-C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., and Ballivet, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron* *5*, 847–856.
- 73.** Crooks, P.A., Bardo, M.T., and Dwoskin, L.P. (2014). Nicotinic receptor antagonists as treatments for nicotine abuse. *Adv Pharmacol* *69*, 513–551.
- 74.** Cui, K., Ge, X., and Ma, H. (2014). Four SNPs in the CHRNA3/5 Alpha-Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Locus Are Associated with COPD Risk Based on Meta-Analyses. *PLoS ONE* *9*, e102324.
- 75.** Culley, F.J. (2009). Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* *128*, 151–163.
- 76.** Cutz, E., Yeger, H., Pan, J., and Ito, T. (2008). Pulmonary Neuroendocrine Cell System in Health and Disease. *CRMR* *4*, 174–186.
- 77.** Cutz, E., Pan, J., Yeger, H., Domnik, N.J., and Fisher, J.T. (2013). Recent advances and controversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *24*, 40–50.
- 78.** Dale, H.H., and Dudley, H.W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J Physiol* *68*, 97–123.
- 79.** Danahay, H., Pessotti, A.D., Coote, J., Montgomery, B.E., Xia, D., Wilson, A., Yang, H., Wang, Z., Bevan, L., Thomas, C., et al. (2015). Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep* *10*, 239–252.
- 80.** Dani, J.A. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol* *124*, 3–19.
- 81.** Darvesh, S., Hopkins, D.A., and Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* *4*, 131–138.

- 82.** Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C.K., and Roy, S. (2015). Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol* *185*, 2596–2606.
- 83.** Dash, B., Li, M.D., and Lukas, R.J. (2014). Roles for N-terminal Extracellular Domains of Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) $\beta 3$ Subunits in Enhanced Functional Expression of Mouse $\alpha 6\beta 2\beta 3$ - and $\alpha 6\beta 4\beta 3$ -nAChRs. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 28338–28351.
- 84.** Davoine, F., and Lacy, P. (2014). Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol* *5*, 570.
- 85.** Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., and Arneric, S.P. (1995). Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Lessons from behavior and implications for cns therapeutics. *Life Sciences* *56*, 545–570.
- 86.** DeMeo, D.L., Sandhaus, R.A., Barker, A.F., Brantly, M.L., Eden, E., McElvaney, N.G., Rennard, S., Burchard, E., Stocks, J.M., Stoller, J.K., et al. (2007). Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax* *62*, 806–813.
- 87.** Dennis, M., Giraudat, J., Kotzyba-Hibert, F., Goeldner, M., Hirth, C., Chang, J.Y., Lazure, C., Chrétien, M., and Changeux, J.P. (1988). Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry* *27*, 2346–2357.
- 88.** Deprez, M., Zaragosi, L.-E., Truchi, M., Becavin, C., Ruiz García, S., Arguel, M.-J., Plaisant, M., Magnone, V., Lebrigand, K., Abelanet, S., et al. (2020). A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med* *202*, 1636–1645.
- 89.** Didon, L., Zwick, R.K., Chao, I.W., Walters, M.S., Wang, R., Hackett, N.R., and Crystal, R.G. (2013). RFX3 Modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir Res* *14*, 70.
- 90.** Dobbs, L.G., and Johnson, M.D. (2007). Alveolar epithelial transport in the adult lung. *Respiratory Physiology & Neurobiology* *159*, 283–300.
- 91.** Duga, S., Soldà, G., Asselta, R., Bonati, M.T., Dalprà, L., Malcovati, M., and Tenchini, M.L. (2001). Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms. *J Hum Genet* *46*, 640–648.
- 92.** Eglen, R.M. (2005). Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* *43*, 105–136.
- 93.** Eglen, R.M. (2006). Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonom & Auta Pharm* *26*, 219–233.
- 94.** Enright, P.L. (2003). The six-minute walk test. *Respir Care* *48*, 783–785.
- 95.** Evans, M.J., and Plopper, C.G. (1988). The Role of Basal Cells in Adhesion of Columnar Epithelium to Airway Basement Membrane. *Am Rev Respir Dis* *138*, 481–483.
- 96.** Fahy, J.V., and Dickey, B.F. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med* *363*, 2233–2247.
- 97.** Feghali-Bostwick, C.A., Gadgil, A.S., Otterbein, L.E., Pilewski, J.M., Stoner, M.W., Csizmadia, E., Zhang, Y., Scirba, F.C., and Duncan, S.R. (2008). Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* *177*, 156–163.

- 98.** Fernandes-Silva, H., Correia-Pinto, J., and Moura, R.S. (2017). Canonical Sonic Hedgehog Signaling in Early Lung Development. *J Dev Biol* 5.
- 99.** Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3, 944–950.
- 100.** Finch, D., Lange, P., Halpin, D., O'Donnell, D., and MacNee, W. (2016). Diagnosis, assessment, and phenotyping of COPD: beyond FEV1. *COPD* 3.
- 101.** Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., and Urban, J.F. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* 201, 139–155.
- 102.** Fischer, B., Voynow, J., and Ghio, A. (2015). COPD: balancing oxidants and antioxidants. *COPD* 261.
- 103.** Fleisher, C., and McGough, J. (2014). Sofinicline: a novel nicotinic acetylcholine receptor agonist in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23, 1157–1163.
- 104.** Friedman, J.R., Richbart, S.D., Merritt, J.C., Brown, K.C., Nolan, N.A., Akers, A.T., Lau, J.K., Robateau, Z.R., Miles, S.L., and Dasgupta, P. (2019). Acetylcholine signaling system in progression of lung cancers. *Pharmacol Ther* 194, 222–254.
- 105.** Frigas, E., Motojima, S., and Gleich, G.J. (1991). The eosinophilic injury to the mucosa of the airways in the pathogenesis of bronchial asthma. *Eur Respir J Suppl* 13, 123s–135s.
- 106.** Frith, P.A. (2020). Detecting COPD using micro-spirometry and/or questionnaire. *Respirology* 25, 126–127.
- 107.** Fujii, T., and Kawashima, K. (2000). Ca²⁺ oscillation and c-fos gene expression induced via muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362, 14–21.
- 108.** Fujii, T., Takada-Takatori, Y., Horiguchi, K., and Kawashima, K. (2012). Mediatophore regulates acetylcholine release from T cells. *Journal of Neuroimmunology* 244, 16–22.
- 109.** Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., and Kawashima, K. (2017). Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front. Immunol.* 8, 1085.
- 110.** Fujii, Y.X., Tashiro, A., Arimoto, K., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Fujii, T., Matsui, M., Kasahara, T., and Kawashima, K. (2007). Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 188, 80–85.
- 111.** Gabrielsen, M.E., Romundstad, P., Langhammer, A., Krokan, H.E., and Skorpen, F. (2013). Association between a 15q25 gene variant, nicotine-related habits, lung cancer and COPD among 56,307 individuals from the HUNT study in Norway. *Eur J Hum Genet* 21, 1293–1299.
- 112.** Galzi, J. -I., and Changeux, J. -P. (1995). Neuronal nicotinic receptors: Molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34, 563–582.
- 113.** Gao, G.F., Rao, Z., and Bell, J.I. (2002). Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol* 23, 408–413.

- 114.** Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.
- 115.** George, L., and Brightling, C.E. (2016). Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis* 7, 34–51.
- 116.** George, A.A., Lucero, L.M., Damaj, M.I., Lukas, R.J., Chen, X., and Whiteaker, P. (2012). Function of human $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors is reduced by the $\alpha 5$ (D398N) variant. *J Biol Chem* 287, 25151–25162.
- 117.** Ghosh, A., Boucher, R.C., and Tarran, R. (2015). Airway hydration and COPD. *Cell Mol Life Sci* 72, 3637–3652.
- 118.** Giacalone, V.D., Margaroli, C., Mall, M.A., and Tirouvanziam, R. (2020). Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci* 21.
- 119.** Gimeno-Santos, E., Rodriguez, D.A., Barberan-Garcia, A., Blanco, I., Vilaró, J., Torralba, Y., Rodriguez-Roisin, R., Barberà, J.A., Roca, J., and Garcia-Aymerich, J. (2014). Endurance Exercise Training Improves Heart Rate Recovery in Patients with COPD. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 11, 190–196.
- 120.** Giniatullin, R., Nistri, A., and Yakel, J. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends in Neurosciences* 28, 371–378.
- 121.** 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.
- 122.** González-Mariscal, L., Domínguez-Calderón, A., Raya-Sandino, A., Ortega-Olvera, J.M., Vargas-Sierra, O., and Martínez-Revollar, G. (2014). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 36, 213–223.
- 123.** Gosselink, R., De Vos, J., van den Heuvel, S.P., Segers, J., Decramer, M., and Kwakkel, G. (2011). Impact of inspiratory muscle training in patients with COPD: what is the evidence? *European Respiratory Journal* 37, 416–425.
- 124.** Gotti, C., Fornasari, D., and Clementi, F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Progress in Neurobiology* 53, 199–237.
- 125.** Grainge, C.L., and Davies, D.E. (2013). Epithelial Injury and Repair in Airways Diseases. *Chest* 144, 1906–1912.
- 126.** Grando, S.A., Kawashima, K., Kirkpatrick, C.J., Kummer, W., and Wessler, I. (2015). Recent progress in revealing the biological and medical significance of the non-neuronal cholinergic system. *International Immunopharmacology* 29, 1–7.
- 127.** Grassi, F., and Fucile, S. (2020). Calcium influx through muscle nAChR-channels: One route, multiple roles. *Neuroscience* 439, 117–124.
- 128.** Green, M., and Moxham, J. (1985). The Respiratory Muscles. *Clinical Science* 68, 1–10.
- 129.** Greene, C.M., Marciniak, S.J., Teckman, J., Ferrarotti, I., Brantly, M.L., Lomas, D.A., Stoller, J.K., and McElvaney, N.G. (2016). $\alpha 1$ -Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16051.

- 130.** Gren, S.T., and Grip, O. (2016). Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: *Inflammatory Bowel Diseases* 22, 1992–1998.
- 131.** Williams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 210, 1977–1992.
- 132.** 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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 2568–2573.
- 133.** Gunduz, I., Kondylis, A., Jaccard, G., Renaud, J.-M., Hofer, R., Ruffieux, L., and Gadani, F. (2016). Tobacco-specific N-nitrosamines NNN and NNK levels in cigarette brands between 2000 and 2014. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 76, 113–120.
- 134.** Gut-Gobert, C., Cavallès, A., Dixmier, A., Guillot, S., Jouneau, S., Leroyer, C., Marchand-Adam, S., Marquette, D., Meurice, J.-C., Desvigne, N., et al. (2019). Women and COPD: do we need more evidence? *Eur Respir Rev* 28, 180055.
- 135.** Hackett, B.P., Brody, S.L., Liang, M., Zeitz, I.D., Bruns, L.A., and Gitlin, J.D. (1995). Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 4249–4253.
- 136.** Hannan, S., Mortensen, M., and Smart, T.G. (2015). Snake neurotoxin α -bungarotoxin is an antagonist at native GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 93, 28–40.
- 137.** Hansel, N.N., McCormack, M.C., and Kim, V. (2016). The Effects of Air Pollution and Temperature on COPD. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 13, 372–379.
- 138.** Hardin, M., Zielinski, J., Wan, E.S., Hersh, C.P., Castaldi, P.J., Schwinder, E., Hawrylkiewicz, I., Sliwinski, P., Cho, M.H., and Silverman, E.K. (2012). CHRNA3/5, IREB2, and ADCY2 are associated with severe chronic obstructive pulmonary disease in Poland. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 203–208.
- 139.** Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 660–669.
- 140.** Hawkins, F.J., and Kotton, D.N. (2018). Pulmonary Ionocytes Challenge the Paradigm in Cystic Fibrosis. *Trends in Pharmacological Sciences* 39, 852–854.
- 141.** Heijink, I.H., Kuchibhotla, V.N.S., Roffel, M.P., Maes, T., Knight, D.A., Sayers, I., and Nawijn, M.C. (2020). Epithelial cell dysfunction, a major driver of asthma development. *Allergy* 75, 1902–1917.
- 142.** Hellings, P.W., and Steelant, B. (2020). Epithelial barriers in allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145, 1499–1509.
- 143.** Hemann, E.A., Green, R., Turnbull, J.B., Langlois, R.A., Savan, R., and Gale, M. (2019). Interferon- λ modulates dendritic cells to facilitate T cell immunity during infection with influenza A virus. *Nat Immunol* 20, 1035–1045.

- 144.** Henaou, M.P., and Craig, T.J. (2016). Recent advances in understanding and treating COPD related to α_1 -antitrypsin deficiency. *Expert Review of Respiratory Medicine* *10*, 1281–1294.
- 145.** Henry, T.S., Kligerman, S.J., Raptis, C.A., Mann, H., Sechrist, J.W., and Kanne, J.P. (2020). Imaging Findings of Vaping-Associated Lung Injury. *AJR Am J Roentgenol* *214*, 498–505.
- 146.** Herriges, M., and Morrisey, E.E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* *141*, 502–513.
- 147.** Hiemstra, P.S., McCray, P.B., and Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J* *45*, 1150–1162.
- 148.** Hikichi, M., Mizumura, K., Maruoka, S., and Gon, Y. (2019). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke. *J. Thorac. Dis.* *11*, S2129–S2140.
- 149.** Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N Engl J Med* *364*, 1533–1543.
- 150.** Hillas, G., Papaporfyriou, A., Dimakou, K., and Papaioannou, A.I. (2020). Pharmacological treatment of stable COPD: need for a simplified approach. *Postgraduate Medicine* *132*, 126–131.
- 151.** Hoenderdos, K., and Condliffe, A. (2013). The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* *48*, 531–539.
- 152.** Hoffman, E.A., Lynch, D.A., Barr, R.G., van Beek, E.J.R., Parraga, G., and IWPFI Investigators (2016). Pulmonary CT and MRI phenotypes that help explain chronic pulmonary obstruction disease pathophysiology and outcomes: CT and MRI of COPD. *J. Magn. Reson. Imaging* *43*, 544–557.
- 153.** Hogg, J.C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* *364*, 709–721.
- 154.** Hogg, J.C., and Timens, W. (2009). The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *4*, 435–459.
- 155.** Hooper, S.B., and Wallace, M.J. (2006). ROLE OF THE PHYSICOCHEMICAL ENVIRONMENT IN LUNG DEVELOPMENT. *Clin Exp Pharmacol Physiol* *33*, 273–279.
- 156.** Hopkins, R.J., Duan, F., Gamble, G.D., Chiles, C., Cavadino, A., Billings, P., Aberle, D., and Young, R.P. (2021). Chr15q25 genetic variant (rs16969968) independently confers risk of lung cancer, COPD and smoking intensity in a prospective study of high-risk smokers. *Thorax* *76*, 272–280.
- 157.** Hou, W., Hu, S., Li, C., Ma, H., Wang, Q., Meng, G., Guo, T., and Zhang, J. (2019). Cigarette Smoke Induced Lung Barrier Dysfunction, EMT, and Tissue Remodeling: A Possible Link between COPD and Lung Cancer. *BioMed Research International* *2019*, 1–10.
- 158.** Huangfu, D., and Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11325–11330.
- 159.** Huganir, R.L., and Greengardt, P. (1990). Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* *5*, 555–567.

- 160.** Hung, L.-Y., Sen, D., Oniskey, T.K., Katzen, J., Cohen, N.A., Vaughan, A.E., Nieves, W., Urisman, A., Beers, M.F., Krummel, M.F., et al. (2019). Macrophages promote epithelial proliferation following infectious and non-infectious lung injury through a Trefoil factor 2-dependent mechanism. *Mucosal Immunol* *12*, 64–76.
- 161.** Hung, R.J., McKay, J.D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., et al. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* *452*, 633–637.
- 162.** Hussain, M., Xu, C., Lu, M., Wu, X., Tang, L., and Wu, X. (2017). Wnt/ β -catenin signaling links embryonic lung development and asthmatic airway remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1863*, 3226–3242.
- 163.** Improgo, Ma.R., Soll, L.G., Tapper, A.R., and Gardner, P.D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. *Front. Physiol.* *4*.
- 164.** Invernizzi, R., Lloyd, C.M., and Molyneaux, P.L. (2020). Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology* *160*, 171–182.
- 165.** Ishizaka, T., De Bernardo, R., Tomioka, H., Lichtenstein, L.M., and Ishizaka, K. (1972). Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J Immunol* *108*, 1000–1008.
- 166.** James, S.L., Abate, D., Abate, K.H., Abay, S.M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., et al. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* *392*, 1789–1858.
- 167.** Janssen, R., Piscaer, I., Franssen, F.M.E., and Wouters, E.F.M. (2019). Emphysema: looking beyond alpha-1 antitrypsin deficiency. *Expert Review of Respiratory Medicine* *13*, 381–397.
- 168.** Jenne, C.N., Wong, C.H.Y., Zemp, F.J., McDonald, B., Rahman, M.M., Forsyth, P.A., McFadden, G., and Kubes, P. (2013). Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* *13*, 169–180.
- 169.** Jiang, S., Li, Y., Zhang, C., Zhao, Y., Bu, G., Xu, H., and Zhang, Y.-W. (2014). M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer’s disease. *Neurosci Bull* *30*, 295–307.
- 170.** Jones, R.L., Noble, P.B., Elliot, J.G., and James, A.L. (2016). Airway remodelling in COPD: It’s not asthma!: Airway remodelling in COPD. *Respirology* *21*, 1347–1356.
- 171.** Jouneau, S., Brinchault, G., and Desrues, B. (2014). Prise en charge des exacerbations : de la ville à l’hôpital. *La Presse Médicale* *43*, 1359–1367.
- 172.** Kaartinen, V., Voncken, J.W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* *11*, 415–421.
- 173.** Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., and Tzartos, S.J. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structure, function and pathogenicity. *FEBS Journal* *274*, 3799–3845.

- 174.** Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.R., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S., and Karlin, A. (1984). Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem* *259*, 11662–11665.
- 175.** Kesimer, M., Ford, A.A., Ceppe, A., Radicioni, G., Cao, R., Davis, C.W., Doerschuk, C.M., Alexis, N.E., Anderson, W.H., Henderson, A.G., et al. (2017). Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis. *N Engl J Med* *377*, 911–922.
- 176.** Kikkawa, M. (2013). Big steps toward understanding dynein. *Journal of Cell Biology* *202*, 15–23.
- 177.** Kim, T.S., Gorski, S.A., Hahn, S., Murphy, K.M., and Braciale, T.J. (2014). Distinct dendritic cell subsets dictate the fate decision between effector and memory CD8(+) T cell differentiation by a CD24-dependent mechanism. *Immunity* *40*, 400–413.
- 178.** Kirkham, P.A., and Barnes, P.J. (2013). Oxidative Stress in COPD. *Chest* *144*, 266–273.
- 179.** Knight, D.A., and Holgate, S.T. (2003). The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology* *8*, 432–446.
- 180.** Knudsen, L., and Ochs, M. (2018). The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* *150*, 661–676.
- 181.** Koarai, A., and Ichinose, M. (2018). Possible involvement of acetylcholine-mediated inflammation in airway diseases. *Allergology International* *67*, 460–466.
- 182.** Kojima, T., Go, M., Takano, K., Kurose, M., Ohkuni, T., Koizumi, J., Kamekura, R., Ogasawara, N., Masaki, T., Fuchimoto, J., et al. (2013). Regulation of Tight Junctions in Upper Airway Epithelium. *BioMed Research International* *2013*, 1–11.
- 183.** Konstantinou, E., Fotopoulou, F., Drosos, A., Dimakopoulou, N., Zagoriti, Z., Niarchos, A., Makrynioti, D., Kouretas, D., Farsalinos, K., Lagoumintzis, G., et al. (2018). Tobacco-specific nitrosamines: A literature review. *Food and Chemical Toxicology* *118*, 198–203.
- 184.** Korytina, G.F., Akhmadishina, L.Z., Viktorova, E.V., Kochetova, O.V., and Viktorova, T.V. (2016). IREB2, CHRNA5, CHRNA3, FAM13A & hedgehog interacting protein genes polymorphisms & risk of chronic obstructive pulmonary disease in Tatar population from Russia. *Indian J Med Res* *144*, 865–876.
- 185.** Kosentka, P., Sprague, S.L., Ryberg, M., Gartz, J., May, A.L., Campagna, S.R., and Matheny, P.B. (2013). Evolution of the Toxins Muscarine and Psilocybin in a Family of Mushroom-Forming Fungi. *PLoS ONE* *8*, e64646.
- 186.** Kotecha, S. (2000). Lung growth for beginners. *Paediatric Respiratory Reviews* *1*, 308–313.
- 187.** 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.
- 188.** Kummer, W., and Krasteva-Christ, G. (2014). Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Current Opinion in Pharmacology* *16*, 43–49.
- 189.** Kummer, W., Lips, K.S., and Pfeil, U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* *130*, 219–234.

- 190.** Kuryatov, A., Berrettini, W., and Lindstrom, J. (2011). Acetylcholine receptor (AChR) $\alpha 5$ subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ AChR function. *Mol Pharmacol* 79, 119–125.
- 191.** Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C., Kawashima, K., and Grando, S. (2007). The Non-neuronal Cholinergic System of Human Skin. *Horm Metab Res* 39, 125–135.
- 192.** Kusuda, R., Carreira, E.U., Ulloa, L., Cunha, F.Q., Kanashiro, A., and Cunha, T.M. (2020). Choline attenuates inflammatory hyperalgesia activating nitric oxide/cGMP/ATP-sensitive potassium channels pathway. *Brain Res* 1727, 146567.
- 193.** Lai, D., Tang, J., Chen, L., Fan, E.K., Scott, M.J., Li, Y., Billiar, T.R., Wilson, M.A., Fang, X., Shu, Q., et al. (2018). Group 2 innate lymphoid cells protect lung endothelial cells from pyroptosis in sepsis. *Cell Death Dis* 9, 369.
- 194.** Lam, D.C.-L., Luo, S.Y., Fu, K.-H., Lui, M.M.-S., Chan, K.-H., Wistuba, I.I., Gao, B., Tsao, S.-W., Ip, M.S.-M., and Minna, J.D. (2016). Nicotinic acetylcholine receptor expression in human airway correlates with lung function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310, L232-239.
- 195.** Lambrechts, D., Buyschaert, I., Zanen, P., Coolen, J., Lays, N., Cuppens, H., Groen, H.J.M., Dewever, W., van Klaveren, R.J., Verschakelen, J., et al. (2010). The 15q24/25 Susceptibility Variant for Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 181, 486–493.
- 196.** Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495–502.
- 197.** Lee, J.Y., Yoo, S.S., Kang, H.-G., Jin, G., Bae, E.Y., Choi, Y.Y., Choi, J.E., Jeon, H.-S., Lee, J., Lee, S.Y., et al. (2012). A functional polymorphism in the CHRNA3 gene and risk of chronic obstructive pulmonary disease in a Korean population. *J Korean Med Sci* 27, 1536–1540.
- 198.** LeMessurier, K.S., Tiwary, M., Morin, N.P., and Samarasinghe, A.E. (2020). Respiratory Barrier as a Safeguard and Regulator of Defense Against Influenza A Virus and Streptococcus pneumoniae. *Front. Immunol.* 11, 3.
- 199.** Lewin, G., and Hurtt, M.E. (2017). Pre- and Postnatal Lung Development: An Updated Species Comparison: Comparative Postnatal Lung Development. *Birth Defects Research* 109, 1519–1539.
- 200.** Li, H., Liu, Q., Jiang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., and Xiao, W. (2015). Disruption of th17/treg balance in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med Sci* 349, 392–397.
- 201.** Liu, Y., Lee, K., Perez-Padilla, R., Hudson, N.L., and Mannino, D.M. (2008). Outdoor and indoor air pollution and COPD-related diseases in high- and low-income countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 12, 115–127.
- 202.** Loering, S., Cameron, G.J.M., Starkey, M.R., and Hansbro, P.M. (2019). Lung development and emerging roles for type 2 immunity. *J Pathol* 247, 686–696.
- 203.** Luetje, C.W., Maddox, F.N., and Harvey, S.C. (1998). Glycosylation within the cysteine loop and six residues near conserved Cys192/Cys193 are determinants of neuronal bungarotoxin sensitivity on the neuronal nicotinic receptor alpha3 subunit. *Mol Pharmacol* 53, 1112–1119.

- 204.** Luijk, B., Lindemans, C.A., Kanters, D., van der Heijde, R., Bertics, P., Lammers, J.-W.J., Bates, M.-E., and Koenderman, L. (2005). Gradual increase in priming of human eosinophils during extravasation from peripheral blood to the airways in response to allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* *115*, 997–1003.
- 205.** Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le Novère, N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., et al. (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* *51*, 397–401.
- 206.** Lux, H., Baur, X., Budnik, L.T., Heutelbeck, A., Teixeira, J.P., Neumann, E., Adliene, D., Puišo, J., Lucas, D., Löndahl, J., et al. (2020). Outdoor air pollution from industrial chemicals causing new onset of asthma or COPD: a systematic review protocol. *J Occup Med Toxicol* *15*, 38.
- 207.** Ma, J., Rubin, B.K., and Voynow, J.A. (2018). Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest* *154*, 169–176.
- 208.** Man, W.D.-C., Soliman, M.G.G., Nikolettou, D., Harris, M.L., Rafferty, G.F., Mustafa, N., Polkey, M.I., and Moxham, J. (2003). Non-volitional assessment of skeletal muscle strength in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* *58*, 665–669.
- 209.** Man, W.H., de Steenhuijsen Piters, W.A.A., and Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* *15*, 259–270.
- 210.** Mannino, D.M., and Buist, A.S. (2007). Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet* *370*, 765–773.
- 211.** Maouche, K., Polette, M., Jolly, T., Medjber, K., Cloëz-Tayarani, I., Changeux, J.-P., Burlet, H., Terryn, C., Coraux, C., Zahm, J.-M., et al. (2009). $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulates Airway Epithelium Differentiation by Controlling Basal Cell Proliferation. *The American Journal of Pathology* *175*, 1868–1882.
- 212.** Mascaux, C., Angelova, M., Vasaturo, A., Beane, J., Hijazi, K., Anthoine, G., Buttard, B., Rothe, F., Willard-Gallo, K., Haller, A., et al. (2019). Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis. *Nature* *571*, 570–575.
- 213.** Mashimo, M., Iwasaki, Y., Inoue, S., Saito, S., Kawashima, K., and Fujii, T. (2017). Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca^{2+} , IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci* *172*, 13–18.
- 214.** Maskos, U. (2020). The nicotinic receptor alpha5 coding polymorphism rs16969968 as a major target in disease: Functional dissection and remaining challenges. *J. Neurochem.* *154*, 241–250.
- 215.** Mason, R.J. (2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology* *11*, S12–S15.
- 216.** Matthiesen, S., Bahulayan, A., Kempkens, S., Haag, S., Fuhrmann, M., Stichnote, C., Juergens, U.R., and Racké, K. (2006). Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* *35*, 621–627.
- 217.** Mei, Z., Tian, X., Chen, J., Wang, Y., Yao, Y., Li, X., Yang, C., Zhang, S., and Xie, C. (2018). $\alpha 7$ -nAChR agonist GTS-21 reduces radiation-induced lung injury. *Oncol Rep* *40*, 2287–2297.
- 218.** Michel, T., Poli, A., Cuapio, A., Briquemont, B., Iserentant, G., Ollert, M., and Zimmer, J. (2016). Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol* *196*, 2923–2931.

- 219.** 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* 231, 57–71.
- 220.** Mindt, B.C., Fritz, J.H., and Duerr, C.U. (2018). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Pulmonary Immunity and Tissue Homeostasis. *Front Immunol* 9, 840.
- 221.** Minetto, P., Guolo, F., Pesce, S., Greppi, M., Obino, V., Ferretti, E., Sivori, S., Genova, C., Lemoli, R.M., and Marcenaro, E. (2019). Harnessing NK Cells for Cancer Treatment. *Front Immunol* 10, 2836.
- 222.** Mohamed Hoesein, F.A.A., Wauters, E., Janssens, W., Groen, H.J.M., Smolonska, J., Wijmenga, C., Postma, D.S., Boezen, H.M., De Jong, P.A., Decramer, M., et al. (2013). Variants in the 15q24/25 locus associate with lung function decline in active smokers. *PLoS One* 8, e53219.
- 223.** Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86.
- 224.** Montalbano, A.M., Di Sano, C., Chiappara, G., Riccobono, L., Bonanno, A., Anzalone, G., Vitulo, P., Pipitone, L., Gjemarkaj, M., Pieper, M.P., et al. (2018). Cigarette smoke and non-neuronal cholinergic system in the airway epithelium of COPD patients. *J Cell Physiol* 233, 5856–5868.
- 225.** 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.
- 226.** Moqbel, R., Levi-Schaffer, F., and Kay, A.B. (1994). Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 94, 1183–1188.
- 227.** Moran, S.P., Maksymetz, J., and Conn, P.J. (2019). Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. *Trends Pharmacol Sci* 40, 1006–1020.
- 228.** Morias, Y., Abels, C., Laoui, D., Van Overmeire, E., Guilliams, M., Schoupe, E., Tacke, F., deVries, C.J., De Baetselier, P., and Beschin, A. (2015). Ly6C- Monocytes Regulate Parasite-Induced Liver Inflammation by Inducing the Differentiation of Pathogenic Ly6C+ Monocytes into Macrophages. *PLoS Pathog* 11, e1004873.
- 229.** Mullassery, D., and Smith, N.P. (2015). Lung development. *Seminars in Pediatric Surgery* 24, 152–155.
- 230.** Müller, L., and Jaspers, I. (2012). Epithelial cells, the “switchboard” of respiratory immune defense responses: effects of air pollutants. *Swiss Med Wkly*.
- 231.** Munkholm, M., and Mortensen, J. (2014). Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin Physiol Funct Imaging* 34, 171–177.
- 232.** Naba, A., Clauser, K.R., Ding, H., Whittaker, C.A., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biology* 49, 10–24.
- 233.** Nachury, M.V., Seeley, E.S., and Jin, H. (2010). Trafficking to the Ciliary Membrane: How to Get Across the Periciliary Diffusion Barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 59–87.
- 234.** Nawroth, J.C., van der Does, A.M., Ryan (Firth), A., and Kanso, E. (2020). Multiscale mechanics of mucociliary clearance in the lung. *Phil. Trans. R. Soc. B* 375, 20190160.

- 235.** Nekrasova, O., and Green, K.J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends in Cell Biology* *23*, 537–546.
- 236.** Nigg, E.A., and Raff, J.W. (2009). Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell* *139*, 663–678.
- 237.** Nothelfer, K., Sansonetti, P.J., and Phalipon, A. (2015). Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. *Nat Rev Microbiol* *13*, 173–184.
- 238.** Ochs, M., Hegermann, J., Lopez-Rodriguez, E., Timm, S., Nouailles, G., Matuszak, J., Simmons, S., Witzentrath, M., and Kuebler, W.M. (2020). On Top of the Alveolar Epithelium: Surfactant and the Glycocalyx. *IJMS* *21*, 3075.
- 239.** Olofsson, P.S., Katz, D.A., Rosas-Ballina, M., Levine, Y.A., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S.I., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., and Chavan, S.S. (2012). $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) expression in bone marrow-derived non-T cells is required for the inflammatory reflex. *Mol Med* *18*, 539–543.
- 240.** Onodera, T., Takahashi, Y., Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., and Kobayashi, K. (2012). Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2485–2490.
- 241.** Pandya, A., and Yakel, J.L. (2011). Allosteric modulators of the $\alpha 4\beta 2$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* *82*, 952–958.
- 242.** Paul, P., Malakar, A.K., and Chakraborty, S. (2019). The significance of gene mutations across eight major cancer types. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* *781*, 88–99.
- 243.** Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* *37*, 273–283.
- 244.** Pera, T., and Penn, R.B. (2014). Crosstalk between beta-2-adrenoceptor and muscarinic acetylcholine receptors in the airway. *Curr Opin Pharmacol* *16*, 72–81.
- 245.** Perez, X.A., Bordia, T., McIntosh, J.M., Grady, S.R., and Quik, M. (2008). Long-term nicotine treatment differentially regulates striatal $\alpha 6\alpha 4\beta 2^*$ and $\alpha 6(\text{non}\alpha 4)\beta 2^*$ nAChR expression and function. *Mol Pharmacol* *74*, 844–853.
- 246.** Pérez-Morales, R., González-Zamora, A., González-Delgado, M.F., Calleros Rincón, E.Y., Olivas Calderón, E.H., Martínez-Ramírez, O.C., and Rubio, J. (2018). CHRNA3 rs1051730 and CHRNA5 rs16969968 polymorphisms are associated with heavy smoking, lung cancer, and chronic obstructive pulmonary disease in a mexican population. *Ann Hum Genet* *82*, 415–424.
- 247.** Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* *131*, 959–971.
- 248.** Pillai, S.G., Kong, X., Edwards, L.D., Cho, M.H., Anderson, W.H., Coxson, H.O., Lomas, D.A., Silverman, E.K., and ECLIPSE and ICGN Investigators (2010). Loci identified by genome-wide association studies influence different disease-related phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* *182*, 1498–1505.
- 249.** Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional

and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38, 322–335.

250. 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.

251. Porter, J.L., Bukey, B.R., Geyer, A.J., Willnauer, C.P., and Reynolds, P.R. (2011). Immunohistochemical detection and regulation of $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits by FoxA2 during mouse lung organogenesis. *Respir Res* 12, 82.

252. Pritchard, J.K., and Przeworski, M. (2001). Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* 69, 1–14.

253. Puttur, F., Gregory, L.G., and Lloyd, C.M. (2019). Airway macrophages as the guardians of tissue repair in the lung. *Immunol Cell Biol* 97, 246–257.

254. Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6, 741–750.

255. Randell, S.H., Boucher, R.C., and University of North Carolina Virtual Lung Group (2006). Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 20–28.

256. Rauthan, M., Gong, J., Liu, J., Li, Z., Wescott, S.A., Liu, J., and Xu, X.Z.S. (2017). MicroRNA Regulation of nAChR Expression and Nicotine-Dependent Behavior in *C. elegans*. *Cell Rep* 21, 1434–1441.

257. Ravin, K.A., and Loy, M. (2016). The Eosinophil in Infection. *Clinic Rev Allerg Immunol* 50, 214–227.

258. Reynolds, P.R., and Hoidal, J.R. (2005). Temporal-Spatial Expression and Transcriptional Regulation of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor by Thyroid Transcription Factor-1 and Early Growth Response Factor-1 during Murine Lung Development. *Journal of Biological Chemistry* 280, 32548–32554.

259. Reynolds, P.R., Allison, C.H., and Willnauer, C.P. (2010). TTF-1 regulates $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in proximal and distal lung epithelium. *Respir Res* 11, 175.

260. Roche, N. (2018). Stable COPD Treatment: Where are We? *COPD* 15, 123–129.

261. Rock, J.R., and Hogan, B.L.M. (2011). Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 493–512.

262. 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.

263. Rock, J.R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S.H., Kong, Y.-Y., and Hogan, B.L.M. (2011). Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 639–648.

264. Rokicki, W., Rokicki, M., Wojtacha, J., and Dželjijli, A. (2016). The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kitp* 1, 26–30.

- 265.** Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 813–825.
- 266.** Sacco, O., Silvestri, M., Sabatini, F., Sale, R., Defilippi, A.-C., and Rossi, G.A. (2004). Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatric Respiratory Reviews* *5*, S35–S40.
- 267.** Saccone, N.L., Culverhouse, R.C., Schwantes-An, T.-H., Cannon, D.S., Chen, X., Cichon, S., Giegling, I., Han, S., Han, Y., Keskitalo-Vuokko, K., et al. (2010). Multiple Independent Loci at Chromosome 15q25.1 Affect Smoking Quantity: a Meta-Analysis and Comparison with Lung Cancer and COPD. *PLoS Genet* *6*, e1001053.
- 268.** Saito, A., Horie, M., and Nagase, T. (2018). TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci* *19*.
- 269.** Sanei, F., and Wilkinson, T. (2016). Influenza vaccination for patients with chronic obstructive pulmonary disease: understanding immunogenicity, efficacy and effectiveness. *Ther Adv Respir Dis* *10*, 349–367.
- 270.** Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* *124*, 2659–2670.
- 271.** Santus, P., Radovanovic, D., Pecchiari, M., Ferrando, M., Tursi, F., Patella, V., and Braido, F. (2020). The Relevance of Targeting Treatment to Small Airways in Asthma and COPD. *Respir Care* *65*, 1392–1412.
- 272.** Saracino, L., Zorzetto, M., Inghilleri, S., Pozzi, E., and Stella, G.M. (2013). Non-neuronal cholinergic system in airways and lung cancer susceptibility. *Transl Lung Cancer Res* *2*, 284–294.
- 273.** Schaal, C., and Chellappan, S.P. (2014). Nicotine-Mediated Cell Proliferation and Tumor Progression in Smoking-Related Cancers. *Mol Cancer Res* *12*, 14–23.
- 274.** Schiller, H.B., Montoro, D.T., Simon, L.M., Rawlins, E.L., Meyer, K.B., Strunz, M., Vieira Braga, F.A., Timens, W., Koppelman, G.H., Budinger, G.R.S., et al. (2019). The Human Lung Cell Atlas: A High-Resolution Reference Map of the Human Lung in Health and Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* *61*, 31–41.
- 275.** Schittny, J.C. (2017). Development of the lung. *Cell Tissue Res* *367*, 427–444.
- 276.** Scholze, P., and Huck, S. (2020). The $\alpha 5$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates $\alpha 4\beta 2^*$ and $\alpha 3\beta 4^*$ Receptors. *Front. Synaptic Neurosci.* *12*, 607959.
- 277.** Schuller, H.M. (2007). Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. *Life Sci* *80*, 2274–2280.
- 278.** Schuster, I.S., Coudert, J.D., Andoniou, C.E., and Degli-Esposti, M.A. (2016). “Natural Regulators”: NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front. Immunol.* *7*.
- 279.** Scoville, S.D., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2017). Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* *8*, 360.
- 280.** Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* *23*, 197–223.

- 281.** Serti, E., Werner, J.M., Chattergoon, M., Cox, A.L., Lohmann, V., and Reherrmann, B. (2014). Monocytes activate natural killer cells via inflammasome-induced interleukin 18 in response to hepatitis C virus replication. *Gastroenterology* *147*, 209-220.e3.
- 282.** Shaykhiev, R., Otaki, F., Bonsu, P., Dang, D.T., Teater, M., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Harvey, B.-G., and Crystal, R.G. (2011). Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci* *68*, 877–892.
- 283.** Shibata, S., Miyake, K., Tateishi, T., Yoshikawa, S., Yamanishi, Y., Miyazaki, Y., Inase, N., and Karasuyama, H. (2018). Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, 13057–13062.
- 284.** Sieren, J.P., Newell, J.D., Judy, P.F., Lynch, D.A., Chan, K.S., Guo, J., and Hoffman, E.A. (2012). Reference standard and statistical model for intersite and temporal comparisons of CT attenuation in a multicenter quantitative lung study: Multicenter quantitative lung CT. *Med. Phys.* *39*, 5757–5767.
- 285.** Silver, J.S., Kearley, J., Copenhaver, A.M., Sanden, C., Mori, M., Yu, L., Pritchard, G.H., Berlin, A.A., Hunter, C.A., Bowler, R., et al. (2016). Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol* *17*, 626–635.
- 286.** Silverman, E.K. (2020). Genetics of COPD. *Annu. Rev. Physiol.* *82*, 413–431.
- 287.** Sinder, B.P., Pettit, A.R., and McCauley, L.K. (2015). Macrophages: Their Emerging Roles in Bone. *J Bone Miner Res* *30*, 2140–2149.
- 288.** Singh, G., and Katyal, S.L. (2006). Clara Cell Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* *923*, 43–58.
- 289.** Skok, M., Grailhe, R., and Changeux, J.-P. (2005). Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response. *Eur J Pharmacol* *517*, 246–251.
- 290.** Skok, M., Grailhe, R., Agenes, F., and Changeux, J.-P. (2006). The role of nicotinic acetylcholine receptors in lymphocyte development. *J Neuroimmunol* *171*, 86–98.
- 291.** Snyder, M.E., and Farber, D.L. (2019). Human lung tissue resident memory T cells in health and disease. *Current Opinion in Immunology* *59*, 101–108.
- 292.** Sophia, F., Spiegelhalder, B., and Preussmann, R. (1989). Preformed tobacco-specific nitrosamines in tobacco—role of nitrate and influence of tobacco type. *Carcinogenesis* *10*, 1511–1517.
- 293.** Soriano, J.B., Kendrick, P.J., Paulson, K.R., Gupta, V., Abrams, E.M., Adedoyin, R.A., Adhikari, T.B., Advani, S.M., Agrawal, A., Ahmadian, E., et al. (2020). Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Respiratory Medicine* *8*, 585–596.
- 294.** Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* *13*, 145–149.
- 295.** Spits, H., Bernink, J.H., and Lanier, L. (2016). NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol* *17*, 758–764.

- 296.** Sprangers, S., Vries, T.J. de, and Everts, V. (2016). Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *Journal of Immunology Research* 2016, 1–10.
- 297.** Spruit, M.A., Pitta, F., McAuley, E., ZuWallack, R.L., and Nici, L. (2015). Pulmonary Rehabilitation and Physical Activity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 192, 924–933.
- 298.** Stanley, A.J., Hasan, I., Crockett, A.J., van Schayck, O.C.P., and Zwar, N.A. (2014). COPD Diagnostic Questionnaire (CDQ) for selecting at-risk patients for spirometry: a cross-sectional study in Australian general practice. *Npj Prim Care Resp Med* 24, 14024.
- 299.** Steer, C.A., Martinez-Gonzalez, I., Ghaedi, M., Allinger, P., Mathä, L., and Takei, F. (2017). Group 2 innate lymphoid cell activation in the neonatal lung drives type 2 immunity and allergen sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140, 593-595.e3.
- 300.** Stehle, C., Hernández, D.C., and Romagnani, C. (2018). Innate lymphoid cells in lung infection and immunity. *Immunol Rev* 286, 102–119.
- 301.** Suarez-Ramirez, J.E., Chandiran, K., Brocke, S., and Cauley, L.S. (2019). Immunity to Respiratory Infection Is Reinforced Through Early Proliferation of Lymphoid TRM Cells and Prompt Arrival of Effector CD8 T Cells in the Lungs. *Front Immunol* 10, 1370.
- 302.** 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, eaan8546.
- 303.** Sun, H., and Ma, X. (2015). $\alpha 5$ -nAChR modulates nicotine-induced cell migration and invasion in A549 lung cancer cells. *Exp Toxicol Pathol* 67, 477–482.
- 304.** Sun, J.C., and Lanier, L.L. (2011). NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. *Nat Rev Immunol* 11, 645–657.
- 305.** Sun, H.-J., Jia, Y.-F., and Ma, X.-L. (2017). Alpha5 Nicotinic Acetylcholine Receptor Contributes to Nicotine-Induced Lung Cancer Development and Progression. *Front Pharmacol* 8, 573.
- 306.** Suresh, K., and Shimoda, L.A. (2016). Lung Circulation. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 897–943.
- 307.** Tager, I.B., Hanrahan, J.P., Tosteson, T.D., Castile, R.G., Brown, R.W., Weiss, S.T., and Speizer, F.E. (1993). Lung Function, Pre- and Post-natal Smoke Exposure, and Wheezing in the First Year of Life. *Am Rev Respir Dis* 147, 811–817.
- 308.** Tam, A., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S.F.P., and Sin, D.D. (2011). The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Therapeutic Advances in Respiratory* 5, 255–273.
- 309.** Tammimäki, A., Herder, P., Li, P., Esch, C., Laughlin, J.R., Akk, G., and Stitzel, J.A. (2012). Impact of human D398N single nucleotide polymorphism on intracellular calcium response mediated by $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 63, 1002–1011.
- 310.** Tanaka, K., Kitagawa, Y., and Kadowaki, T. (2002). Drosophila Segment Polarity Gene Product Porcupine Stimulates the Posttranslational N-Glycosylation of Wingless in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 277, 12816–12823.

- 311.** Tantucci, C., and Modina, D. (2012). Lung function decline in COPD. *COPD* 95.
- 312.** Tarran, R., Button, B., Picher, M., Paradiso, A.M., Ribeiro, C.M., Lazarowski, E.R., Zhang, L., Collins, P.L., Pickles, R.J., Fredberg, J.J., et al. (2005). Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. *J Biol Chem* 280, 35751–35759.
- 313.** Tashkin, D.P., and Wechsler, M.E. (2018). Role of eosinophils in airway inflammation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 13, 335–349.
- 314.** Tay, C.H., and Welsh, R.M. (1997). Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 71, 267–275.
- 315.** Taylor, B., and Wadsworth, J. (1987). Maternal smoking during pregnancy and lower respiratory tract illness in early life. *Archives of Disease in Childhood* 62, 786–791.
- 316.** Terzikhan, N., Verhamme, K.M.C., Hofman, A., Stricker, B.H., Brusselle, G.G., and Lahousse, L. (2016). Prevalence and incidence of COPD in smokers and non-smokers: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol* 31, 785–792.
- 317.** Thiesen, S., Janciauskiene, S., Uronen-Hansson, H., Agace, W., Högerkorp, C.-M., Spee, P., Håkansson, K., and Grip, O. (2014). CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn’s disease. *J Leukoc Biol* 95, 531–541.
- 318.** Thompson, A.B., Robbins, R.A., Romberger, D.J., Sisson, J.H., Spurzem, J.R., Teschler, H., and Rennard, S.I. (1995). Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 8, 127–149.
- 319.** Tobón, G.J., Izquierdo, J.H., and Cañas, C.A. (2013). B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis* 2013, 827254.
- 320.** Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48, 339–364.
- 321.** Ton, H.T., Smart, A.E., Aguilar, B.L., Olson, T.T., Kellar, K.J., and Ahern, G.P. (2015). Menthol Enhances the Desensitization of Human $\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* 88, 256–264.
- 322.** Tonnesen, P. (2013). Smoking cessation and COPD. *European Respiratory Review* 22, 37–43.
- 323.** Tournier, J.-M., Maouche, K., Coraux, C., Zahm, J.-M., Cloëz-Tayarani, I., Nawrocki-Raby, B., Bonnomet, A., Burlet, H., Lebargy, F., Polette, M., et al. (2006). $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ -Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells. *Am J Pathol* 168, 55–68.
- 324.** Travaglini, K.J., Nabhan, A.N., Penland, L., Sinha, R., Gillich, A., Sit, R.V., Chang, S., Conley, S.D., Mori, Y., Seita, J., et al. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 587, 619–625.
- 325.** Tuček, S. (1982). The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *The Journal of Physiology* 322, 53–69.

- 326.** Urase, K., Mukasa, T., Igarashi, H., Ishii, Y., Yasugi, S., Momoi, M.Y., and Momoi, T. (1996). Spatial Expression of Sonic Hedgehog in the Lung Epithelium during Branching Morphogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 225, 161–166.
- 327.** Valledor, A.F., Borràs, F.E., Cullell-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 63, 405–417.
- 328.** Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Pollack, J.L., Gate, R.E., Haliburton, G.E., Ye, C.J., Marson, A., et al. (2016). A tissue checkpoint regulates type 2 immunity. *Nat Immunol* 17, 1381–1387.
- 329.** Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 643–675.
- 330.** Velazquez, R., Ferreira, E., Knowles, S., Fux, C., Rodin, A., Winslow, W., and Oddo, S. (2019). Lifelong choline supplementation ameliorates Alzheimer's disease pathology and associated cognitive deficits by attenuating microglia activation. *Aging Cell* 18.
- 331.** van der Velden, V.H.J., and Hulsmann, A.R. (1999). Autonomic Innervation of Human Airways: Structure, Function, and Pathophysiology in Asthma. *Neuroimmunomodulation* 6, 145–159.
- 332.** Vespasiani-Gentilucci, U., Pedone, C., Muley-Vilamu, M., and Antonelli-Incalzi, R. (2018). The pharmacological treatment of chronic comorbidities in COPD: mind the gap! *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 51, 48–58.
- 333.** Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., and Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 90, 7–24.
- 334.** Voehringer, D. (2012). Basophil modulation by cytokine instruction. *Eur J Immunol* 42, 2544–2550.
- 335.** Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martinez, F.J., Anzueto, A., Barnes, P.J., Bourbeau, J., Celli, B.R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L.M., et al. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 195, 557–582.
- 336.** Vogelmeier, C.F., Román-Rodríguez, M., Singh, D., Han, M.K., Rodríguez-Roisin, R., and Ferguson, G.T. (2020). Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respiratory Medicine* 166, 105938.
- 337.** Vukelic, M., Qing, X., Redecha, P., Koo, G., and Salmon, J.E. (2013). Cholinergic receptors modulate immune complex-induced inflammation in vitro and in vivo. *J Immunol* 191, 1800–1807.
- 338.** Wang, F., Nelson, M.E., Kuryatov, A., Olale, F., Cooper, J., Keyser, K., and Lindstrom, J. (1998). Chronic Nicotine Treatment Up-regulates Human $\alpha 3\beta 2$ but Not $\alpha 3\beta 4$ Acetylcholine Receptors Stably Transfected in Human Embryonic Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273, 28721–28732.
- 339.** Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., et al. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384–388.
- 340.** Wang, M.-L., Hsu, Y.-F., Liu, C.-H., Kuo, Y.-L., Chen, Y.-C., Yeh, Y.-C., Ho, H.-L., Wu, Y.-C., Chou, T.-Y., and Wu, C.-W. (2020). Low-Dose Nicotine Activates EGFR Signaling via $\alpha 5$ -nAChR and Promotes Lung Adenocarcinoma Progression. *Int J Mol Sci* 21.

- 341.** Wang, Y., Xu, J., Meng, Y., Adcock, I.M., and Yao, X. (2018). Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *COPD Volume 13*, 3341–3348.
- 342.** Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., Langhe, S.D., Kemp, P.J., Riccardi, D., Torday, J., et al. (2010). Lung Organogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 73–158.
- 343.** Wen, L., Jiang, K., Yuan, W., Cui, W., and Li, M.D. (2016). Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Mol Neurobiol 53*, 472–484.
- 344.** Wessler, I., and Kirkpatrick, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol 154*, 1558–1571.
- 345.** Wessler, I., Roth, E., Deutsch, C., Brockerhoff, P., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., and Kilbinger, H. (2001). Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters: Acetylcholine release and organic cation transporter. *British Journal of Pharmacology 134*, 951–956.
- 346.** Westphalen, K., Gusarova, G.A., Islam, M.N., Subramanian, M., Cohen, T.S., Prince, A.S., and Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature 506*, 503–506.
- 347.** Whitsett, J.A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals ATS 15*, S143–S148.
- 348.** Wistuba, I.I., Mao, L., and Gazdar, A.F. (2002). Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene 21*, 7298–7306.
- 349.** Wittenberg, R.E., Wolfman, S.L., De Biasi, M., and Dani, J.A. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology 177*, 108256.
- 350.** Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). MECHANISMS OF WNT SIGNALING IN DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14*, 59–88.
- 351.** Woik, N., and Kroll, J. (2015). Regulation of lung development and regeneration by the vascular system. *Cell. Mol. Life Sci. 72*, 2709–2718.
- 352.** Wojas-Krawczyk, K., Krawczyk, P., Biernacka, B., Grzybek, M., Kołodziej, P., Kucharczyk, T., Mlak, R., and Milanowski, J. (2012). The polymorphism of the CHRNA5 gene and the strength of nicotine addiction in lung cancer and COPD patients: *European Journal of Cancer Prevention 21*, 111–117.
- 353.** Wright, J.R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol 5*, 58–68.
- 354.** Yang, L., Qiu, F., Lu, X., Huang, D., Ma, G., Guo, Y., Hu, M., Zhou, Y., Pan, M., Tan, Y., et al. (2012). Functional polymorphisms of CHRNA3 predict risks of chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in Chinese. *PLoS One 7*, e46071.
- 355.** Yang, L., Lu, X., Qiu, F., Fang, W., Zhang, L., Huang, D., Xie, C., Zhong, N., Ran, P., Zhou, Y., et al. (2015). Duplicated copy of CHRNA7 increases risk and worsens prognosis of COPD and lung cancer. *Eur J Hum Genet 23*, 1019–1024.

- 356.** Yeo, N.-K., and Jang, Y.J. (2010). Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells: TJs and AJs in Nasal Epithelial Cells. *The Laryngoscope* *120*, 346–352.
- 357.** Zeng, Y., Jiang, F., Chen, Y., Chen, P., and Cai, S. (2018). Exercise assessments and trainings of pulmonary rehabilitation in COPD: a literature review. *COPD Volume 13*, 2013–2023.
- 358.** Zepp, J.A., and Morrissey, E.E. (2019). Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 551–566.
- 359.** Zhou, Q., Ho, A.W.S., Schlitzer, A., Tang, Y., Wong, K.H.S., Wong, F.H.S., Chua, Y.L., Angeli, V., Mortellaro, A., Ginhoux, F., et al. (2014). GM-CSF-licensed CD11b⁺ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*. *J Immunol* *193*, 496–509.
- 360.** Zhou, W., Zhu, W., Tong, X., Ming, S., Ding, Y., Li, Y., and Li, Y. (2020). CHRNA5 rs16969968 polymorphism is associated with lung cancer risk: A meta-analysis. *Clin Respir J* *14*, 505–513.
- 361.** Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74-80.
- 362.** Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., et al. (2012). Ly6C^{hi} monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* *37*, 1076–1090.
- 363.** Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., and Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *CN* *16*, 338–349.

Rôle du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques dans l'homéostasie pulmonaire et la bronchopneumopathie chronique obstructive

Des études d'associations pangénomiques ont permis d'associer le variant rs16969968 (SNP $\alpha 5$) de la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) au comportement tabagique, à la diminution de la fonction respiratoire et l'incidence de la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). Nous avons ainsi proposé d'établir un lien entre ce polymorphisme et les événements biologiques pulmonaires caractéristiques de la BPCO. Par ailleurs, en absence d'une cartographie complète, nous avons étudié l'expression transcriptomique et protéomique des nAChRs dans le poumon.

Nous avons mis en évidence une expression transcriptomique différentielle des sous-unités en fonction des compartiments pulmonaires et du statut tabagique, en plus d'avoir confirmé l'expression protéique de la plupart des sous-unités dans l'épithélium bronchique. *In vitro* et *ex vivo*, rs16969968 est associé à un retard de ciliogenèse dans un contexte non-pathologique ainsi qu'à une diminution de la réponse inflammatoire en début de différenciation cellulaire. Des études génotypiques ont mis en évidence que ce SNP $\alpha 5$ est plus exprimé chez les patients atteints de la BPCO et qu'il est associé à une diminution de la fonction respiratoire et l'augmentation de l'emphysème indépendamment de la pathologie sans pour autant sembler influencer le remodelage épithélial bronchique.

Cette étude pionnière a proposé un atlas complet des nAChRs dans les voies aériennes ainsi qu'une explication biologique quant à l'effet du polymorphisme rs16969968 sur les altérations de l'épithélium respiratoire chez l'Homme.

Mots-clés : Poumon – Récepteurs nicotiques – Polymorphisme – BPCO – Cellules épithéliales

Role of rs16969968 polymorphism of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 5$ subunit in lung homeostasis and chronic obstructive pulmonary disease

Genome-Wide Association Studies (GWAS) associated *CHRNA5* polymorphism rs16969968 (SNP $\alpha 5$) coding $\alpha 5$ nAChR subunit with smoking behavior, decreased respiratory function, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) onset. We proposed to establish the relationship between SNP $\alpha 5$ and lung biological events characteristic of COPD. Furthermore, nAChRs have been detected in human airways to fill the knowledge gap with a complete lung cartography. We studied their transcriptomic and proteomic profiles in the lung.

We demonstrated a differential transcriptomic expression of all subunits depending on the lung compartment and the smoking status, in addition to confirming protein expression of the majority of nAChR subunits in the bronchial epithelium. *In vitro* and *ex vivo*, rs16969968 altered ciliogenesis in a non-pathological context and deregulated inflammatory response in early epithelial cell differentiation. Genotyping studies revealed that rs16969968 is more found in COPD patients and correlated with respiratory function impairment and lung emphysema independently of the pathology. Nonetheless, the polymorphism did not influence the bronchial epithelial morphohistology in COPD patients.

This pioneering study provided a complete atlas of nAChRs in human airways and cellular and molecular clues to decipher polymorphism rs16969968-associated impairments in the respiratory epithelium of the human lung.

Keywords: Lung – Nicotinic receptors – Polymorphism – COPD – Epithelial cells

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

Inserm UMR-S 1250

Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire (P3Cell)

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

