



HAL
open science

Identification et caractérisation de nouveaux régulateurs de la voie Hedgehog dans l'homéostasie pulmonaire et la BPCO

Laure Petit

► **To cite this version:**

Laure Petit. Identification et caractérisation de nouveaux régulateurs de la voie Hedgehog dans l'homéostasie pulmonaire et la BPCO. Sciences du Vivant [q-bio]. URCA, 2024. Français. NNT : . tel-04888083

HAL Id: tel-04888083

<https://hal.univ-reims.fr/tel-04888083v1>

Submitted on 15 Jan 2025

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 BIOLOGIE CHIMIE 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

Laure PETIT

Le 16 octobre 2024

Identification et caractérisation de nouveaux régulateurs de la voie Hedgehog dans l'homéostasie pulmonaire et la BPCO

Thèse dirigée par le **Docteur Valérian DORMOY** et la **Professeure Jeanne-Marie PEROTIN**,
Université de Reims Champagne-Ardenne

JURY

M. Laurent BOYER,	PU-PH	Université Paris-Est Créteil, France	Président du jury
M. Valérian DORMOY,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims, France,	Directeur de thèse
Mme Jeanne-Marie PEROTIN,	PU-PH,	Université de Reims, France,	Co-Directeur de thèse
M. Julien FERENT,	Chargé de Recherche HDR,	Sorbonne Université, France,	Rapporteur
Mme Laure-Emmanuelle ZARAGOSI,	Chargée de Recherche HDR,	Université Côte d'Azur, France,	Examineur
M. Olivier PIOT,	PU,	Université de Reims, France,	Examineur



*A mes proches,
Do mo sheanathair,*

Remerciements

J'aimerais remercier la Professeure Myriam Polette, directrice de l'Unité INSERM UMR-S 1250, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès mon stage de master 2 et pendant mes années de thèse.

Je souhaiterais remercier le Professeur Laurent Boyer de l'Université Paris-Est Créteil et le Docteur Julien Ferent de Sorbonne Université pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Mes remerciements vont également à la Docteure Laure-Emmanuelle Zaragosi de l'Université Côte d'Azur et au Professeur Olivier Piot de l'Université de Reims pour leur participation à ma soutenance de thèse en tant qu'examinateur.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse le Docteur Valérian Dormoy. Merci pour la confiance que tu m'as accordée sur ce projet, pour ta disponibilité tout au long de ces trois ans et ton soutien. Ça a été un réel plaisir et une chance de t'avoir en directeur de thèse. Je souhaite à chaque étudiant d'avoir un encadrant aussi à l'écoute et pédagogue que toi. Je n'oublierai pas ton optimisme, ta gentillesse et tes nombreux conseils. Je te remercie également pour tes conseils voyage et n'oublie pas de recommander Heidelberg aux prochains pour avoir une nouvelle tasse tous les 7 ans. Merci pour tout !

Je souhaite également remercier ma co-directrice de thèse La Professeure Jeanne-Marie Perotin pour ses précieux conseils et son expertise clinique. Merci pour votre disponibilité et votre implication tout au long de ce projet de thèse.

Merci à l'équipe de pneumologie et notamment au Professeur Gaëtan Deslée pour ses conseils cliniques, au Docteur Julien Ancel pour son aide dans le recueil de données cliniques, et au Docteur Alexandre Vivien pour l'accès aux fibroscopies.

Merci à La Docteure Lynda Saber-Cherif pour son aide et sa disponibilité pour la culture primaire, même pendant les congrès et surtout pour ses nombreux conseils toujours bons à prendre. Merci pour tout Lynda et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Un immense remerciement aux doctorants et anciens doctorants : Théophile, Antony, Emma, Cléopée, Maëva, Marion, Julie, Sarah et Léon.

Théophile, merci de m'avoir accueillie dès mon stage de M2, merci pour tes conseils et pour ton aide à de nombreuses reprises. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite !

Antony, le grand frère du labo, toujours présent quand on en avait besoin. Tu es vraiment un bosseur et tu es pour moi une source d'inspiration et de force mentale. Toutes nos conversations sur la chaise du confessionnal m'ont beaucoup manquées depuis la fin de ta thèse, là où le Cheval de Troie est né. Je te remercie pour tous tes conseils sur la recherche mais également pour toutes nos discussions sur de nombreux sujets du quotidien. Et n'oublies pas que des fois, il ne faut pas trop réfléchir, alors fonce et déchire tout.

Merci à la Team Girl Power pour tous les moments partagés ensemble, de nos week-ends toutes ensemble à nos sorties ou nos soirées potins jusqu'à 3h. Je n'oublierai jamais tous ces moments de joie et de rires avec vous. Vous êtes devenues bien plus que de simples collègues. Vous avez égayé ces années de thèse et j'espère que cela continuera encore !

Emma, le début d'une aventure ensemble qui se termine à quelques mois d'écart. Je suis extrêmement reconnaissante d'avoir pu partager ces trois ans de thèse à tes côtés. On était dans le même bateau et c'était réconfortant d'avoir une amie à ses côtés vivant la même chose pour pouvoir se soutenir. Tu peux être fière de tout ce que tu accomplis car tu es une belle personne, douée et qui mérite ce qui lui arrive. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pendant ma thèse, ton soutien, ton aide et nos nombreuses discussions permettant de souffler du quotidien. Je t'envoie tout mon courage et soutien pour ces derniers mois et l'avenir te réservera de belles choses, j'en suis sûre.

Cléopée, la personne la plus drôle que j'ai pu rencontrer. Merci pour tous ces moments passés à débattre de nos résultats, mais surtout à faire quelques bêtises. Je suis heureuse de t'avoir rencontrée, tu as apporté énormément de joie de vivre dans mon quotidien pendant ces années par tes réactions exagérées et ta folie (qui je pense a déteint sur nous). Je n'oublierai pas Milan, le congrès que l'on a pu partager ensemble avec d'énormes fous rires (Petite pensée à Edgar). Tu es une femme exceptionnelle, prends confiance en toi car tu es bien plus forte que tu ne le penses et tu es capable de grandes choses. Reste la personne que tu es, inspirante et débordante d'énergie.

Maëva, ma coloc de bureau et ma roommate chez les Anglais. Je suis vraiment heureuse que tu aies continué en thèse avec nous, et qui plus est, dans le même bureau. Je te remercie d'avoir supporté mes multiples émotions dans le bureau au cours de ces années mais surtout pour toutes nos discussions aussi enrichissantes les unes que les autres (sauf quand on débat sur les jeux de notre enfance), sur nos manips, nos résultats mais aussi de la vie en général. T'avoir à mes côtés m'a beaucoup motivée et aidée à me concentrer. Ta rigueur est remarquable et ta détermination est inspirante, j'espère en avoir appris un peu. Notre mobilité restera inoubliable et je suis extrêmement contente de l'avoir partagée avec toi, finalement un repère dans un autre pays. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée au quotidien, tu as une grande place dans ce travail de thèse. Je te souhaite plein de belles choses pour ta fin de thèse et pour la suite.

Marion, le rayon de soleil du labo. Merci pour ton soutien et pour ton aide durant ces derniers mois. Tu n'es pas arrivée depuis très longtemps mais tu t'es tout de suite intégrée à la team, avec les mêmes délires que nous. Je te remercie pour tes regards du coin de l'œil à travers le labo central qui redonne le sourire instantanément pour la journée (en souvenir du coquillage, bien sûr). Tu es vraiment une femme forte, solaire et c'est tellement agréable d'être à tes côtés au quotidien, c'est peut-être l'état d'esprit du sud. Je te souhaite le meilleur pour le reste de ta thèse, en espérant être là pour voir la suite.

Julie, la petite dernière de la team. Je te remercie pour toute la joie de vivre que tu m'as transmise. Ton sourire et ta positivité au quotidien m'ont aidé pendant cette période de stress. Tu es une femme rayonnante, attentionnée, avec un grand cœur. Tes multiples facettes, joueuse de Volley ou encore trekkeuse, te donnes une force de caractère exemplaire et inspirante. Tu es une personne généreuse, à toujours nous gater de petites sucreries, réconfortante et nécessaire pour le moral des troupes. Je te souhaite beaucoup de réussite tant sur le plan professionnel que personnel ainsi qu'une belle fin de thèse.

Merci également à l'ensemble de l'équipe de l'unité 1250 pour leur accueil. Je souhaiterais remercier La Docteure Emilie Luczka et Charline Dietz pour leurs conseils pour le bon déroulement de la culture primaire. Je remercie Adeline Germain et Nathalie Lalun pour leurs enseignements et leur aide pour les techniques expérimentales et la Docteure Audrey Brisbarre pour les explications sur la bioinformatique et l'analyse du RNAseq. Je remercie Sophie Moussalih et la Docteure Céline Muselet pour leur bonne humeur communicative et leur gentillesse.

Mes remerciements vont également à Alexandre Abreder pour sa disponibilité et son aide au quotidien, Claire Kileztky, Alexandra Breuzon-Bidard et Annie Chaveriat pour leur aide précieuse dans la gestion administrative, les commandes et les ordres de mission. Je remercie le Docteur Arnaud Bonnomet de la plateforme PICT pour son aide sur l'utilisation du microscope. Enfin, je souhaite remercier la Docteure Christelle Coraux et la Docteure Béatrice Nawrocki-Raby pour tous leurs conseils pendant mes années de thèse.

Je souhaite remercier l'ensemble des stagiaires qui sont passés au laboratoire et avec qui nous avons passé d'agréables moments de cohésion et de rigolades. Merci à France, Adrien, Maiwenn, Léa, Marin, Clara, Nathan, Ruby, Cassiopée, Mathilde et Agathe. Un merci particulier à Agathe Dominé. Tu es arrivée en stage pendant la période la plus stressante pour moi et je te remercie de ton soutien ces dernières semaines. Tu as une vraie force de volonté et une implication sans failles, alors fonce et les portes s'ouvriront pour toi.

Merci au groupe du G8, Juliette, Margot, Clara, Mathilde, Maxime.H, Maxime.P et Romain. Je vous remercie de m'avoir supportée depuis le lycée, je suis reconnaissante de vous avoir dans ma vie. On se donne rendez-vous dans 2 ans devant le lycée. Merci Lisa pour ton soutien depuis la Licence et pour tous les bons moments passés ensemble. Je remercie également Emeline, ma mamie hippo et Julien, le meilleur binôme, pour toutes nos sorties à ne penser à rien, nos voyages organisés en dernière minute et surtout pour votre soutien infailible. A bientôt à Dublin !

Un immense merci à mes proches, ceux sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Maman, Papa, je vous remercie de m'avoir donnée les moyens d'avoir pu faire ce que j'aimais, même si vous ne compreniez pas toujours en quoi ça consistait. Je suis reconnaissante de ce que vous m'avez apporté, de votre soutien et de votre amour au quotidien permettant de faire celle que je suis. Damien, malgré nos voies séparées, merci d'être là pour moi quand j'en ai besoin. Ma filleule, Lehanna, mon rayon de soleil, merci d'être la petite fille qui m'apporte le plus de bonheur. Je suis fière de toi et je serai toujours là pour toi.

A celui qui partage ma vie, Alex. Merci d'être à mes côtés, de me soutenir, de trouver les mots justes pour chaque situation, surtout en cette fin de thèse. Je te remercie pour ton aide au quotidien, tes encouragements, ton écoute, ta bonne humeur et ton amour. Merci du fond du cœur !

Laure

Résumé

La voie Hedgehog (HH) est impliquée dans le développement et le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Elle est altérée dans de nombreuses pathologies respiratoires, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les éléments principaux de la voie HH, Gli2, Shh et Smo, sont diminués chez les patients BPCO. Son inhibition entraîne un remodelage épithélial caractéristique de la BPCO. Etant donné que seuls les éléments principaux ont été étudiés dans le contexte pulmonaire, nous avons exploré des éléments secondaires pouvant être impliqués dans le remodelage épithélial.

Deux stratégies expérimentales complémentaires ont identifié deux éléments altérés dans la BPCO. D'une part, l'étude des corécepteurs de la voie HH a démontré que le niveau d'expression du Glypican 3 (GPC3) est corrélé au déclin de la fonction respiratoire chez les patients BPCO. La localisation du GPC3 est diminuée chez les patients BPCO. *In vitro*, l'inhibition du GPC3 entraîne une diminution de l'activation de la voie HH et un remodelage de l'épithélium, caractérisé par un défaut de ciliogénèse et de production de mucines. D'autre part, l'étude transcriptomique de l'inhibition de la voie HH au cours de la différenciation a mis en évidence POU5F1 comme un acteur moléculaire corrélé à la voie HH. Sa localisation est diminuée chez les patients BPCO, en association avec un déclin de la fonction respiratoire.

Cette étude montre pour la première fois l'importance des éléments secondaires de la voie HH dans le contexte pulmonaire. L'identification de ces nouveaux éléments altérés dans la BPCO permet une meilleure compréhension des mécanismes impliquant la voie HH dans cette pathologie.

Mots clés : BPCO, voie Hedgehog, cellules épithéliales des voies aériennes, GPC3, POU5F1

Abstract

Hedgehog (HH) pathway is involved in the development and maintenance of pulmonary homeostasis. It is altered in many respiratory diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The core elements of the HH pathway, Gli2, Shh, and Smo are decreased in COPD patients. HH pathway inhibition leads to epithelial remodelling, a hallmark of COPD. Since only the core elements were studied in the pulmonary context, we explored the secondary elements that may be involved in airway epithelial remodelling.

Two complementary experimental strategies identified two altered elements in the COPD context. On the one hand, the study of HH co-receptors showed that the expression level of Glypican-3 (GPC3) is correlated with the decline of respiratory function in COPD patients. The localisation of GPC3 is decreased in COPD patients. *In vitro*, GPC3 inhibition induced a decrease of the HH pathway activation and epithelial remodelling, characterised by a defect of ciliogenesis and mucin production. On the other hand, a transcriptomic study of HH pathway inhibition during airway epithelial cell differentiation unveiled POU5F1 as a molecular actor intertwined with the HH pathway. Its localisation was decreased in COPD patients, and associated with a decrease in pulmonary function.

This study demonstrates for the first time the importance of HH secondary elements in the pulmonary context. The identification of these novel altered elements in COPD patients allows deciphering additional mechanisms involving the HH pathway in this disease.

Keywords: COPD, Hedgehog pathway, airway epithelial cells, GPC3, POU5F1

Table des matières

Communications scientifiques	12
Liste des abréviations	15
Liste des figures	18
Listes des tableaux	20
AVANT-PROPOS	21
INTRODUCTION.....	23
Chapitre I : L'appareil respiratoire humain.....	24
1. Généralités sur l'appareil respiratoire	24
1.1. Organisation de l'appareil respiratoire.....	24
1.2. Caractéristiques générales du poumon.....	25
2. Populations cellulaires pulmonaires.....	25
2.1. Organisation histologique des voies aériennes	25
2.2. Tissus épithéliaux.....	26
2.2.1. Les cellules basales.....	27
2.2.2. Les cellules multiciliées.....	27
2.2.3. Les cellules sécrétrices	28
2.2.4. Les ionocytes	29
2.2.5. Les cellules neuroendocrines.....	30
2.2.6. Les pneumocytes	30
3. Fonctions de protection de l'épithélium.....	31
3.1. Intégrité épithéliale	31
3.2. Clairance mucociliaire	33
Chapitre II : La bronchopneumopathie chronique obstructive.....	35
1. Définition et épidémiologie.....	35
2. Les facteurs de risques	35
2.1. Expositions nocives	36
2.1.1. Le tabagisme.....	36

2.1.2. La pollution de l'air	37
2.2. Facteurs génétiques	38
2.3. Facteurs développementaux et socio-économiques	39
3. Diagnostic et classification.....	39
3.1. La spirométrie	39
3.2. Examens complémentaires.....	40
3.3. Classification.....	41
4. Traitements.....	42
4.1. Traitements non-pharmacologiques.....	42
4.2. Traitements pharmacologiques	42
4.2.1. Les bronchodilatateurs.....	43
4.2.2. Les corticostéroïdes inhalés en bithérapie ou trithérapie.....	43
5. Physiopathologie	44
5.1. L'inflammation chronique et l'emphysème.....	45
5.2. Le stress oxydatif	45
5.3. Le remodelage des voies aériennes.....	46
5.3.1. Altération des tissus sous-épithéliaux.....	46
5.3.2. Altération de la fonction protectrice de l'épithélium.....	46
5.3.3. Altération de la composition cellulaire de l'épithélium	47
Chapitre III : Altérations ciliaires dans la BPCO.....	48
1. Ciliogénèse dans le poumon adulte.....	50
1.1. Ciliogénèse primaire	50
1.2. Cellules multiciliées.....	51
1.3. Des cellules possédant un cil primaire aux cellules multiciliées	52
2. Rôles des cils dans l'homéostasie	53
2.1. Le cil primaire dans l'épithélium des voies aériennes	53
2.2. Le cil primaire dans le stroma.....	54
2.3. La clairance mucociliaire	54
3. Les cils dans la BPCO.....	54

3.1.	Altérations du cil primaire	54
3.1.1.	Dans l'épithélium des voies aériennes.....	54
3.1.2.	Dans le parenchyme.....	55
3.2.	Altérations des cils moteurs	55
4.	Perspectives.....	55
5.	Conclusions	57
Chapitre IV : La voie Hedgehog		61
1.	Découverte de la voie Hedgehog	61
2.	Acteurs principaux de la voie Hedgehog chez les vertébrés	61
2.1.	Les ligands : de la synthèse à la sécrétion.....	62
2.1.1.	Généralités sur les trois ligands.....	62
2.1.2.	Synthèse et modification de <i>Sonic hedgehog</i>	62
2.1.3.	Sécrétion et distribution de la forme mature de <i>Sonic hedgehog</i>	63
2.2.	Les récepteurs de la voie Hedgehog	64
2.2.1.	Patched.....	64
2.2.2.	Smoothened	64
2.3.	Les facteurs de transcription Glis	65
3.	Réception et transduction du signal de la voie Hedgehog	65
3.1.	Signalisation en absence du ligand	65
3.1.1.	Inhibition de Ptch1 sur Smo	65
3.1.2.	Modifications et translocation de Gli3	66
3.2.	Signalisation en présence du ligand	67
3.2.1.	Fixation du ligand sur les récepteurs et corécepteurs	67
3.2.2.	Transport et activation de Smo	68
3.2.3.	Modifications et translocation de Gli2	68
3.3.	Rétro-contrôle en présence du ligand	70
4.	Implications physiologiques de l'activation de la voie Hedgehog.....	70
4.1.	Dans le développement pulmonaire.....	70
4.2.	Dans l'homéostasie pulmonaire chez l'adulte	71

5.	Implications pathologiques de la voie Hedgehog	71
5.1.	Cancérogenèse	72
5.2.	Pathologies respiratoires chroniques.....	73
5.2.1.	Implication dans l’asthme.....	73
5.2.2.	Implication dans la bronchopneumopathie chronique obstructive	73
6.	Modulations pharmacologiques de la voie Hedgehog en clinique.....	74
	Objectifs de la thèse	78
	MATÉRIELS & MÉTHODES.....	80
1.	Recrutement des patients.....	81
1.1.	Fibroscopies	81
1.2.	Polypes nasaux.....	83
1.3.	Résections pulmonaires	83
2.	Culture cellulaire primaire	84
2.1.	Isolement des cellules épithéliales à partir des fibroscopies.....	84
2.2.	Isolement des cellules épithéliales à partir des polypes nasaux.....	84
2.3.	Différenciation de l’épithélium.....	85
2.4.	Modulation de la voie de signalisation médiée par Shh ou GPC3.....	85
3.	Analyses transcriptomiques.....	86
3.1.	Extraction d’acides nucléiques issus de fibroscopies pour séquençage.....	86
3.2.	Extraction d’acides nucléiques issues de fibroscopies pour RT-qPCR	87
3.3.	Transcription inverse	87
3.4.	PCR.....	87
3.5.	Analyses des données de qPCR	88
4.	Immunomarquages et analyses.....	88
4.1.	Immunomarquages des coupes en paraffine	88
4.2.	Immunomarquages des membranes d’inserts	90
4.3.	Immunomarquages des cytopspins	90
4.4.	Analyses par microscopie	91
4.4.1.	Analyse des coupes FFPE et cytopspins.....	91

4.4.2. Analyse des membranes d'inserts.....	91
5. Analyses de données publiques.....	92
5.1. Single cell.....	92
5.2. STRING.....	93
5.3. Données publiques GSE.....	93
6. Statistiques.....	93
RÉSULTATS.....	94
1. Analyse des corécepteurs de la voie HH.....	95
2. Acteurs moléculaires altérés lors de l'inhibition de la voie HH.....	131
DISCUSSION.....	154
1. Coréception du ligand et remodelage épithélial : focus sur GPC3.....	155
2. Altération transcriptomique lors de l'inhibition de la voie HH au cours de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes : focus sur POU5F1.....	157
PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....	160
1. Perspectives de l'étude.....	161
1.1. Investigations complémentaires sur GPC3 et POU5F1.....	161
1.2. Vers un atlas complet de la voie HH dans le poumon adulte.....	162
1.3. Altération spécifique de la structure/signalisation ciliaire en lien avec la modulation de la voie HH.....	163
1.4. Etude fonctionnelle de l'implication de la voie HH sur le remodelage.....	165
2. Conclusions.....	166
BIBLIOGRAPHIE.....	167
SERMENT DOCTORAL D'INTÉGRITÉ SCIENTIFIQUE.....	192

Communications scientifiques

Publications

POU5F1 bridges Hedgehog signalling and epithelial remodelling in COPD

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Pauline Mulette, Audrey Brisebarre, Lynda Saber Cherif, Maëva A. Devilliers, Sarah Hatoum, Julien Ancel, Gonzague Delepine, Anne Durlach, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

[soumis]

Glypican-3 is a key tuner of the Hedgehog pathway in COPD

Laure M. G. Petit, Lynda Saber Cherif, Maëva A. Devilliers, Sarah Hatoum, Julien Ancel, Gonzague Delepine, Anne Durlach, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Christophe Ruaux, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

[soumis]

Peribronchial inflammatory cell assessment in COPD lung tissues

Maëva A. Devilliers, Lynda Saber Cherif, Laure M. G. Petit, Nathalie Lalun, Arnaud Bonnomet, Anne Durlach, Gonzague Delepine, Myriam Polette, Jeanne-Marie Perotin, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy

Journal of Cellular and Molecular Medicine, [en revision]

Airway epithelial cell cilia transcriptomic dysregulation is associated with the inflammatory phenotype in asthma

Maëva A. Devilliers, Audrey Brisebarre, Laure M. G. Petit, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Ratko Djukanović, Valérian Dormoy, Jeanne-Marie Perotin, U-BIOPRED consortium

10.1111/all.16063

Allergy, 2024

Airway epithelial ciliated cells in adult lung homeostasis and COPD

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Lynda Saber Cherif, Myriam Polette, Jeanne-Marie Perotin, Nathalie Spassky, Charles Pilette, Denise Al Alam, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy

10.1183/16000617.0106-2023

European Respiratory Review, 2023

The Nicotinic Receptor Polymorphism rs16969968 Is Associated with Airway Remodeling and Inflammatory Dysregulation in COPD Patients

Lynda Saber Cherif, Zania Diabasana, Jeanne-Marie Perotin, Julien Ancel, Laure M. G. Petit, Maëva A. Devilliers, Arnaud Bonnomet, Nathalie Lalun, Gonzague Delepine, Uwe Maskos, Philippe Gosset, Myriam Polette, Anaëlle Muggeo, Thomas Guillard, Gaëtan Deslée, Valérian Dormoy

10.3390/cells11192937

Cells, 2022

Communications orales

Cilia and chronic obstructive pulmonary disease

Laure M. G. Petit

Séminaire invité, Université de Southampton, Royaume-Uni (Décembre 2023)

Cils et Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Laure M. G. Petit

« Ma thèse en 180 secondes », Reims, France (Mars 2023)

Caractérisation des marqueurs pulmonaires de la voie Hedgehog dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

Carrefour Pathologie, Paris, France (Novembre 2022)

Silence, ça tousse

Laure M. G. Petit, Emma Loeffler

Vulgarisation scientifique, Bibliothèque Universitaire, Reims, France (Mars 2021)

Communications par voie d'affiche

Identification of novel Hedgehog signalling modulators altered in COPD patients

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Audrey Brisebarre, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

ERS International Congress, Milan, Italie (Septembre 2023)

Glypicans as key players for Hedgehog signalling in pulmonary diseases

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

EMBO « Hedgehog signalling », Sant Feliu de Guixols, Espagne (Avril 2023)

Caractérisation des marqueurs pulmonaires de la voie Hedgehog dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

Journée des jeunes chercheurs en Santé, Reims, France – Premier prix (Octobre 2022)

Caractérisation des marqueurs pulmonaires de la voie Hedgehog dans la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Laure M. G. Petit, Randa Belgacemi, Julien Ancel, Pauline Mulette, Myriam Polette, Gaëtan Deslée, Jeanne-Marie Perotin, Valérian Dormoy

Journée de recherche respiratoire, Reims, France (Octobre 2022)

Liste des abréviations

A

AAT	α -1 antitrypsine
AEC	<i>Airway epithelial cells</i>
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATO	Trioxide d'arsenic

B

Boc	<i>Brother of CDO</i>
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>

C

CAT	<i>COPD Assessment Test</i>
CC10	<i>Club Cell 10-kDa protein</i>
CCQ	<i>Clinical COPS Questionnaire</i>
Cdo	<i>Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CHRNA5	<i>Cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit</i>
Ci	<i>Cubitus interruptus</i>
CK1	<i>Casein Kinase I</i>
COL1A1	<i>Collagen type 1α1</i>
CPT	Capacité Pulmonaire Totale
CRD	<i>Cysteine-rich domain</i>
CSI	Corticostéroïdes inhalés
CT	<i>Cycle threshold</i>
CVF	Capacité Vitale Forcée

D

Dhh	<i>Desert hedgehog</i>
Disp1	<i>Dispatched-1</i>
DLCO	Diffusion du monoxyde de carbone

E

ECBC	Examen Cytobactériologique des Crachats
EFR	Explorations fonctionnelles respiratoires
EVC	<i>Ellis-van Creveld syndrome protein</i>

F

FAM13A	<i>Family with sequence similarity 13 Member A</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
FGF-10	<i>Fibroblast Growth Factor-10</i>
Fn	Fibronectine
FoxI1/J1	<i>Forkhead box protein I1/J1</i>

G

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Gas1/8	<i>Growth arrest-specific protein 1/8</i>
GDS	Gaz du sang
Gli	<i>Glioma-associated oncogen</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPC3/5/6	<i>Glypican 3/5/6</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR161	<i>G-protein coupled receptor 161</i>
GRK2	<i>G-protein-coupled receptor kinase 2</i>
GSK3β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>

H

HH	<i>Hedgehog</i>
Hhat	<i>Hedgehog acyltransferase</i>
Hhip	<i>Hedgehog interacting protein</i>

I

IAL	Interface air-liquide
IFT	<i>Intraflagellar Transport</i> - Transport intraflagellaire
Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
IL-1β/4	<i>Interleukine-1β/4</i>

J

JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
------------	-------------------------------------

K

Kif3A/7	<i>Kinesin-like protein 3A/7</i>
KRT5/14	<i>Keratin 5/14</i>

L

LABA	<i>Long-acting beta agonists</i>
LAMA	<i>Long-acting muscarinic antagonists</i>
LBA	Lavage broncho-alvéolaire

M

MCC	<i>Multiciliated cells</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
mMRC	<i>modified Medical Research Council</i>

P

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDE4	Phosphodiesterase 4
PKA	<i>Protein Kinase A</i>

Pn I/II Pneumocytes de type I/II
Ptc / Ptch *Patched*

R

ROS *Reactive oxygen species* – Espèces réactives de l’oxygène

S

SABA *Short-acting beta agonists*
SAMA *Short-acting muscarinic antagonists*
ScRNAseq Séquençage en cellule unique
Scube2 *Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2*
SERPINA1 *Serpin family A member 1*
Shh *Sonic hedgehog*
Shh-Np *Processed Shh amino-terminal*
Smo *Smoothened*
Smurf *Smad ubiquitination regulatory factor*
SNPs *Single nucleotide polymorphism*
SuFu *Suppresor of Fused protein*
SVF Sérum de veau foetal

T

TGF- β *Transforming growth factor beta*
TM Domaine transmembranaire
TNF- α *Tumor Necrosis Factor α*
Trp63 *Transformation related protein 63*
TVO *Trouble ventilatoire obstructif*

V

VEMS Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde
VR Volume Résiduel

W

WMIF *Whole mount immunofluorescence*

Z

ZO *Zonula occludens*

Liste des figures

Figure 1 : Organisation des voies aériennes inférieures humaines	24
Figure 2 : Organisation cellulaire des tissus pulmonaires.....	26
Figure 3 : Structure du cil moteur	28
Figure 4 : Structure de la barrière alvéolo-capillaire.....	30
Figure 5 : Intégrité épithéliale assurée par différentes jonctions intercellulaires.....	32
Figure 6 : Régénération d'un épithélium pulmonaire fonctionnel en cas de lésion et anomalies de différenciation.....	33
Figure 7 : Clairance mucociliaire selon le modèle de gel en brosse	34
Figure 8 : Facteurs de risques au développement de la BPCO	36
Figure 9 : Mesures des volumes pulmonaires lors d'exploration fonctionnelle respiratoire ...	40
Figure 10 : Classification des patients BPCO selon les données de spirométrie, d'exacerbations et de symptômes	41
Figure 11 : Algorithme de prise en charge thérapeutique des patients BPCO.....	43
Figure 12 : Caractéristiques physiopathologiques principales de la BPCO.....	44
Figure 13 : Schéma de la voie de signalisation Hedgehog chez la drosophile.....	61
Figure 14 : Modifications post-transcriptionnelles de Sonic hedgehog.....	62
Figure 15 : Sécrétion et distribution de Sonic Hedgehog.....	63
Figure 16 : Domaines et motifs des facteurs de transcription Glis	65
Figure 17 : Hypothèse d'inhibition de Patched-1 sur Smoothened.....	66
Figure 18 : Signalisation de la voie Hedgehog en absence du ligand	67
Figure 19 : Fixation du Shh-Np sur Ptch1 par l'intermédiaire de corécepteurs.....	68
Figure 20 : Signalisation de la voie Hedgehog en présence du ligand.....	69
Figure 21 : Mécanismes d'action de la voie Hedgehog dans la cancérogenèse.....	72
Figure 22 : Implications d'un SNP proche de Hhip dans la BPCO	74
Figure 23 : Modulateurs pharmacologiques et cibles de la voie Hedgehog.....	76
Figure 24 : Plan expérimental de l'étude des éléments secondaires de la voie HH.....	79
Figure 25 : Populations cellulaires pulmonaires établies par le HLCA	92
Figure 26 : Schéma bilan de GPC3 et POU5F1 régulant la voie HH dans la BPCO.....	159
Figure 27 : Exemples de localisation de GAS1, corécepteur de la voie HH.....	163
Figure 28 : Analyse protéomique de l'inhibition de la voie HH	164
Figure 29 : Analyses structurales et ioniques des cils dans un contexte d'inhibition de la voie HH.....	165

Figures des articles :

Glypican-3 is a key tuner of the Hedgehog pathway in COPD

Figure 1: Expression of GPC3 at a single-cell resolution in the human airways.....117

Figure 2: GPC3 transcript levels are decreased in COPD patients.....118

Figure 3: GPC3 transcript levels are associated with lung function in COPD patients.....119

Figure 4: Localisation of GPC3 in isolated AEC of non-COPD and COPD patients.....120

Figure 5: Localisation of GPC3 on FFPE lung tissues of non-COPD and COPD patients.....121

Figure 6: GPC3 inhibition by Codrituzumab alters AEC differentiation.....122

Figure S1: The treatment with Codrituzumab did not alter GPC3 localisation.....125

Figure S2: The treatment with Codrituzumab did not impact the Wnt pathway.....126

Figure S3: The treatment with Codrituzumab did not alter basal cell proportions.....127

Figure S4: The treatment with Codrituzumab did not alter the proliferative index.....128

POU5F1 bridges Hedgehog signalling and epithelial remodelling in COPD

Figure 1: Transcriptomic profiling of AB5E1-treated AEC.....143

Figure 2: POU5F1 is altered in COPD patients.....145

Figure S1: POU5F1 transcript level is not correlated with clinical parameters in COPD patients.....148

Listes des tableaux

Tableau 1 : Essais cliniques des inhibiteurs de Smo dans le contexte pulmonaire	75
Tableau 2 : Paramètres cliniques des patients inclus pour les cultures en interface air-liquide et les cytopspins	82
Tableau 3 : Paramètres cliniques des patients inclus pour les marquages sur les tissus FFPE	83
Tableau 4 : Sondes utilisées pour les qPCR.....	88
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés.....	89

Tableaux des articles :

Glypican-3 is a key tuner of the Hedgehog pathway in COPD

Table 1: Clinical characteristics of patients.....	124
Table S1: List of antibodies.....	129
Table S2: Clinical characteristics of patients from GSE datasets.....	130

POU5F1 bridges Hedgehog signalling and epithelial remodelling in COPD

Table S1: Clinical characteristics of the patients included for FFPE immunostaining and RTqPCR.....	149
Table S2: Clinical characteristics of the patients included for RNAseq analysis upon AB5E1 treatment.....	150
Table S3: Clinical characteristics of patients from GSE137557.....	151
Table S4: List of significantly deregulated genes in AB5E1-treated AEC.....	152

AVANT-PROPOS

Cette thèse intitulée « Identification et caractérisation de nouveaux régulateurs de la voie Hedgehog dans l'homéostasie pulmonaire et la BPCO » a été effectuée à Reims, au sein du laboratoire INSERM UMR-S 1250 « Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire » (P3Cell) sous la direction du Docteur Valérian Dormoy et de la Professeure Jeanne-Marie Perotin du 15 octobre 2021 au 16 octobre 2024. L'équipe s'intéresse à identifier et caractériser les mécanismes impliqués dans la genèse des pathologies respiratoires telles que la mucoviscidose, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme et les cancers du poumon en se focalisant sur la plasticité de l'épithélium des voies aériennes par des phénomènes de différenciation des cellules épithéliales.

L'un des axes de recherche majeurs explore le rôle de la ciliogenèse en lien avec la voie Hedgehog dans l'homéostasie pulmonaire et le remodelage associé à la BPCO. L'objectif principal de la thèse est de caractériser de nouveaux régulateurs de la voie Hedgehog dans le contexte pulmonaire et d'étudier leur implication dans le développement de la BPCO.

Le manuscrit de thèse s'articule en six parties. L'**introduction** est découpée en quatre chapitres dont le troisième est réalisé sous la forme d'une revue publiée. La partie **matériels et méthodes** est détaillée pour l'ensemble de l'étude comprenant l'origine du matériel biologique, les consommables et les procédures expérimentales. Les **résultats** sont divisés en deux parties, axées chacune sur une stratégie expérimentale et faisant l'objet de deux articles soumis. La **discussion** est centralisée sur l'analyse de chacun des deux articles. Enfin, les **perspectives** et la **conclusion** sont intégrées pour la globalité de l'étude et sont suivies des références bibliographiques parcourant l'ensemble du manuscrit.

INTRODUCTION

Chapitre I : L'appareil respiratoire humain

1. Généralités sur l'appareil respiratoire

1.1. Organisation de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire humain est un ensemble d'organes contenant les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire pour assurer la fonction de respiration. Les voies aériennes supérieures sont exclusivement extra-pulmonaires et comprennent la cavité nasale, le pharynx et le larynx, alors que les voies aériennes inférieures sont extra-pulmonaires et intra-pulmonaires et comprennent la trachée et les poumons (**Figure 1**). L'appareil respiratoire comporte une zone de conduction de l'air assurée par les voies aériennes dans une phase ventilatoire (inspiration et expiration) et une zone alvéolo-capillaire assurée par le parenchyme pulmonaire dans une phase respiratoire. En effet, l'air inspiré riche en oxygène transite de la cavité nasale jusqu'aux bronchioles en subissant une humidification, une filtration et un réchauffement. Il est par la suite acheminé jusqu'au parenchyme pulmonaire, lieu des échanges gazeux. La paroi alvéolaire en contact avec les capillaires sanguins permet une bonne diffusion du dioxygène (O_2) vers le sang et du dioxyde de carbone (CO_2) vers les alvéoles. Le CO_2 suivra le chemin inverse à travers l'air expiré et sera expulsé du corps.

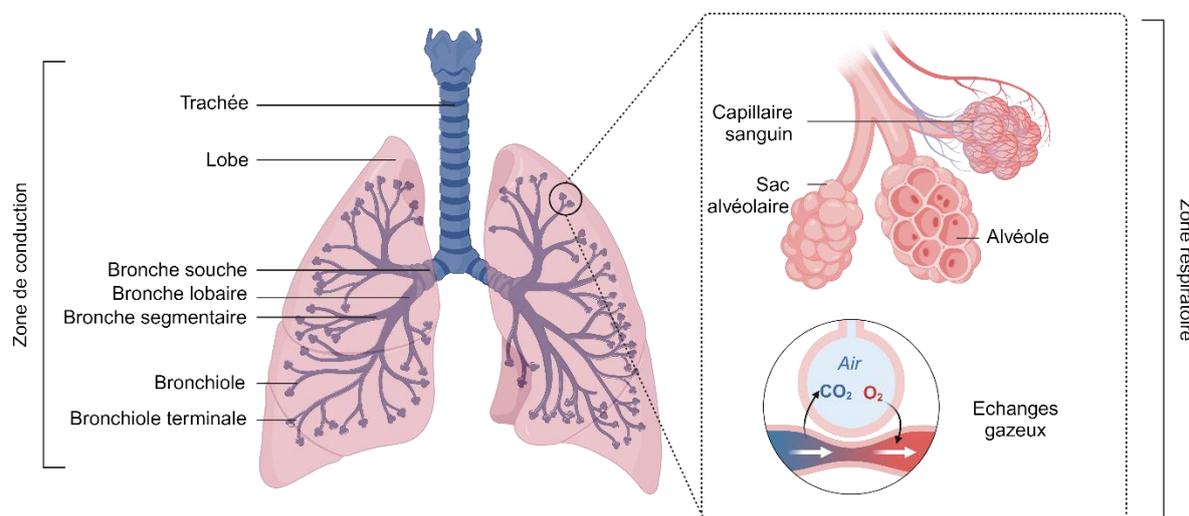


Figure 1 : Organisation des voies aériennes inférieures humaines

1.2. Caractéristiques générales du poumon

Le poumon est un organe thoracique indispensable pour la respiration dont le développement s'effectue à partir de l'endoderme pour les tissus épithéliaux et du mésoderme pour les tissus non-épithéliaux. Son organisation dichotomique d'une vingtaine de générations permet une grande surface de conduction et d'échanges [1]. Concernant la partie conductrice, la trachée se divise, dès les premières semaines embryonnaires, en deux bronches souches entrant chacune dans un poumon au niveau d'une région appelée le hile. La bronche souche du poumon droit se ramifie en trois bronches lobaires correspondant aux trois lobes de ce poumon alors que la bronche souche du poumon gauche se dédouble en deux bronches lobaires correspondant aux deux lobes de ce poumon. Les bronches lobaires se divisent pour former les bronches segmentaires et sous-segmentaires. Enfin, à partir de la 10^{ème} semaine embryonnaire, ces dernières se ramifient pour donner naissance aux bronchioles et bronchioles terminales. La zone alvéolaire est, quant à elle, contenue dans les lobules pulmonaires. Elle se met en place à partir de la 16^{ème} semaine embryonnaire et continue son développement jusqu'à 3 ans post-natal. Elle se constitue de bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des sacs alvéolaires contenant les alvéoles (**Figure 1**).

2. Populations cellulaires pulmonaires

2.1. Organisation histologique des voies aériennes

Les voies aériennes sont constituées de trois tuniques concentriques. La muqueuse est composée d'un épithélium reposant sur la membrane basale et du chorion essentiellement constitué de fibres élastiques produites par les fibroblastes. Cette tunique est également vascularisée et comporte des follicules lymphoïdes. La sous-muqueuse est composée de cellules musculaires lisses assurant la plasticité des voies aériennes. Elle comprend des glandes séro-muqueuses dans la partie proximale de l'arbre respiratoire. De plus, elle est composée d'îlots discontinus et circulaires de cartilage de type hyalin qui assurent la rigidité et le maintien de la structure de la trachée et des bronches. Enfin, l'adventice est un tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Au niveau alvéolaire, il disparaît pour laisser place à l'interstitium pulmonaire connectant les alvéoles entre elles.

Les différents compartiments de l'appareil respiratoire sont tapissés de tissus épithéliaux et non-épithéliaux avec des compositions cellulaires différentes afin d'assurer une fonction spécifique (conduction de l'air et échanges gazeux) (**Figure 2**).

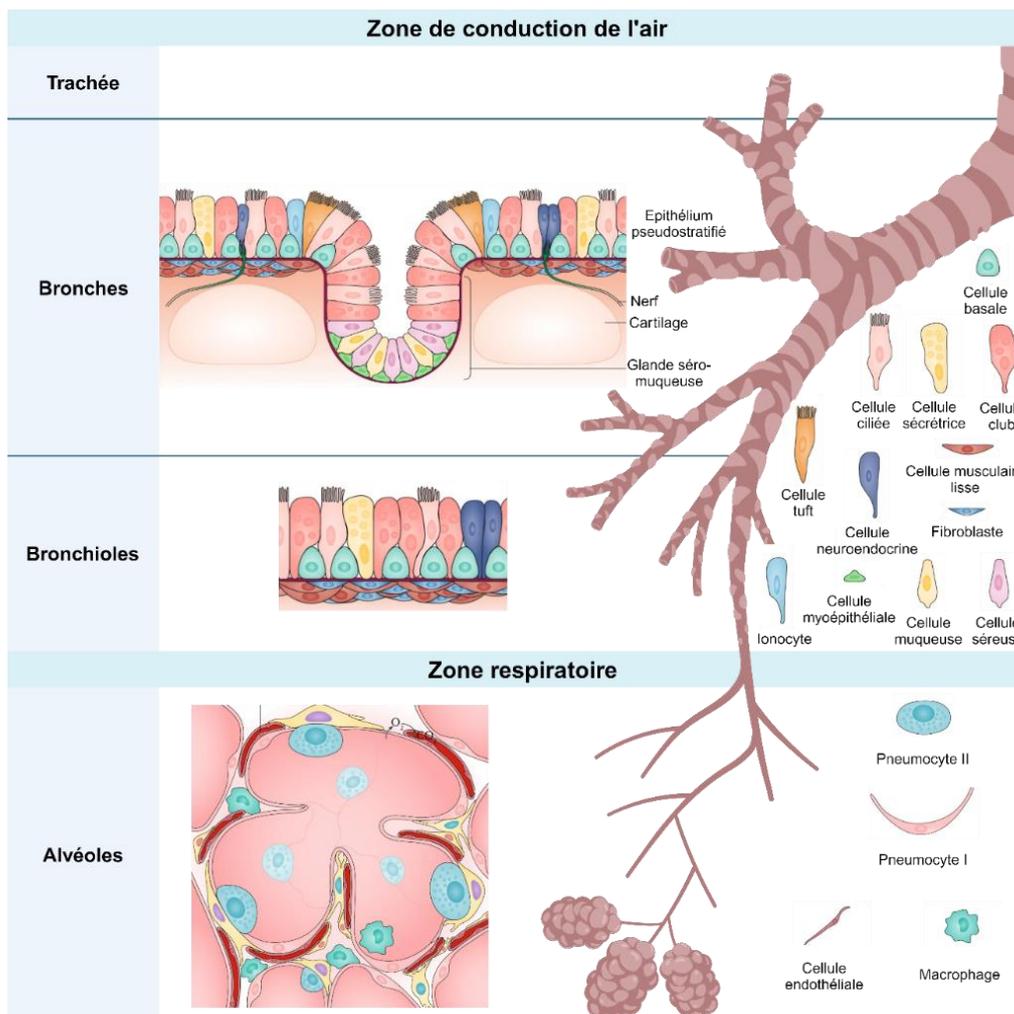


Figure 2 : Organisation cellulaire des tissus pulmonaires

(modifié d'après Zepp et Morrissey, 2019)

2.2. Tissus épithéliaux

Les voies aériennes sont composées de trois épithéliums principaux, bronchique ou respiratoire, bronchiolaire et alvéolaire. L'épithélium tapissant les bronches et les larges bronchioles est pseudostratifié et constitué majoritairement de cellules basales, multiciliées et sécrétrices. L'épithélium devient unistratifié et cubique dans les bronchioles de plus petits diamètres et pavimenteux dans les alvéoles [2,3]. L'épithélium est séparé des tissus non-épithéliaux par la membrane basale permettant l'adhésion des cellules et la polarité cellulaire. Elle est composée de la lame basale, sur laquelle reposent toutes les cellules épithéliales, et de la lame réticulaire sécrétée par les fibroblastes [4]. La composition cellulaire de l'épithélium est en constante évolution par l'identification de nouveaux types cellulaires, parfois intermédiaires, par séquençage en cellule unique (scRNAseq) [5,6].

2.2.1. Les cellules basales

Les cellules basales sont de forme pyramidale et reposent sur la lame basale sans atteindre la lumière des voies aériennes. Elles sont localisées de la trachée jusqu'au bronchioles, avec une diminution progressive de leur nombre le long de l'axe proximo-distal (30 à 6% respectivement), jusqu'à une disparition complète dans les alvéoles [7]. Elles sont caractérisées par l'expression de protéines spécifiques, telles que Trp63 (*Transformation related protein 63*) et KRT5/14 (*Keratin 5/14*) [8–10]. Les cellules basales sont considérées comme progénitrices et multipotentes. En effet, elles permettent le maintien de l'homéostasie dans un état de quiescence et assurent la réparation et la régénération d'un épithélium fonctionnel après une lésion [11]. Elles sont capables de proliférer et de se différencier en deux types cellulaires majoritaires, les cellules multiciliées et les cellules sécrétrices [12]. Le devenir des cellules est influencé par différentes voies de signalisation, notamment Notch. Une forte activation de la voie entraîne une différenciation en faveur des cellules sécrétrices, alors qu'une faible activation oriente la différenciation vers les cellules multiciliées [13].

2.2.2. Les cellules multiciliées

Les cellules multiciliées sont issues de la différenciation des cellules basales ou de la trans-différenciation des cellules sécrétrices et représentent environ 50% des cellules de l'épithélium bronchique et bronchiolaire. De forme cylindrique, les cellules multiciliées sont totalement différenciées et expriment le facteur FoxJ1 (*Forkhead box J1*) [14]. Elles présentent de nombreux cils moteurs localisés à la surface apicale (200-300 cils par cellule), mesurant 6-7 μm . Ils sont constitués d'un axonème, d'une zone de transition et d'un corps basal (**Figure 3**). La structure de l'axonème est de 9+2, deux microtubules centraux et 9 doublets de microtubules périphériques entourés d'une membrane continue avec la membrane plasmique [15]. La formation et le maintien de cette structure fait intervenir le transport intraflagellaire (IFT - *Intraflagellar Transport*), rétrograde sous le contrôle de kinésines, de la base au sommet du cil et antérograde sous le contrôle de dynéines, du sommet vers la base. Les ponts de nexine reliant les doublets de microtubules, les bras de dynéine internes et externes et l'hydrolyse d'ATP assurent un battement ciliaire coordonné et synchrone participant à la clairance mucociliaire à une fréquence de 12-15 Hz. Cette fréquence peut être altérée par des stimuli environnementaux, tels que la température, le taux de calcium intracellulaire, des toxines, des antimicrobiens ou antiviraux [16].

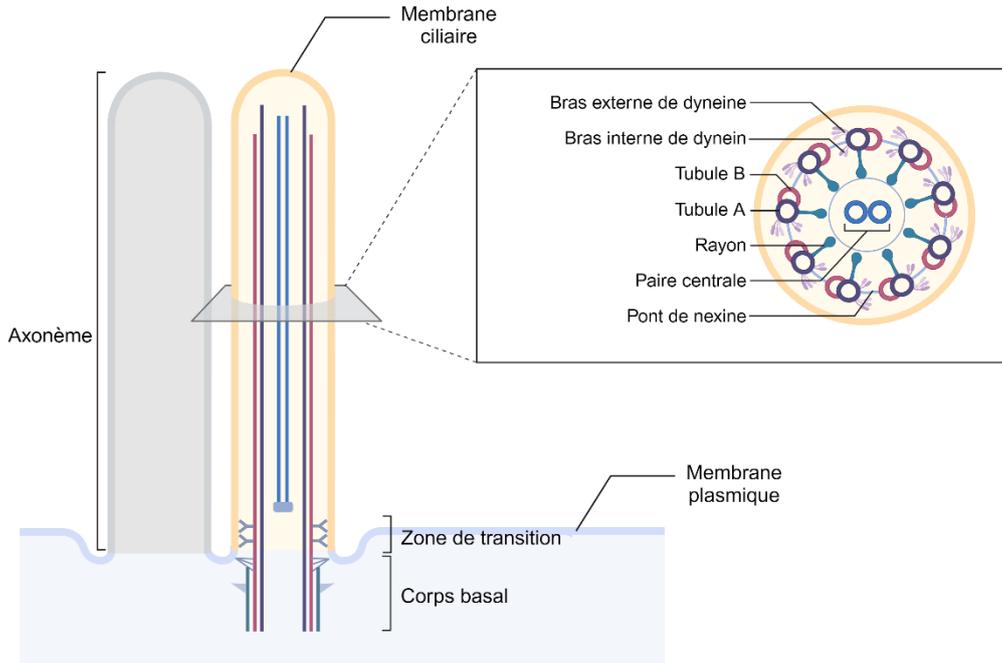


Figure 3 : Structure du cil moteur

2.2.3. Les cellules sécrétrices

Les cellules sécrétrices peuvent être de trois types selon leur localisation et leur sécrétion : les cellules caliciformes, les cellules club et les cellules glandulaires (muqueuses et séreuses).

Les cellules caliciformes représentent 5 à 15% des cellules de l'épithélium des voies aériennes. Elles possèdent un noyau en position basale et des granules de sécrétion au pôle apical. Ces derniers contiennent des électrolytes, comprenant des métabolites, des peptides antimicrobiens et des mucines [17]. Ces granules sont sécrétés par hydrolyse d'ATP pour former le mucus après son hydratation sous le contrôle de canaux ioniques. Le mucus est composé d'eau, de mucines, de sel et de protéines. La mucine majoritaire sécrétée par les cellules caliciformes est Muc5ac [18]. Les cellules caliciformes sont majoritairement présentes au niveau bronchique, laissant place aux cellules club dans l'épithélium bronchiolaire.

Les cellules club, autrefois appelées cellules de Clara, représentent 10% des cellules épithéliales présentes dans la partie distale des voies aériennes. Elles sont de forme cubique et présentent de nombreux granules riches en eau au pôle apical. Le principal produit de sécrétion est l'utéroglobine, également appelé CC10 (*Club Cell 10-kDa protein*), mais elles sécrètent également des protéines stabilisatrices du surfactant (*surfactant proteins A, B, and D*) [19].

Les cellules club ont un rôle de protection de l'épithélium par une action anti-inflammatoire, anti-oxydante et détoxification. Elles inhibent la synthèse de produits de sécrétion des leucocytes entraînant une diminution du chimiotaxisme des cellules immunitaires [20]. Elles possèdent également une capacité de renouvellement et de réparation tissulaire. En effet, elles sont considérées comme cellules intermédiaires et peuvent se différencier en cellules multiciliées et caliciformes ou se dédifférencier en cellules basales en cas de lésion pour régénérer un épithélium fonctionnel [21,22].

L'épithélium bronchique est un épithélium de revêtement qui peut pénétrer dans la couche sous-jacente pour former l'épithélium glandulaire dans les glandes séro-muqueuses. Il est composé de cellules muqueuses (60%) et de cellules séreuses (40%) [23]. Les cellules muqueuses sont semblables aux cellules caliciformes et sécrètent majoritairement la mucine Muc5b. Les cellules séreuses, quant à elles, sécrètent de nombreuses protéines, telles que des protéoglycanes ou des peptides antimicrobiens. Ces produits de sécrétion sont excrétés dans des canaux et remontés à la surface de l'épithélium par le mucus. Cet épithélium glandulaire est bordé par des cellules myoépithéliales aidant l'expulsion du mucus par leurs propriétés contractiles. Les cellules myoépithéliales semblent également impliquées dans le renouvellement de l'épithélium de revêtement lors d'importantes lésions par prolifération, migration et différenciation [24,25]. Toutefois, ce mécanisme n'est pas encore élucidé.

2.2.4. Les ionocytes

Identifiés récemment, les ionocytes sont des cellules présentes en faible quantité dans l'épithélium des voies aériennes (1-2% des cellules). Elles sont dérivées des cellules basales et sont riches en mitochondries, témoignant d'une forte activité métabolique. Elles présentent une forte expression du canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) et de FoxI1 (*Forkhead box I1*) [26,27]. Leur implication dans la mucoviscidose ainsi que leur rôle dans l'homéostasie de l'épithélium bronchique et bronchiolaire fait l'objet de nombreuses études.

2.2.5. Les cellules neuroendocrines

De forme pyramidale, les cellules neuroendocrines sont présentes en très faible quantité le long de l'épithélium bronchique et bronchiolaire, notamment au niveau des zones de bifurcation de l'arbre respiratoire [28]. Elles sont retrouvées isolées ou regroupées dans des clusters appelés corps neuro-épithéliaux. Elles possèdent de nombreux chémorécepteurs au pôle apical ayant un rôle de senseur à différents stimuli tels que la pression de l'air, les taux d'O₂ et de CO₂, les ions H⁺ et la nicotine [29]. Elles participent à la communication avec le système nerveux et le système immunitaire par sécrétion de granules contenant des neurotransmetteurs et des neuropeptides tels que la sérotonine, la bombésine et CGRP (*calcitonin gene-related peptide*). Ces produits de sécrétion modulent la réponse immunitaire en influençant la production de cytokines ou le recrutement de populations cellulaires [30]. Ils agissent sur la bronchoconstriction et sur la régulation de la sécrétion du mucus. Les cellules neuroendocrines pourraient également être impliquées dans la régénération d'un épithélium fonctionnel.

2.2.6. Les pneumocytes

Les alvéoles sont les unités fonctionnelles du poumon, lieu des échanges gazeux. Elles sont composées de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I (PnI) et les pneumocytes de type II (PnII) (**Figure 4**).

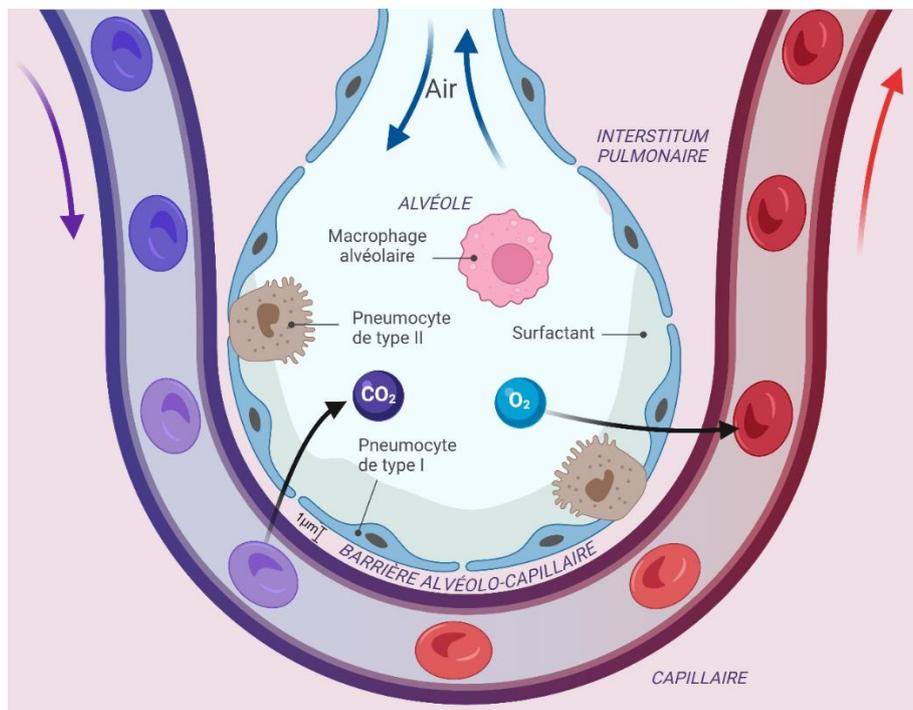


Figure 4 : Structure de la barrière alvéolo-capillaire

Les PnI représentent plus de 90% de la surface alvéolaire. Ils possèdent de longues extensions cytoplasmiques et un noyau débordant dans la lumière alvéolaire. Accolés aux cellules endothéliales des capillaires sanguins, leur forme pavimenteuse permet une barrière alvéolo-capillaire très fine (inférieur à 1 μ m) facilitant les échanges gazeux entre l'air et le sang (**Figure 4**) [31]. Les échanges gazeux s'effectuent par diffusion passive en suivant un gradient de pression (de la plus élevée à la plus basse). Les PnI sont incapables de se diviser ou de s'auto-renouveler, impliquant la présence des PnII.

Les PnII sont larges et cubiques mais représentent une faible surface alvéolaire (4%) [32]. Ils présentent des microvillosités au pôle apical, de nombreuses mitochondries et des corps lamellaires cytoplasmiques. Ces corps lamellaires sont des granules de sécrétion contenant le surfactant pulmonaire [33,34]. Cette substance est composée à 90% de lipides et à 10% de protéines. Elle est sécrétée dans la lumière alvéolaire et assure un rôle de protection contre le collapsus des alvéoles en réduisant la tension de surface [35]. Elle contient également des peptides antimicrobiens et assure une défense contre les pathogènes pénétrant dans les alvéoles. Les PnII ont la capacité de s'auto-renouveler et de se trans-différencier en PnI en cas de lésions [36].

3. Fonctions de protection de l'épithélium

L'épithélium des voies aériennes met en place différents mécanismes pour protéger l'organisme des pathogènes inhalés tels qu'une barrière physique et la clairance mucociliaire.

3.1. Intégrité épithéliale

Les cellules épithéliales sont jointives et connectées entre elles par différentes jonctions assurant l'intégrité épithéliale (**Figure 5**). Les jonctions sont localisées des pôles apicaux aux pôles basolatéraux et sont reliées aux filaments du cytosquelette des cellules adjacentes. Les jonctions serrées sont localisées proches des pôles apicaux des cellules. Elles sont composées de complexes protéiques incluant des claudines, des occludines, ZO (*Zonula occludens*) et JAMs (*junctional adhesion molecule*). Elles assurent une régulation de la perméabilité paracellulaire par le contrôle du passage d'ions et de molécules [37].

Les jonctions adhérentes sont localisées en dessous des jonctions serrées. Elles se constituent de protéines telles que E-cadhérine et des protéines de la famille des caténines.

Elles permettent une cohésion cellulaire en influençant également la morphologie, la prolifération et la différenciation des cellules avoisinantes [38]. Les desmosomes sont reliés aux filaments intermédiaires et maintiennent la polarité et les contacts intercellulaires [39]. Enfin, les jonctions communicantes sont constituées de canaux et assurent une communication intercellulaire par l'échange de macromolécules et de métabolites [40]. Les cellules épithéliales sont également en contact avec la lame basale par des hémidesmosomes.

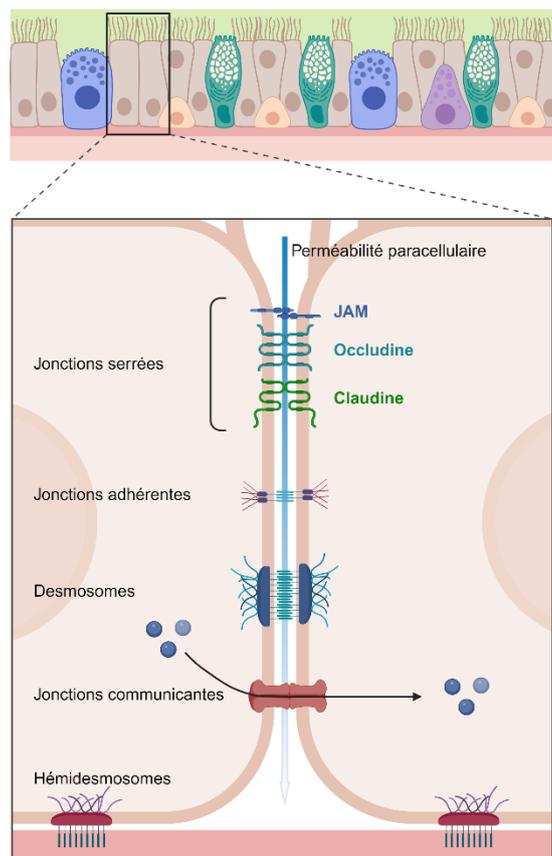


Figure 5 : Intégrité épithéliale assurée par différentes jonctions intercellulaires
(modifié d'après Steed et al., 2010)

Une altération de ces jonctions peut entraîner une persistance des pathogènes et une perméabilité non sélective engendrant une lésion pouvant aboutir à une desquamation plus ou moins complète des cellules épithéliales. Les populations progénitrices assurent un renouvellement et une différenciation pour régénérer un épithélium fonctionnel (**Figure 6**) [41]. En effet, les cellules basales bordant la zone de lésion s'étalent et migrent pour recouvrir la zone [42]. Ces cellules prolifèrent et forment un épithélium transitoire de type métaplasie malpighienne, caractérisé par l'empilement de cellules cubiques ou pavimenteuses. Enfin, les cellules se différencient en cellules sécrétrices et ciliées pour générer un épithélium fonctionnel.

Ces mécanismes de réparation tissulaire nécessitent l'intervention de cytokines, de facteurs de croissance et de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Une anomalie dans la régénération de l'épithélium peut aboutir à une lésion pré-cancéreuse ou à un remodelage épithélial (métaplasie malpighienne, hyperplasie des cellules sécrétrices ou des cellules basales) caractéristique de plusieurs pathologies pulmonaires.

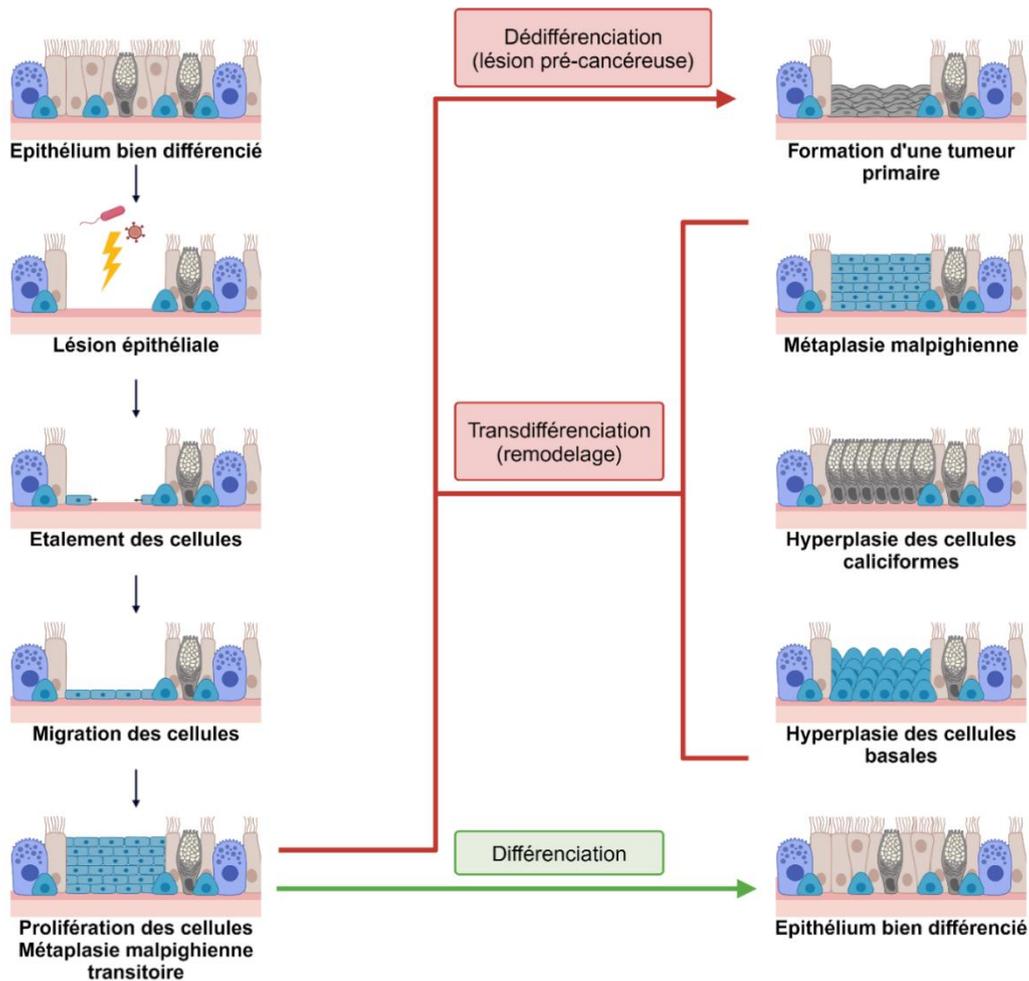


Figure 6 : Régénération d'un épithélium pulmonaire fonctionnel en cas de lésion et anomalies de différenciation

(modifié d'après Adam et al., 2014)

3.2. Clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est un mécanisme indispensable à la protection de l'organisme. Elle fait intervenir deux populations cellulaires, les cellules sécrétrices produisant le mucus et les cellules multiciliées permettant son transport et son évacuation par les cils et le liquide périciliaire. Ce modèle est appelé le modèle de gel en brosse (**Figure 7**).

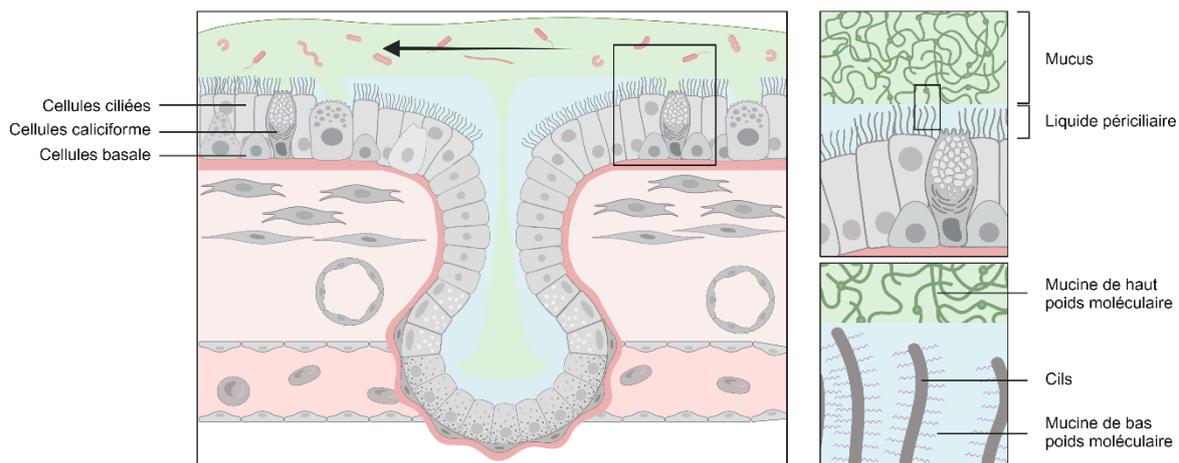


Figure 7 : Clairance mucociliaire selon le modèle de gel en brosse

Le liquide périciliaire est une couche aqueuse, d'une faible viscosité et d'une épaisseur quasiment équivalente à la longueur des cils. Il permet de faciliter le battement synchrone des cils par des propriétés lubrifiantes. Il est composé de mucines de faibles poids moléculaires (Muc1, Muc4, Muc16 et Muc20), de glycoprotéines et de peptides antimicrobiens [43]. Les composants forment un maillage de 20 à 40nm empêchant les particules inhalées et les constituants du mucus de pénétrer dans le liquide périciliaire. Son épaisseur est dépendante de son hydratation régulée par les flux transépithéliaux d'ions sodiques et chlorures [44]. Le maintien du mucus dans la couche supérieure est contrôlé par des pressions osmotiques. L'hydratation et le maintien des pressions osmotiques sont cruciaux pour assurer une clairance mucociliaire efficace. En effet, une faible épaisseur du liquide périciliaire peut entraîner un affaissement du mucus alors qu'une épaisseur trop importante ne permet pas de contact entre les cils et le mucus. Le mucus est produit par les cellules sécrétrices (caliciformes, glandulaires et club). Il est composé de mucines de hauts poids moléculaires, telles que Muc5ac et Muc5b majoritaires et Muc2, Muc8 et Muc19 en petites proportions [45]. Sa composition lui permet de capturer les pathogènes et particules inhalées. Sous hydrolyse d'ATP, le battement coordonné des cils permet le déplacement du mucus et son élimination par le système digestif [17]. Le mouvement ciliaire comporte deux phases. La première est une phase active qui permet la propulsion des cils et le transport du mucus. Une phase passive de retour à l'état initial est par la suite réalisée dans le liquide périciliaire [46].

Les différentes populations épithéliales ainsi que les mécanismes de défense de l'épithélium peuvent présenter des anomalies ou altérations pouvant conduire à différentes pathologies pulmonaires dont la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

Chapitre II : La bronchopneumopathie chronique obstructive

1. Définition et épidémiologie

La BPCO est une pathologie pulmonaire, caractérisée par des symptômes persistants (dyspnée, toux, exacerbations, expectorations) et une limitation des débits aériens causée par une obstruction permanente, progressive et irréversible des voies aériennes [47]. Bien qu'hétérogène du point de vue clinique et morphologique, la BPCO est typiquement caractérisée par la présence de symptômes de bronchite chronique, souvent associés à des lésions d'emphysème pulmonaire.

Cette pathologie affecte autant les hommes que les femmes mais l'incidence augmente avec l'âge, touchant principalement la population de plus de 45 ans [48]. Dans le monde, plus de 250 millions de personnes sont concernées. Elle se situe parmi les trois premières causes de mortalité, comptant 3,23 millions de décès en 2019, soit 5 à 6% des décès. En France, elle touche plus de 3,5 millions de personnes, soit 6 à 8% de la population adulte et représente 3% des décès. Les taux de mortalité et d'hospitalisation varient selon les régions françaises avec notamment des taux les plus élevés dans les Hauts-de-France, le Grand-Est et la Bretagne. Les études analysant l'épidémiologie de la BPCO ne sont pas fréquentes et les données sont probablement sous estimées par le sous-diagnostic de la pathologie, représentant 2/3 des patients ignorant en être atteints [49].

Les personnes atteintes de la BPCO ont également des risques plus accrus de développer d'autres pathologies, notamment cardiaques et pulmonaires. Le risque de développer un cancer du poumon est significativement augmenté, regroupant différents mécanismes physiopathologiques communs [50].

2. Les facteurs de risques

La BPCO est une pathologie multifactorielle (**Figure 8**). Les facteurs de risques peuvent être endogènes ou exogènes et varient géographiquement, selon les pays développés à revenu élevé et les pays en développement à faible et moyen revenu.

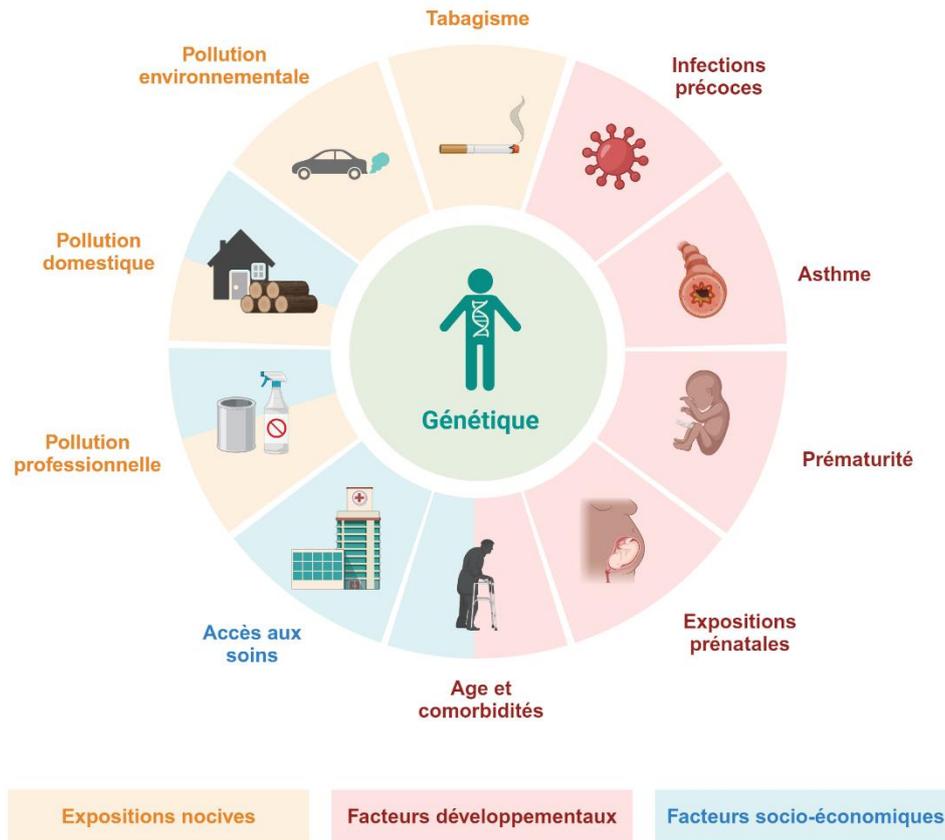


Figure 8 : Facteurs de risques au développement de la BPCO

(modifié d'après Christenson et al., 2022)

2.1. Expositions nocives

2.1.1. Le tabagisme

Le tabagisme est la principale cause de la BPCO dans les pays développés, représentant 70 à 80% des patients. Dans les pays en développement, il représente 30 à 40% des patients. La fumée de cigarette est constituée de composés toxiques, notamment de produits irritants et cancérigènes affectant les voies respiratoires et générant diverses pathologies pulmonaires [51]. Ces composés provoquent de multiples lésions au niveau des voies aériennes par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS - *Reactive oxygen species*) créant un stress oxydatif. Il participe à la mise en place de l'inflammation et induit également divers processus cellulaires tels que la prolifération anarchique et l'apoptose [52].

Au niveau épithélial, une perte d'intégrité et un remodelage sont observés lors de l'exposition à la fumée de cigarette. En effet, celle-ci provoque la synthèse de protéases impliquées dans le clivage de protéines associées aux jonctions intercellulaires [53].

De plus, elle provoque une diminution du nombre de cellules multiciliées, de la fréquence de battement ciliaire et de la longueur des cils [54,55]. Certains dommages peuvent être réversibles par le sevrage tabagique qui constitue la première ligne d'action pour les patients atteints de la BPCO.

Bien que les effets du tabagisme passif et des cigarettes électroniques ne soient pas aussi bien élucidés que ceux des cigarettes conventionnelles, ils provoquent également des lésions pulmonaires pouvant être impliquées dans le développement de la BPCO chez une population encore plus jeune [56,57].

Le tabagisme favorise le développement de la pathologie mais il existe également une susceptibilité, d'ordre environnementale, ou une prédisposition génétique.

2.1.2. La pollution de l'air

La pollution de l'air peut provenir de trois origines : environnementale, domestique ou professionnelle. Elle se propage sous forme de fumées, gaz ou particules affectant les voies respiratoires. Elle peut contribuer au développement de la BPCO chez des personnes n'ayant jamais été exposées au tabagisme.

La pollution environnementale est principalement composée de particules fines appelées PM_{2,5} et de résidus de dioxyde d'azote (NO₂) émis par les véhicules. L'exposition à de fortes concentrations de ces éléments est associée au développement de bronchite chronique dans différentes cohortes [58,59]. Ils sont responsables d'une réponse pro-inflammatoire accrue, d'une baisse de viabilité cellulaire et de la production de stress oxydatif néfaste pour les voies respiratoires [60,61]. La pollution environnementale peut donc engendrer des lésions pulmonaires ou provoquer des exacerbations dans un contexte de BPCO.

La pollution domestique est causée par la combustion de biomasse (charbon, bois, etc.) pour la cuisine et le chauffage. L'exposition à long terme aux particules émises par cette combustion est un facteur de risque aggravant de la BPCO, notamment dans les pays en développement utilisant encore majoritairement ces méthodes [62,63].

Enfin, la pollution d'origine professionnelle touche certains travailleurs dans les secteurs minier, agricole, textile, sidérurgique et du bâtiment [64,65]. Ils sont exposés chroniquement à des particules nocives contenues dans leurs outils de travail (peintures, pesticides...) provoquant des lésions des voies aériennes. La sévérité semble augmenter avec le temps d'exposition et le type de particules inhalées.

2.2. Facteurs génétiques

De nombreux facteurs génétiques sont étudiés pour déterminer une association au développement de la BPCO, tels que Hhip (*Hedgehog Interacting Protein*) et FAM13A (*Family with Sequence Similarity 13 Member A*) [66–68]. Toutefois, aucune implication physiopathologique de ces gènes n'a été mise en évidence dans la BPCO.

Une prédisposition a été démontré biologiquement associée à la BPCO, le déficit en α -1 antitrypsine. Le gène *SERPINA1* (*Serpin Family A Member 1*) code une enzyme, α -1 antitrypsine (AAT) produite par le foie et agissant comme inhibiteur de protéases au niveau pulmonaire notamment [69]. Elle assure la protection des alvéoles en inhibant les protéases produites par les neutrophiles, limitant ainsi la destruction des parois alvéolaires. Dans un cas de déficit en AAT, la concentration de l'enzyme étant trop faible, les parois sont peu à peu détruites provoquant un emphysème et un déclin de la fonction respiratoire, potentiellement associés à la BPCO [70].

Le gène *CHRNA5* (*Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 5 Subunit*) possède différents SNPs (*single nucleotide polymorphism*). Suite à la démonstration de son implication dans la fonction pulmonaire et la réponse inflammatoire dans des modèles de souris KI, il a été démontré biologiquement que le SNP rs16969968 est associé chez l'homme au remodelage épithélial bronchique et bronchiolaire caractéristique de la BPCO, tel qu'un défaut de ciliogénèse bronchique et de production de mucines bronchiolaires [71–73]. De plus, il est corrélé à une augmentation de sécrétion de médiateurs inflammatoires dans la BPCO. Des pistes de ciblage thérapeutique par des modulateurs allostériques spécifiques des récepteurs nicotiques sont en cours.

2.3. Facteurs développementaux et socio-économiques

Certains facteurs développementaux *in utero* ou dans l'enfance peuvent également être des facteurs de risques de la BPCO. En effet, une prématurité, ralentissant le développement pulmonaire ou encore des infections respiratoires sévères et/ou répétées (pneumonie, bronchiolite) peuvent entraîner des lésions propices au développement de la BPCO [74,75]. De plus, l'exposition prénatale à des substances nocives telles que la cigarette peut entraîner une prédisposition au développement de la pathologie à l'âge adulte [76]. Ces facteurs de risques sont aggravés avec l'âge et le déclin de la fonction pulmonaire.

Concernant les facteurs socio-économiques, l'accès aux soins difficile dans certains pays est un paramètre limitant dans la prise en charge des symptômes se répercutant sur le développement et l'évolution de la maladie.

3. Diagnostic et classification

Le diagnostic de la BPCO repose sur la mise en évidence d'un trouble ventilatoire obstructif (TVO) par spirométrie, et de lésions morphologiques scanographiques compatibles (emphysème, anomalies bronchiques). L'absence de biomarqueurs et la progression lente des symptômes ralentissent le diagnostic et la prise en charge des patients.

3.1. La spirométrie

La spirométrie est l'examen principal pour le diagnostic de la BPCO [47]. Il est réalisé dans les cas de suspicion de la pathologie, lorsque le patient présente différents symptômes (toux chronique, dyspnée, expectorations) ou lorsqu'il présente des facteurs de risques tels que le tabagisme. La spirométrie est un examen d'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) non-invasif permettant la mesure des volumes pulmonaires et des débits ventilatoires [77]. Les principales mesures sont le VEMS (Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde), correspondant à la quantité d'air expirée dans la première seconde, et la CVF (Capacité Vitale Forcée), correspondant à la quantité maximale d'air expirée après avoir inspiré profondément (**Figure 9**). Cet examen permet de révéler la présence ou non d'un TVO non réversible, défini comme un rapport VEMS/CVF (indice de Tiffeneau) mesuré après inhalation de bronchodilatateur de courte durée d'action, inférieur à 0,70. Cette mesure est corrélée à la sévérité de la pathologie [78].

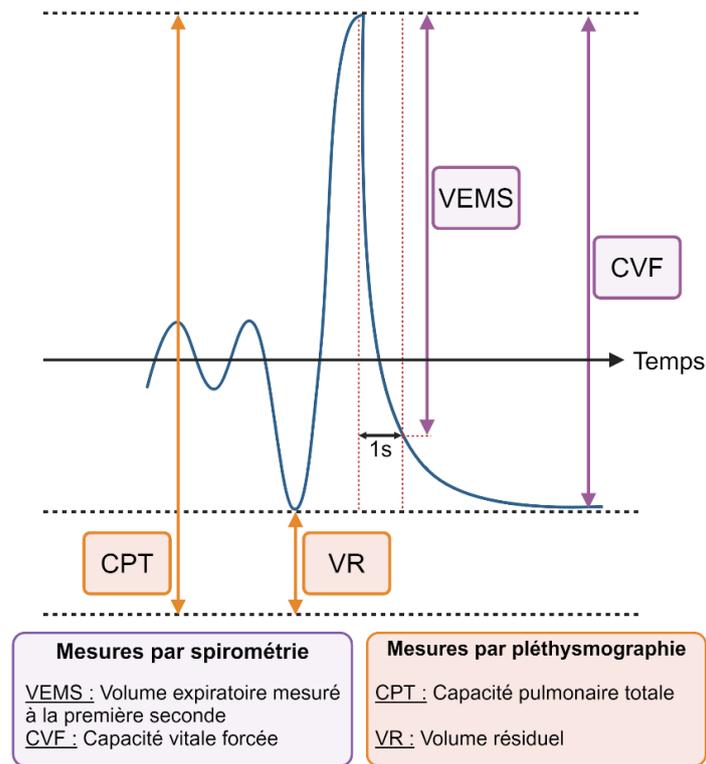


Figure 9 : Mesures des volumes pulmonaires lors d'exploration fonctionnelle respiratoire

3.2. Examens complémentaires

La suspicion ou la confirmation du diagnostic de la BPCO s'accompagne d'examen complémentaires permettant de rechercher la présence de diagnostics différentiels ou associés tels que l'asthme ou la dilatation des bronches. Un scanner thoracique est réalisé à la recherche de lésions pulmonaires, notamment un emphysème ou une modification structurelle, telle que l'épaississement des parois bronchiques [79]. L'emphysème peut également être évalué par pléthysmographie en observant une augmentation de la CPT (Capacité Pulmonaire Totale), du VR (Volume Résiduel) et du rapport VR/CPT, témoignant d'une distension pulmonaire (**Figure 9**). L'analyse de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) peut, en cas d'altération, suggérer l'existence d'un emphysème. Cette mesure permet d'évaluer la diffusion alvéolo-capillaire dépendant de la surface d'échange et de l'épaisseur de la barrière [80]. La recherche de facteurs génétiques, tels qu'un déficit en AAT, est également important pour déterminer l'origine potentielle de la pathologie, et l'indication éventuelle de traitement substitutif.

3.3. Classification

La classification des patients BPCO est nécessaire pour assurer une prise en charge thérapeutique optimale. Elle dépend notamment de paramètres phénotypiques tels que la sévérité de l'obstruction bronchique, de la dyspnée, la fréquence et la sévérité des exacerbations [47]. La sévérité de l'obstruction bronchique est évaluée par la valeur de VEMS lors de la spirométrie et permet de classer les patients en 4 stades (GOLD 1-2-3-4) (**Figure 10**). L'évaluation de la dyspnée et des symptômes est subjectivement réalisée par l'échelle mMRC (*modified Medical Research Council*) et les questionnaires CAT (*COPD Assessment Test*) ou CCQ (*Clinical COPD Questionnaire*). Enfin, l'historique des exacerbations permet de déterminer une classification GOLD A-B-E (Le GOLD-E combine les GOLD-C et GOLD-D des anciennes classifications). Les recommandations de prise en charge thérapeutique dépendent de cette classification. Un taux sérique élevé de polynucléaires éosinophiles pourrait également, dans certaines situations, avoir un impact sur la prise en charge thérapeutique.

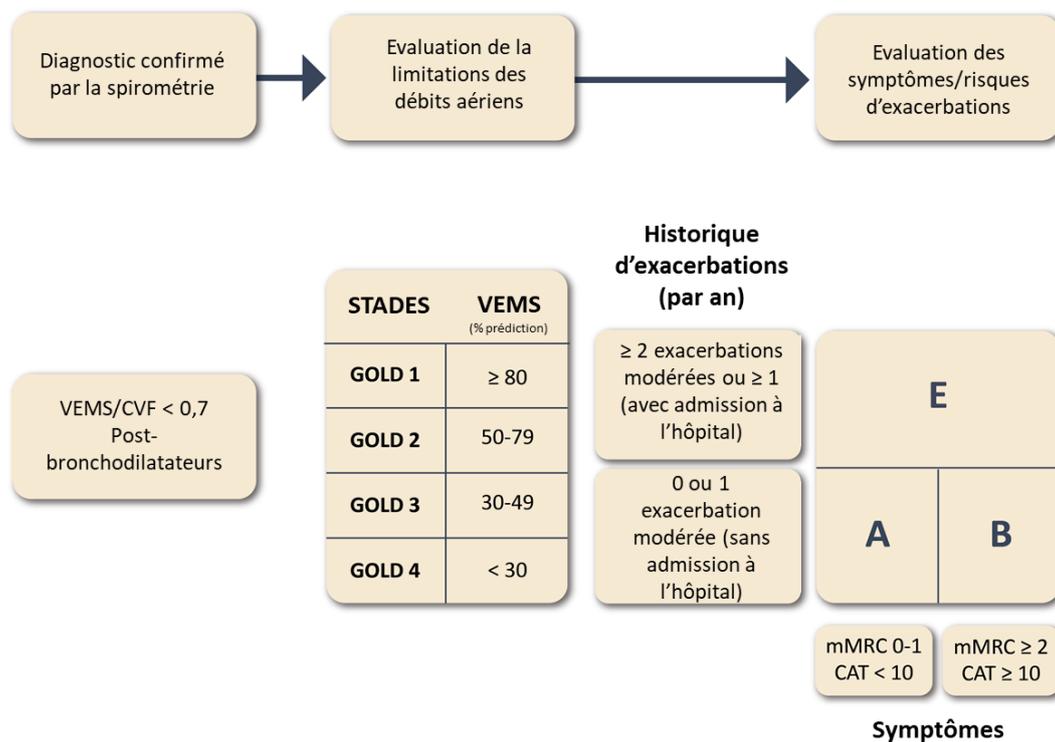


Figure 10 : Classification des patients BPCO selon les données de spirométrie, d'exacerbations et de symptômes
(modifié d'après Agusti et al., 2023)

L'étiologie de la BPCO est multifactorielle avec des facteurs environnementaux, développementaux ou socio-économiques. Une classification, proposée en 2023 et non utilisée actuellement en routine, regroupe les patients présentant les mêmes causes supposées de développement de la pathologie : génétique (COPD-G), anomalie développementale (COPD-D), tabagisme (COPD-C), pollution (COPD-P), infections (COPD-I), asthme (COPD-A) et causes inconnues (COPD-U) [47].

4. Traitements

Pour la prise en charge des patients atteints de BPCO, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Toutefois, des traitements pharmacologiques ou non-pharmacologiques sont développés pour améliorer la qualité de vie des patients et réduire les symptômes et la mortalité.

4.1. Traitements non-pharmacologiques

Les traitements non-pharmacologiques ont une place importante dans la prise en charge des patients [47]. Ils doivent être évalués avant la mise en place d'agents thérapeutiques. La principale mesure est l'élimination de la cause menant au développement de la pathologie, notamment pour le tabagisme. Le sevrage tabagique est efficace pour ralentir la progression de la BPCO et mène parfois à la réversion de certaines lésions [81]. La réadaptation respiratoire est dans certains cas utile, notamment lors de dyspnée pour les patients GOLD B-E. Elle consiste en un réentraînement à l'effort, une kinésithérapie aidant pour le drainage bronchique, un accompagnement nutritionnel et socio-psychologique, et une éducation thérapeutique. Elle permet d'améliorer la condition globale du patient et sa qualité de vie au quotidien [82]. L'oxygénothérapie peut être mise en place à domicile sur de courtes ou longues périodes en cas d'insuffisance respiratoire [83]. Enfin, pour réduire les risques d'aggravation de la pathologie, la vaccination est fortement recommandée, notamment anti-grippale, anti-pneumococcique et anti-COVID-19 plus récemment [84].

4.2. Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques sont indiqués en association aux mesures non-pharmacologiques pour réduire les symptômes des patients et ainsi améliorer leur qualité de vie. Le choix est réalisé en prenant en compte différents facteurs selon un algorithme de prise en charge personnalisé (**Figure 11**).

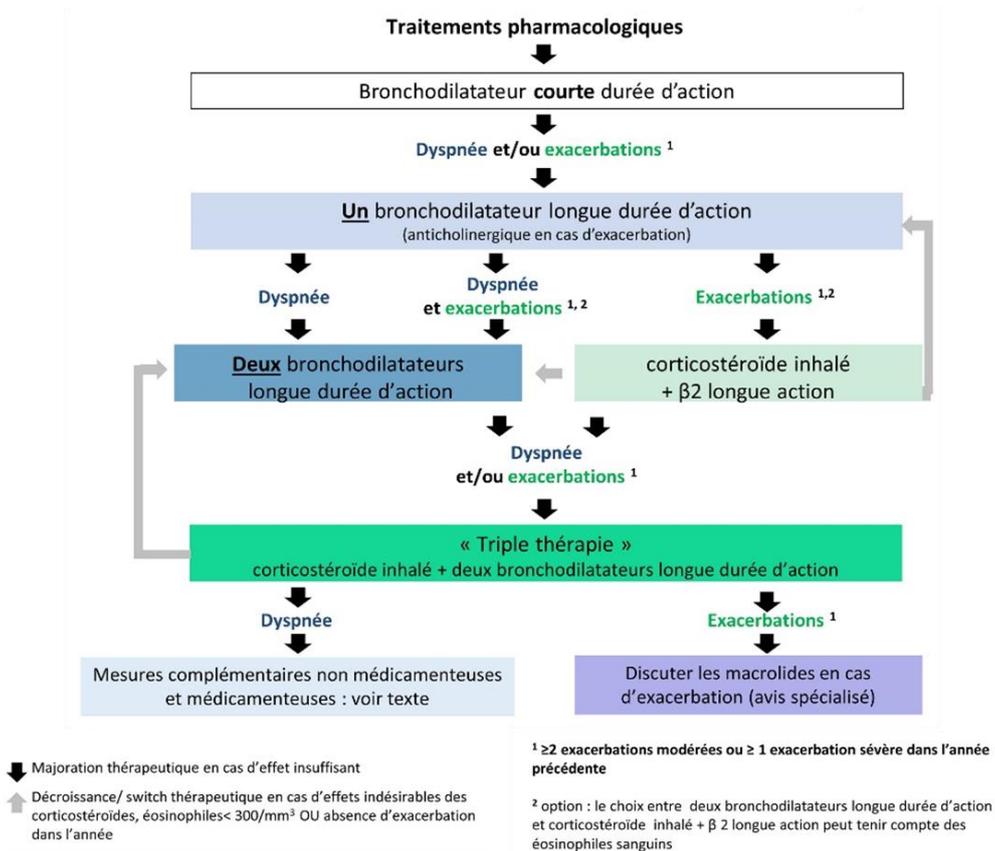


Figure 11 : Algorithme de prise en charge thérapeutique des patients BPCO

(modifié d'après Ancel et al., 2022)

4.2.1. Les bronchodilatateurs

Les bronchodilatateurs sont utilisés en première intention pour permettre une relaxation des muscles lisses bronchiques. Il en existe deux classes en inhalation seul ou combinés, les β₂-agonistes et les anticholinergiques, notamment ciblant les récepteurs muscariniques [47]. Les bronchodilatateurs de courte durée d'action (SABA : *Short-acting beta agonists* et SAMA : *Short-acting muscarinic antagonists*) peuvent être utilisés en traitement de secours en cas de symptôme aigu. Les bronchodilatateurs de longue durée d'action (LABA : *Long-acting beta agonists* et LAMA : *Long-acting muscarinic antagonists*) peuvent être utilisés en traitement de fond, continu, seul ou en association [85].

4.2.2. Les corticostéroïdes inhalés en bithérapie ou trithérapie

Les corticostéroïdes inhalés (CSI) sont utilisés en deuxième intention, pour certains phénotypes de BPCO, en particulier en cas d'exacerbations fréquentes.

Ils sont uniquement prescrits en association avec un bronchodilatateur de longue durée d'action car ils possèdent des effets indésirables potentiels et n'ont pas prouvé leur efficacité en monothérapie dans la BPCO [47]. Dans les formes les plus sévères de la BPCO, avec des symptômes importants mal contrôlés (dyspnée, exacerbations), une trithérapie inhalée (CSI+LABA+LAMA) peut être proposée. [86].

5. Physiopathologie

La BPCO est une pathologie pulmonaire hétérogène et polymorphe. En effet, les patients présentent, à différents degrés, une inflammation chronique provoquant un remodelage des voies aériennes et dans certains cas, une destruction des parois alvéolaires appelée emphysème (**Figure 12**). L'ordre d'apparition de ces phénomènes est dépendant des patients. L'élucidation de ces mécanismes est primordiale pour le diagnostic et le traitement dans le contexte de la BPCO.

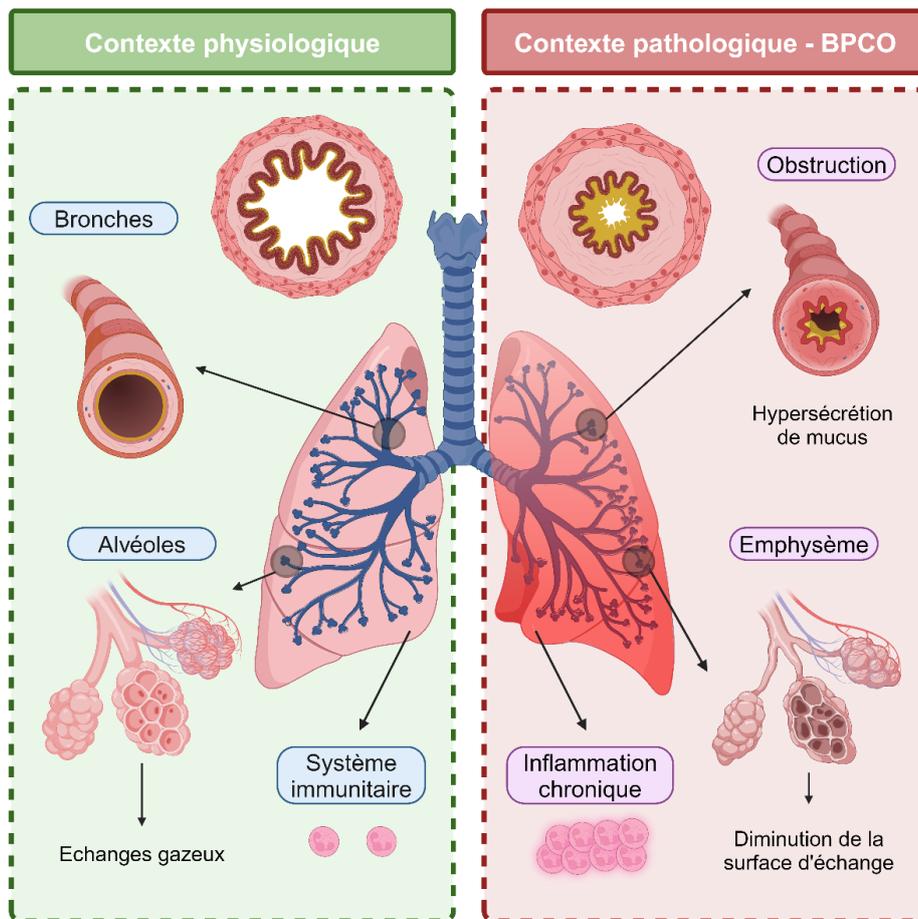


Figure 12 : Caractéristiques physiopathologiques principales de la BPCO

5.1. L'inflammation chronique et l'emphysème

Dans un contexte physiologique, les cellules épithéliales produisent des molécules de défense ainsi que des protéases et des anti-protéases permettant un équilibre protecteur pour l'épithélium. Dans le contexte de la BPCO, l'inhalation de substances nocives ainsi que certaines lésions pulmonaires bouleversent cet équilibre et provoquent une inflammation chronique par le système immunitaire inné et adaptatif. En effet, les particules toxiques agressent l'épithélium bronchique et alvéolaire provoquant l'apoptose des cellules épithéliales ainsi que l'activation des macrophages [87]. Ces mécanismes entraînent la libération de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et chimiokines (IL-1 β – *Interleukine 1 β* , TNF- α - *Tumour Necrosis Factor α* , ...) permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires, notamment les polynucléaires neutrophiles. Ces derniers produisent des protéases telles que les MMPs (*Matrix metalloproteinase*) et l'élastase neutrophilique [88]. Le rétro-contrôle étant altéré chez les patients atteints de la BPCO, ces protéines entraînent une inflammation accrue et un emphysème par la dégradation des fibres d'élastine présentes dans les parois alvéolaires. La fumée de cigarette diminue la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires provoquant une inflammation secondaire par l'accumulation des pathogènes et des débris dans les voies aériennes [89]. L'immunité adaptative mise en place par les cellules dendritiques et les lymphocytes contribuent également fortement au maintien de l'inflammation. En cas d'exacerbation, les mastocytes et les éosinophiles peuvent également participer à l'inflammation chronique.

5.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est causé par le déséquilibre de la balance entre les agents oxydants et antioxydants. Les molécules oxydantes, les ROS, proviennent de sources exogènes telles que le tabagisme et les particules fines, ou de sources endogènes telles que les macrophages ou les neutrophiles [90,91]. L'accumulation de ces molécules est à l'origine de diverses lésions cellulaires dans la BPCO. Les ROS entraînent une altération de la perméabilité membranaire ainsi qu'un dysfonctionnement de certaines protéines par oxydation, clivage ou agrégation [92,93]. De plus, ils conduisent à une instabilité génomique par l'altération de la réparation de l'ADN en cas de mutations ponctuelles [94]. Au niveau tissulaire, des lésions apparaissent par l'inflammation chronique maintenue par les ROS et l'apoptose accrue des cellules entraînant l'évolution de l'emphysème et le déclin de la fonction respiratoire [95].

5.3. Le remodelage des voies aériennes

L'inflammation chronique et le stress oxydatif participent et/ou maintiennent l'altération de la capacité réparatrice des cellules menant à un remodelage des voies aériennes affectant différentes populations cellulaires.

5.3.1. Altération des tissus sous-épithéliaux

Le tissu conjonctif, composé notamment des fibroblastes et des cellules endothéliales, assure une fonction de soutien, de réparation tissulaire et de vascularisation à proximité de l'épithélium pulmonaire. Ces fonctions sont altérées dans la BPCO par le remodelage des différentes populations cellulaires. En effet, une fibrose sous-épithéliale est mise en place par l'activation des fibroblastes ou par le processus de transition épithélio-mésenchymateuse [96]. Les fibroblastes activés par le TGF- β (*Transforming growth factor beta*) produisent des composants de la MEC en excès, tels que le collagène I ou III, réduisant la fonction respiratoire [97]. La zone vasculaire à proximité de l'épithélium est plus vaste avec une augmentation de la densité de vaisseaux sanguins pouvant participer à l'inflammation chronique [98]. La MEC localisée à proximité des cellules endothéliales est épaissie par la surproduction de fibronectine [99].

Le tissu musculaire est également altéré par l'hypertrophie des cellules musculaires lisses, causant un épaississement de la couche musculaire et une capacité anormale de contraction et de tonus musculaire bronchique [100].

5.3.2. Altération de la fonction protectrice de l'épithélium

L'épithélium bronchique exerce une fonction protectrice en formant une barrière perméable aux protéines, ions, et autres particules. La perméabilité est sélective, assurée par les jonctions cellulaires et dépendante de la taille et/ou de la charge de la molécule. Dans la BPCO, la fumée de cigarette peut altérer les jonctions cellulaires, notamment les jonctions serrées et adhérentes, par la diminution de l'expression des gènes essentiels ou à l'altération de la localisation des protéines [101,102]. L'augmentation de la perméabilité non-sélective peut être causée par le médiateur inflammatoire TNF- α ou encore par les pathogènes inhalés tels que les rhinovirus, causant une prédisposition aux infections ou aux exacerbations [103,104]. La barrière physique est également altérée par l'épaississement et la fragmentation de la lame basale réduisant l'adhérence des cellules [105].

5.3.3. Altération de la composition cellulaire de l'épithélium

La capacité de réparation de l'épithélium bronchique est assurée par les cellules progénitrices telles que les cellules basales. Elles se différencient en cellules sécrétrices ou en cellules multiciliées qui assurent la fonction de clairance mucociliaire [12]. La proportion de ces populations cellulaires est importante pour l'efficacité des différentes fonctions. Dans la BPCO, les proportions sont modifiées par les lésions causées et répétées lors d'inhalations de substances nocives ou de pathogènes. En effet, les cellules basales possèdent des capacités prolifératives et régénératives altérées, ayant pour conséquences une métaplasie malpighienne et une hyperplasie des cellules basales par prolifération anarchique [106]. De plus, sous l'influence de plusieurs voies de signalisation, le programme de différenciation de ces cellules progénitrices est déséquilibré en faveur des cellules sécrétrices entraînant également une hyperplasie des cellules sécrétrices [107]. Elles participent à la mise en place de l'obstruction des voies aériennes par une hypersécrétion de mucus enrichi en mucine majoritaire telle que Muc5ac [108,109]. Le mucus est également déshydraté par le dysfonctionnement du canal CFTR altérant davantage la clairance mucociliaire [110]. Celle-ci étant la première ligne de défense de l'épithélium bronchique, les modifications du mucus entraînent une accumulation de pathogènes exacerbant l'inflammation chronique et les lésions cellulaires. Le remodelage caractéristique de la BPCO affecte également la ciliogénèse. En effet, de nombreuses altérations ciliaires structurelles ou fonctionnelles sont mises en évidence par des études bioinformatiques, *in vitro*, ou *ex vivo*.

Chapitre III : Altérations ciliaires dans la BPCO

Airway ciliated cells in adult lung homeostasis and COPD

Petit et al., European Respiratory Review, 2023

Le cil est un organe présent dans l'ensemble du système respiratoire pour en assurer ses fonctions essentielles. Il en existe deux types, le cil primaire unique et ubiquitaire présent sur les cellules non différenciées, et les cils moteurs, présents en exemplaires multiples afin d'assurer la clairance muco-ciliaire. Le cil primaire régule de nombreux processus des cellules épithéliales et stromales tels que le cycle cellulaire, ou la réception de signaux [111]. Il régule le devenir cellulaire et apparaît essentiel à la différenciation des cellules épithéliales. En effet, l'inhibition de la ciliogénèse primaire entraîne une diminution du nombre de cellules multiciliées, témoignant de la relation entre les deux ciliogénèses [112]. Des altérations du cil ont été démontrées dans de nombreuses pathologies appelées ciliopathies affectant le cil primaire et/ou les cils moteurs. Dans la BPCO, des dérégulations affectant le cil primaire et les cils moteurs sont observées. Le nombre de cellules présentant un cil primaire est augmenté alors que le nombre de cellules multiciliées est diminué [113,114]. De plus, une dérégulation des gènes associés aux cils a été démontrée chez les patients BPCO [115]. Enfin, le cil primaire agissant comme une antenne de signalisation, il régule de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie Hedgehog (HH) [116].

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication présentée ci-après organisée selon le plan suivant :

1. Ciliogénèse dans le poumon adulte

1.1. Ciliogénèse primaire

1.2. Cellules multiciliées

1.3. Des cellules possédant un cil primaire aux cellules multiciliées

2. Rôles des cils dans l'homéostasie

2.1. Le cil primaire dans l'épithélium des voies aériennes

2.2. Le cil primaire dans le stroma

2.3. La clairance mucociliaire

3. Les cils dans la BPCO

3.1. Altérations du cil primaire

3.1.1. Dans l'épithélium des voies aériennes

3.1.2. Dans le parenchyme

3.2. Altérations des cils moteurs

4. Perspectives

5. Conclusions



Airway ciliated cells in adult lung homeostasis and COPD

Laure M.G. Petit¹, Randa Belgacemi², Julien Ancel^{1,3}, Lynda Saber Cherif¹, Myriam Polette^{1,4},
Jeanne-Marie Perotin^{1,3}, Nathalie Spassky⁵, Charles Pilette⁶, Denise Al Alam^{1,2}, Gaëtan Deslée^{1,3}
and Valérian Dormoy¹

¹Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, P3Cell UMR-S1250, SFR CAP-SANTE, Reims, France. ²Lundquist Institute for Biomedical Innovation, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA. ³CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Service de Pneumologie, Reims, France. ⁴CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire de Biopathologie, Reims, France. ⁵Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), Ecole Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL Université Paris, Paris, France. ⁶Université Catholique de Louvain (UCL), Institute of Experimental and Clinical Research - Pole of Pneumology, ENT, Dermatology and Pulmonology Department, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium.

Corresponding author: Valérian Dormoy (valerian.dormoy@univ-reims.fr)



Shareable abstract (@ERSpublications)

This review describes the diversity of ciliated cells in the airways and highlights their origin, function, regulation and alteration in respiratory diseases such as COPD. <https://bit.ly/46O1RO8>

Cite this article as: Petit LMG, Belgacemi R, Ancel J, et al. Airway ciliated cells in adult lung homeostasis and COPD. *Eur Respir Rev* 2023; 32: 230106 [DOI: 10.1183/16000617.0106-2023].

Copyright ©The authors 2023

This version is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licence 4.0. For commercial reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

Received: 31 May 2023
Accepted: 7 Oct 2023



Abstract

Cilia are organelles emanating from the cell surface, consisting of an axoneme of microtubules that extends from a basal body derived from the centrioles. They are either isolated and nonmotile (primary cilia), or grouped and motile (motile cilia). Cilia are at the centre of fundamental sensory processes and are involved in a wide range of human disorders. Pulmonary cilia include motile cilia lining the epithelial cells of the conductive airways to orchestrate mucociliary clearance, and primary cilia found on nondifferentiated epithelial and mesenchymal cells acting as sensors and cell cycle keepers. Whereas cilia are essential along the airways, their regulatory molecular mechanisms remain poorly understood, resulting in a lack of therapeutic strategies targeting their structure or functions. This review summarises the current knowledge on cilia in the context of lung homeostasis and COPD to provide a comprehensive overview of the (patho)biology of cilia in respiratory medicine with a particular emphasis on COPD.

Ciliogenesis in the adult lung

Cilia are conserved from unicellular eukaryotes to animals; therefore, it is not surprising that they were first described in protozoa in the seventeenth century [1]. Four centuries were needed to tackle the ultrastructure of the organelle in the lung to the complex deciphering of its movement *via* progress in physiology and microscopy [2]. An important challenge when addressing the question of cilia in the lung is to discriminate two organelles that may appear very similar in shape and role, but differ tremendously: the primary cilium and the motile cilium. The comparative structural and functional features of primary cilia and motile cilia are extensively discussed in biology, with a particular emphasis on the centrioles constituting the foundations of both cilia [3–8]. However, although cilia are the first line of pulmonary defence, this aspect is frequently neglected in respiratory medicine, particularly from an integrative perspective.

Primary ciliogenesis

Since multiciliated cells (MCCs) are of the utmost importance in the airways as orchestrators of mucociliary clearance in the conducting airways, the primary cilia did not appear to be a priority to explore homeostasis or pathophysiology. In fact, until 10 years ago, only one article documented the presence of primary cilia *in vitro* during epithelial repair and in embryonic lungs, but reported their absence in the adult lungs [9]. Interestingly, the primary cilium is found in nearly all cells in humans, as it transiently appears and disappears at the cell surface, contributing to cell cycle regulation. A primary cilium consists of an antenna that functions as a mechanical and chemical sensor relaying molecular signalling and orientating cell fate. Therefore, it seemed reasonable to assess the presence of primary cilia at the surface of pulmonary cells and investigate their potential roles in lung homeostasis and diseases.

In airway epithelial cells, the pioneer experimental study highlighted that primary ciliogenesis is required for optimal multiciliogenesis in the lung [9]. The primary cilium appears in the course of airway epithelial cell (AEC) differentiation and during repair. Since then, we have demonstrated their presence on nondifferentiated basal cells *in vitro* and *ex vivo* (figure 1) [10]. Considering the other tissues present in the lung where various cell populations may harbour a primary cilium, ciliogenesis orchestrates several crucial functions responsible for lung homeostasis in the stroma. Thus, the primary cilia may be found on nonepithelial cells, as illustrated in figure 1. More specifically, primary cilia were observed on lung endothelial cells, regardless of the area considered [11]. They have also been detected on bronchial muscle cells [12, 13], parenchymal fibroblasts [14] and myofibroblasts [15]. In addition, primary cilia have been detected on chondrocytes outside the respiratory system [16], but have not been described on immune cells.

Multiciliated cells

Motile cilia appear as hundreds of plasma membrane folds, each anchored on a basal body located at the apical pole of MCCs (figure 1). These final products result from a complex and partially described process recently tackled by single-cell RNA-sequencing (seq) approaches. Motile cilia gradually appear during AEC differentiation in the airway epithelium. The precursors are basal cells following a specific lineage leading to terminally differentiated cells: secretory cells or MCCs. The precursors may vary geographically along the airways and are controlled by different signalling pathways (such as Wnt, Notch or Hedgehog)

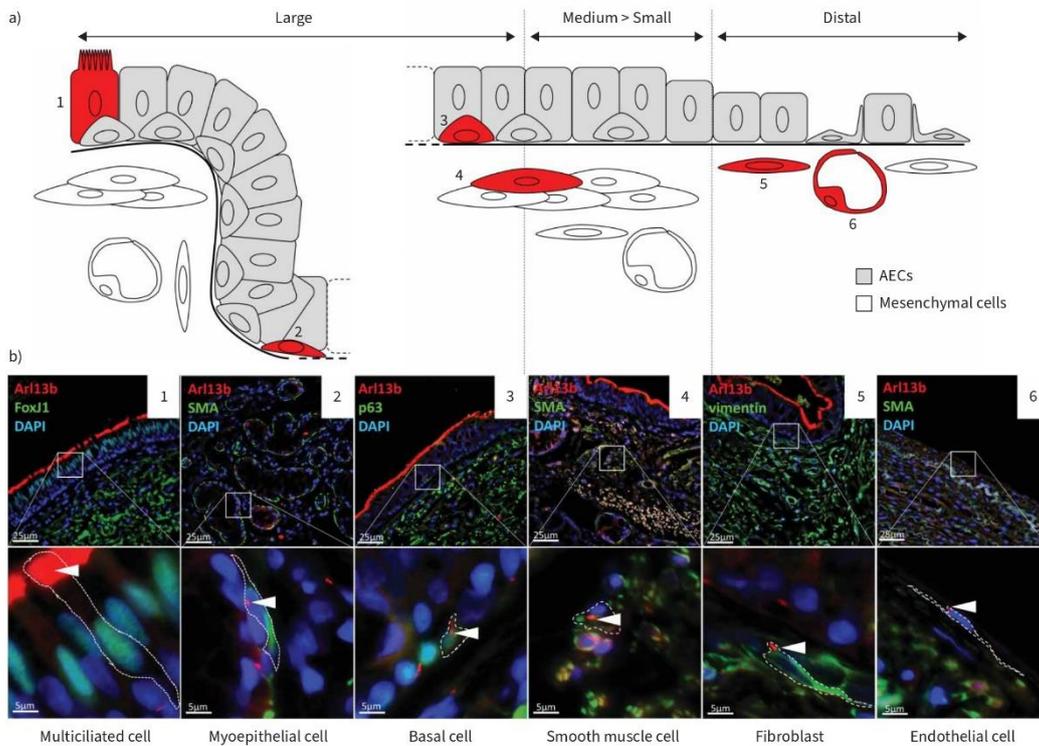


FIGURE 1 Cilia are present in the principal lung cell populations. a) The main pulmonary airway cell populations from bronchi (large airways) to alveoli (distal airways), depicting airway epithelial cells (AECs) and mesenchymal cells. b) Representative micrographs showing the specific cell population (numbered 1-6) analysed by immunostainings on formalin-fixed paraffin-embedded non-COPD smoker lung tissue for identification marker (FoxJ1, smooth muscle actin (SMA), p63, vimentin; all green); cilia (Arl13b; red) and cell nuclei (4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI); blue) as observed on formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues. Arrowheads indicate ciliated cells (either motile cilia or primary cilia); dashed lines trace an example of the cell population. Scale bars=25 μm and 5 μm.

and stimuli driving cell fate. Considering MCC differentiation, the basal cells are precursors of deuterosomal cells, which are intermediates for MCCs featuring signature genes such as Polo-like kinase 4 (PLK4), Cyclin O (CCNO) and Centrosomal protein 78 (CEP78) [17]. At the end of the process, MCCs generally express gene markers responsible for ciliary functions, such as intraflagellar transport (IFT) proteins. Forkhead Box J1 (FOXJ1) is generally the readout of the duplication of centrioles forming deuterosomes that migrate to the apical membrane, while dynein and radial spokes such as DNAH5/LI1 and RSPH4A/9 delineate the formation of functional motile cilia with a central doublet of microtubules and the ability to exploit ATP, enabling ciliary movement (figure 2) [18].

From primary ciliated cell to multiciliated cell

Primary cilia and motile cilia were observed, but not connected, based on the first experimental evidence [9, 19]. It was initially proposed that the primary cilia may disappear during differentiation to give rise to motile cilia. However, *in vitro* monitoring and histological observations of both types of cilia (figure 3) [10] favour a model where the primary cilium persists during differentiation. The AEC progenitors may cycle (proliferate) or remain in a state of quiescence and display a primary cilium. Upon cell cycle re-entry, the two future daughter cells will adopt different fates: one will remain undifferentiated, either

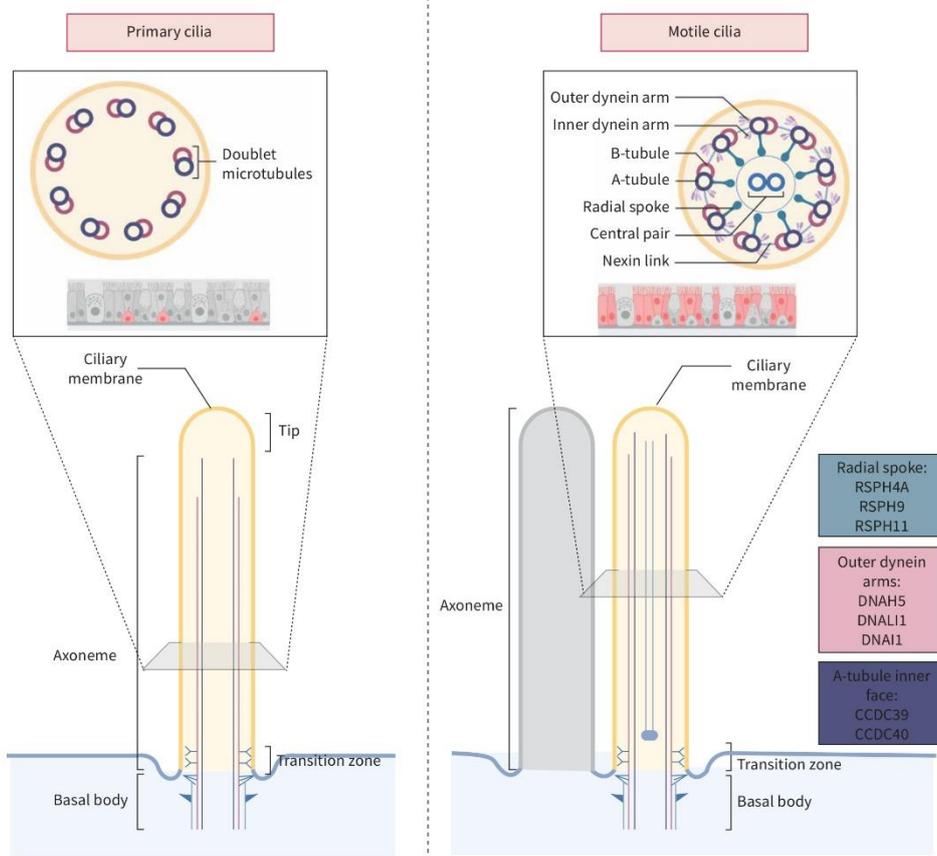


FIGURE 2 Structural aspects of primary cilia and motile cilia. The schematic shows the global structure of primary cilia and motile cilia in the respiratory context with a focus on the axoneme and its molecular composition. Figure created using BioRender.com.

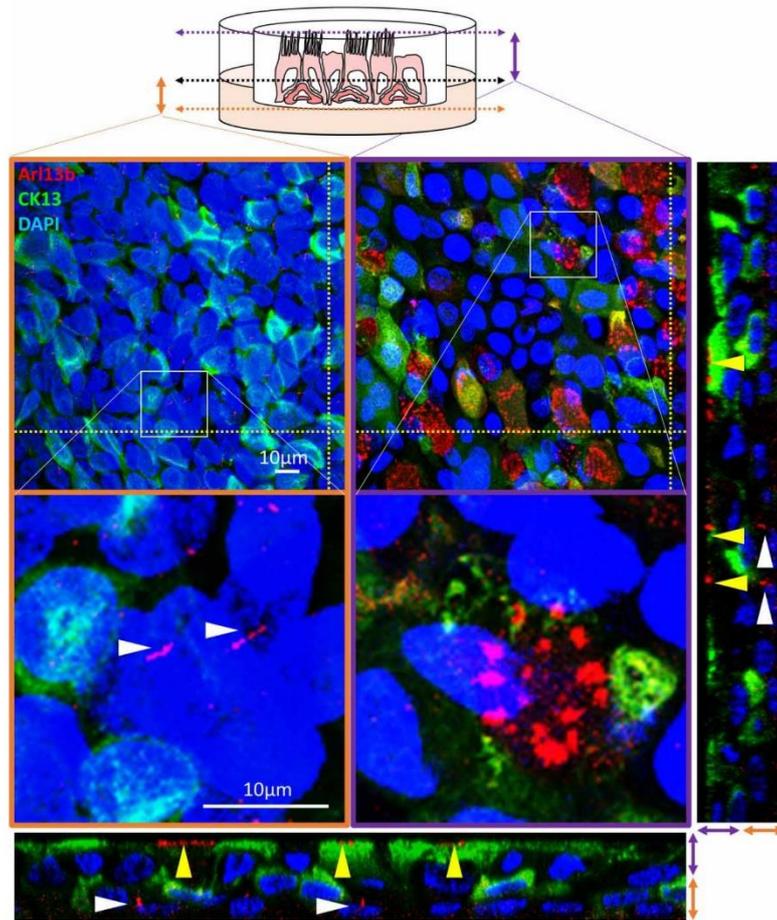


FIGURE 3 Primary cilia and motile cilia appear during airway epithelial cell differentiation *in vitro*. Representative confocal acquisitions from large airway epithelial cell cultures from a non-COPD smoker at ALI-d14 for CK13 (green), cilia (Arl13b; red) and cell nuclei (4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI); blue). Merged z-projections on two selected areas depicted by orange or purple frames are shown with orthogonal projections (dashed lines). Arrowheads indicate primary cilia (white) and motile cilia (yellow).

proliferative or nonproliferative, harbouring a primary cilium, and the other one will progress towards the acquisition of cellular and molecular features to turn its role into secretion or mucus sweeper. A phenotypic switch from mucus-secreting cells to MCCs has also been suggested [17]. The inhibition of primary ciliogenesis during AEC differentiation induced an extreme decrease of MCCs, partially through the transcriptional alteration of genes associated with ciliogenesis, such as FOXJ1 [20].

Roles of cilia in homeostasis

Airway primary cilia

Since the airway primary cilium has not attracted much attention in respiratory research, little is known about its roles in the lung epithelia. The primary cilium is formed during the G1 phase of the cell cycle and its disassembly takes place during the G2/M phase, which regulates the cell cycle and the balance

between quiescence and proliferation [21]. Considering its demonstrated functions, the primary cilium may assume an important role in lung homeostasis or repair after injury. It may be involved during lung development and organ regeneration, acting as signalling hubs for several receptors, channels and signalling pathways such as Hedgehog, Wnt and Notch. The primary cilia are distributed throughout the airways, and exhibited on basal cells in bronchi, bronchioles and on type I and II alveolar epithelial cells in the distal compartment [14]. The functions of primary cilia in these different compartments, which could differ, have not been explored and may not be the same.

Primary cilia in the stroma

Primary cilia may participate in and orchestrate many functions depending on the cell type from which they emanate. In the lung, in addition to epithelial tissues, primary cilia are also found in the connective and smooth muscle tissues.

They are thought to be essential in the establishment of the vascular barrier [22], by detecting shear forces during vasculogenesis [23], and acting as a fluid mechanosensor in the blood [24]. In addition, they may relay cytokine stimulation response [25], and maintain the endothelial phenotype preventing endothelial-to-mesenchymal transition [26]. They are present on fibroblasts where they contribute to the fibrogenesis and the maintenance of the fibroblastic identity [27]. The primary cilia relay chemical (*i.e.* parathyroid hormone or flavonoids), electric (*i.e.* pulsed electromagnetic fields) and mechanic signals (*i.e.* microgravity) to direct chondrocyte and osteoblast differentiation [28–30]. Human bronchial smooth muscle cells project a primary cilium enriched in mechanochemical sensors into the extracellular matrix to initiate migration and wound repair and to mediate cell contraction [12, 13].

Mucociliary clearance

The pseudostratified respiratory epithelium (from the nasal cavity to the bronchi) is covered with mucus produced by secretory cells in order to trap inhaled particles, microorganisms and pathogens. The mucociliary clearance establishes a frontline lung defence mechanism: motile cilia remove the mucus via ciliary beating into the airway surfactant layer. The ciliary beat efficiency is ensured by ion transport across the channels expressed at the membrane of the epithelial cells, allowing the rehydration of the airway surfactant layer [31–33]. The ciliary beating pattern provides efficient defence, with cilia moving forward and coordinating the recovery sweep in the same plane [34].

The ciliary beat frequency (CBF) is influenced by environmental signalling, especially the redox balance. Cilia contain several regulatory redox systems, such as oxidant-generating (*i.e.* nitric oxide synthase and NADPH oxidase) or antioxidant systems (*i.e.* redoxin family proteins) to modulate the physics of the beating movement [35]. Temperature and intracellular calcium levels are the main regulators of the CBF. A large panel of human biological products such as ADP/ATP, toxins (from *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus*) or natural compounds (curcumin, menthol, vitamins) positively or negatively modulate the CBF depending on the biological context [36]. Antimicrobials, antivirals, drug excipients and medications typically decrease the CBF. However, a few agents, such as long-acting muscarinic antagonists and β -agonists seem to increase the CBF.

Cilia in COPD

The understanding of COPD pathogenesis has often been restricted to the inflammatory component. This has prompted the use of corticosteroids and phosphodiesterase inhibitors, among other therapeutics, for the clinical management of the symptoms and to reduce exacerbations. Nonetheless, there is currently no cure, partially because the role of the epithelium is not fully elucidated, even though the ciliated cells are the guardians of the respiratory functions. Therefore, investigating cilia in chronic airway diseases is of the utmost importance. It is particularly relevant in the context of COPD considering its association with cancer: the basal cell is at the centre of molecular transformations that may lead to epithelial transdifferentiation towards COPD or dedifferentiation towards carcinogenesis. Research on COPD patients provides an ideal model, with readily available lung tissues to investigate the connections between primary cilia and motile cilia.

Alteration of primary cilia

In the airways

Epithelial remodelling is a hallmark of COPD. The main histological features are basal and secretory cell hyperplasia and metaplasia. An alteration of the primary cilia could initiate epithelial remodelling. For example, the loss of primary cilia induces a decrease in the integrity of the epithelial barrier with changes in tight-junction components. This is accompanied with a decrease in nondifferentiated cells and an increase in secretory cells [20].

Although the primary cilia were sparse on nondifferentiated cells in morphohistologic normal epithelia, there was an increase of cells presenting primary cilia in remodelled epithelia, and more so in the context of COPD (table 1) [10]. Moreover, the number of primary cilia and their length increased in the AECs of COPD patients [41]. This raised the question of the role of primary cilia in the genesis and maintenance of epithelial remodelling in COPD. The capacity of the nondifferentiated AECs from COPD patients to renew the epithelium is not elucidated. In addition, the maintenance of the primary cilia on nondifferentiated cells may be either the result or the cause of the epithelial remodelling.

In the parenchyma

The alteration of the primary cilia in the parenchyma has not been studied in the context of COPD. Data are available for other respiratory diseases, such as idiopathic pulmonary fibrosis and asthma, which can be extrapolated to propose a novel area of investigation in COPD. The frequency of primary cilia was increased in fibroblasts and alveolar epithelial cells in the context of idiopathic pulmonary fibrosis in association with the activation of the Hedgehog pathway causing the development of fibrosis [14]. The endothelial cells from pulmonary arterial hypertension patients harboured more elongated primary cilia which could not regulate their length following inflammatory stimuli, ultimately leading to endothelial dysfunction [25]. In the context of asthma, primary cilia were more abundant on airway smooth muscle cells and functionally linked to the contractility regulation [13].

Alteration of motile cilia

Cilia dysfunction is long thought to represent a main contributor to mucociliary clearance abnormalities (see [16] for a complete historical perspective).

Dysfunction of motile cilia was evaluated in the airways of COPD patients using a wide range of experimental tools from genetic studies to live imaging (table 1, [10, 37–52]). The main findings commonly included decreased CBF, shortening of motile cilia, and ciliary dyskinesia from the nasal epithelium to the bronchioles (table 1). Recently, autophagy was presented as being involved in pathological processes that are linked to cilia shortening. Cigarette smoke-induced autophagy triggered the degradation of ciliary proteins (such as IFT) mediated by HDAC6 and induced alteration of ciliary growth and function in the context of COPD. In addition, ciliary proteins were found inside autophagosomes sequestered after cigarette smoke-induced autophagy [53–55].

The structure of motile cilia can be altered, like in primary ciliary dyskinesia. These abnormalities include defects of dynein arms (outer and/or inner) or radial spokes, as well as global disorganisation induced by genetic mutations of ciliary component genes such as DNAH5/11, RSPH9/11 and CCDC39/40. All of these abnormalities are responsible for a decrease in CBF or an absence of cilia [56]. In addition, a few genetic studies pertaining to structural defects of cilia, including our meta-analysis, highlighted cilium-associated gene alterations in COPD patients [42, 46, 48, 57].

Smoking and ageing are the two prime modifiers of mucociliary clearance in the context of COPD [58, 59]. As they may directly affect cilia structure, function and molecular composition, the selection of the population (healthy never-smokers *versus* (ex-)smokers *versus* COPD (ex-)smokers *versus* young/middle-aged/older patients) is crucial to distinguishing COPD-specific or ageing-/smoking-related alteration of cilia. This is particularly important since cilia alterations may not concern all COPD patients, but only a subgroup. Finally, dysfunctions of the motile cilia can affect the cells localised in the parenchyma, especially immune cells. In the COPD context, the phagocytic ability of alveolar macrophages is impaired. This alteration is partially explained by a modification of the crosstalk between epithelial cells and alveolar macrophages. The main culprit is the decrease of Sphingolipid Transporter 2 (SPNS2), an epithelial ciliary protein causing a reduction of sphingosine-1-phosphate (S1P) secretion involved in the phagocytic function of alveolar macrophages [60].

Future directions

In recent years, fine-tuning of genetic cilia alterations has been investigated using high-throughput methods, such as whole-exome sequencing, RNAseq and single-cell RNAseq to correlate cilia-associated genes and COPD [46, 61]. If whole-exome sequencing identified an altered cilia-associated genetic print in COPD patients [46], interestingly, heavy smokers without airflow obstruction also presented an enrichment of variants in genes related to cilia structure and function [57]. Based on transcriptomics analysis on whole lung tissues and isolated small AECs, we suggested that a broad alteration of cilia-associated genes in COPD patients defines an endotype featuring ciliopathy, named CiliOPD [42]. The investigation of the spatial distribution of ciliated cells throughout the respiratory system from the upper to the lower airways will provide fine-tuned differential aspects of mucociliary regulation in the context of respiratory diseases such as COPD, while it is often admitted that human bronchial epithelia mimic nasal epithelia [62].

TABLE 1 Translational investigations on ciliogenesis homeostasis alterations in COPD and COPD experimental models (2000–2022)

Airways sublocalisation (UA, T, B, b, A, WL)	Models (AEC cultures, animals, etc.)	Smoking status (non-COPD: never/ex/current versus COPD: never/ex/current)	Experimental tools (EM, VM, IF, etc.)	Main findings in COPD	References
b	SAEC ALI cultures (7 non-COPD/9 COPD) FFPE tissues (8 non-COPD/6COPD)	0/6/1 versus 0/6/3	IF, PCR	↓MCC ↓E2F4, FOXJ1, RFX2, RFX3, HEATR2 ↓primary cilia	[37]
B	Animal model (miR449 ^{-/-} mice) Tissues (57 COPD)	0/35/22	RNA/miRNA/scRNAseq meta-analysis, ISH, IF, TEM	miR449 expression correlated with ciliogenesis-associated genes	[38]
B	FFPE tissues: remodelled and non-remodelled epithelial (4 non-COPD/3 COPD)	0/1/3 versus 0/3/0	Whole-exome sequencing	Cilia-related pathways	[39]
B	LAECs (12 non-COPD/16 COPD)	0/6/6 versus 0/5/11	CBF, TEM	↓CBF ↓cilia in MCC ↑cells with blebbing and projections Ciliary dyskinesia	[40]
B	LAECs (15 non-COPD/17 COPD) LAEC ALI cultures	4/4/7 versus 0/12/5	CBF, IF	↓CBF ↓MCC ↑primary cilia	[41]
WL, b	Tissues (238 non-COPD/391 COPD) SAECs (300 non-COPD/117 COPD)	NA	RNAseq meta-analysis	Alteration of cilia transcriptome	[42]
b	SAEC ALI cultures (3 non-COPD/3 COPD)	3/0/0 versus 0/0/3	CS exposure, TEER, IHC, IF, VM, PCR, NGS	CS alters differentiation of SAECs: ↓FOXJ1, DNAI1 ↓MCC ↓CBF	[43]
B, b	FFPE tissues (61 non-COPD/81 COPD) LAEC ALI	24/16/21 versus 0/49/32	IHC, PCR, WB	TGF-β1 participates in AEC remodelling in COPD: ↓FoxJ1, β-tubulin IV ↓FOXJ1, DNAI2 ↓MCC	[44]
B	LAEC ALI cultures (14 non-COPD/14 COPD)	6/0/8 versus 0/0/14	CS exposure, PCR, CBF, calcium imaging	No effect on CBF	[45]
B	FFPE lung tissues (17 non-COPD/19 COPD)	0/4/13 versus 0/2/17	IHC	↑primary cilia	[10]
WL	Tissues (774 non-COPD/1769 COPD)	0/0/774 versus 0/NA/NA	Whole-exome sequencing	Cilia-related pathways	[46]
B	Animal models (guinea pig, rat) LAEC ALI cultures	NA	CS exposure, Ussing chamber, airway surfactant layer height, CBF	CS alters LAEC airway surfactant layer and CBF: ↓ airway surfactant layer dehydration ↓CBF	[47]
B, b	LAECs (50 non-COPD/70 COPD) SAECs (52 non-COPD/56 COPD)	45/0/57 versus 0/0/126	IF, RNAseq	↓cilia length in smokers and COPD smokers ↓IFT transcripts associated with smoking, COPD and cilia shortening	[48]
T, WL	Animal model: mouse MTEC culture Cell-line culture Tissues (LGRC, 43 non-COPD/124 COPD)	18/25/0 versus 0/124/0	CS exposure, IF, TEM, SEM, WB, cell viability and cytotoxicity assays, CHARM methylation array	HDAC6 involved in ciliated AEC responses to CS ↓HDAC6 methylation in COPD ↑HDAC6 in smokers and COPD patients	[49]
UA	Nasal brushing (6 non-COPD/19 COPD)	6/0/0 versus 0/11/8	CBF	↓CBF in moderate/severe COPD	[50]

Continued

TABLE 1 Continued					
Airways sublocalisation (UA, T, B, b, A, WL)	Models (AEC cultures, animals, etc.)	Smoking status (non-COPD: never/ex/current versus COPD: never/ex/current)	Experimental tools (EM, VM, IF, etc.)	Main findings in COPD	References
UA	Nasal brushing (39 non-COPD/98 COPD)	39/0/0 versus 0/98/0	CBF, NMCcT	↑NMCcT in COPD ↓CBF in COPD	[51]
UA	Nasal brushing (8 non-COPD/10 COPD)	NA	CBF	↓salmeterol induced-CBF in COPD	[52]

Data are presented as n. UA: upper airways; T: trachea; B: bronchi; b: bronchioles; A: alveoli; WL: whole lung; AEC: airway epithelial cell; EM: electron microscopy; VM: videomicroscopy; IF: immunofluorescent staining; SAEC: small airway epithelial cell; FPPE: formalin-fixed paraffin-embedded; miRNA: micro RNA; sc: single-cell; RNAseq: RNA sequencing; ISH: *in situ* hybridisation; TEM: transmission electron microscopy; LAEC: large airway epithelial cell; CBF: ciliary beat frequency; MCC: mucociliary clearance; ALI: air-liquid interface; NA: not available; CS: cigarette smoke; TEER: transepithelial electrical resistance; IHC: immunohistochemistry; NGS: next-generation sequencing; WB: Western blot; TGF: transforming growth factor; IFT: intraflagellar transport; MTEC: mouse tracheal epithelial cell; LGRC: Lung Genomics Research Consortium; SEM: scanning electron microscopy; CHARM: comprehensive high-throughput arrays for relative methylation; NMCcT: nasal mucociliary clearance time.

Through advances in imaging modalities and standardised analysis methods (electron tomography) [32, 63–66] or live-cell imaging modalities for motile cilia and primary cilia [67], it will be possible to precisely analyse cilia structure and movement to better phenotype respiratory diseases [63]. Animal models developing COPD-like lesions could also be used to study cilia dysfunctions. Mice, rats and guinea pigs were exposed to cigarette smoke extract to successfully mimic the pulmonary damage of COPD smoker patients with an alteration of the ciliary component [68]. In addition, genetically modified organisms were generated, such as the IFT88- or Dnah9-mutant mice, to study the role of cilia-associated proteins in human development [69, 70]. Notably, they featured epithelial remodelling and a decrease in CBF.

The identification of primary cilia alterations on stromal cells and signalling pathways associated with cilia dysfunctions (Hedgehog, Wnt, Notch) is crucial to decipher the mechanisms of respiratory disease pathogenesis [71–73]. In addition, the characterisation of the intriguing link between immune cells and cilia, such as impaired neutrophil chemotaxis in primary ciliary dyskinesia [74] or cellular inflammatory responses induced by cilia proteins independently of primary cilia [75], would be a complementary approach to developing therapies targeting the ciliary proteome.

Considering that the design of novel drugs directly targeting cilia alterations may require profound research developments, several pharmacological agents have been found to improve mucociliary clearance. For example, CBF could be increased by the addition of inhibitors of phosphodiesterase, such as roflumilast [76], or long-acting muscarinic antagonists/β-agonists, such as tiotropium or glycopyrronium [77].

Conclusions

The current knowledge on cilia in the context of lung homeostasis and pulmonary diseases, such as COPD, places these organelles at the heart of experimental investigations to identify a new endotype of patients, which include the development of related biomarkers and therapies. The complex characteristics of the cilia at structural and functional levels highlight their importance for the pathophysiology and thus accurate diagnosis of respiratory diseases. The complete understanding of early pathogenesis events that may originate from the analysis of lung primary cilia and their crosstalk with mesenchymal cells could pave the way for innovation in complex, multifactorial chronic airway and pulmonary diseases.

Questions for future research

- What are the complex relationships between primary ciliated and multiciliated cell lineages in the respiratory system?
- Is there a dysregulation of primary ciliated stromal cells in COPD and asthma?
- How can the alteration of cilia define an endotype spanning all respiratory diseases?
- Can ciliated cells be identified in the developing lung and take part in homeostasis?
- Will the analysis of molecular, structural and functional features of cilia provide clinical readouts for better patient management?

Provenance: Submitted article, peer reviewed.

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

Conflict of interest: J-M. Perotin reports lecture honoraria from AstraZeneca, and travel support from Novartis, AstraZeneca and Chiesi, outside the submitted work. D. Al Alam reports grants from NIH/NHLBI R01HL141856, NIH/NHLBI and Office of the Director R21HL165411, outside the submitted work. G. Deslée reports support for attending meetings from Chiesi, and personal fees from Chiesi, Boehringer, GSK and AstraZeneca, outside the submitted work. V. Dormoy reports personal fees from Chiesi, and personal fees from AstraZeneca, outside the submitted work. All other authors have nothing to disclose.

Support statement: This work was supported by Funding from the French National Research Agency (ANR-22-CE14-0063), the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm). It was carried out in the framework of the Federative Research Structure CAP-Santé. D. Al Alam acknowledges support from NIH/NHLBI R01HL141856; NIH/NHLBI and Office of the Director R21HL165411. R. Belgacemi acknowledges funding from CIRM (EDUC4-12837) Postdoctoral Training Grant. Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

References

- 1 Widdicombe JH. Early studies on the surface epithelium of mammalian airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019; 317: L486–L495.
- 2 Peabody JE, Shei R-J, Bermingham BM, et al. Seeing cilia: imaging modalities for ciliary motion and clinical connections. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018; 314: L909–L921.
- 3 Al Jord A, Spassky N, Meunier A. Motile ciliogenesis and the mitotic prism. *Biol Cell* 2019; 111: 199–212.
- 4 Spassky N, Meunier A. The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 423–436.
- 5 Arslanhan MD, Gulensoy D, Firat-Karalar EN. A proximity mapping journey into the biology of the mammalian centrosome/cilium complex. *Cells* 2020; 9: 1390.
- 6 Mukhopadhyay S, Badgandi HB, Hwang S, et al. Trafficking to the primary cilium membrane. *Mol Biol Cell* 2017; 28: 233–239.
- 7 Ishikawa T. Axoneme structure from motile cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9: a028076.
- 8 Delgehyr N, Meunier A, Faucourt M, et al. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. *Methods Cell Biol* 2015; 127: 19–35.
- 9 Jain R, Pan J, Driscoll JA, et al. Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 43: 731–739.
- 10 Perotin J-M, Coraux C, Lagonotte E, et al. Alteration of primary cilia in COPD. *Eur Respir J* 2018; 52: 1800122.
- 11 Campinho P, Vilfan A, Vermot J. Blood flow forces in shaping the vascular system: a focus on endothelial cell behavior. *Front Physiol* 2020; 11: 552.
- 12 Wu J, Du H, Wang X, et al. Characterization of primary cilia in human airway smooth muscle cells. *Chest* 2009; 136: 561–570.
- 13 Trempus CS, Song W, Lazrak A, et al. A novel role for primary cilia in airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 313: L328–L338.
- 14 Lee J, Oh DH, Park KC, et al. Increased primary cilia in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cells* 2018; 41: 224–233.
- 15 Li R, Li X, Hagood J, et al. Myofibroblast contraction is essential for generating and regenerating the gas-exchange surface. *J Clin Invest* 2020; 130: 2859–2871.
- 16 Hogg JC, Paré PD, Hackett T-L. The contribution of small airway obstruction to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 2017; 97: 529–552.
- 17 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* 2019; 146: dev177428.
- 18 Bukowy-Bieryłto Z, Dąca-Roszak P, Jurczak J, et al. In vitro differentiation of ciliated cells in ALI-cultured human airway epithelium – the framework for functional studies on airway differentiation in ciliopathies. *Eur J Cell Biol* 2022; 101: 151189.
- 19 Mao S, Shah AS, Moninger TO, et al. Motile cilia of human airway epithelia contain hedgehog signaling components that mediate noncanonical hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115: 1370–1375.
- 20 Belgacemi R, Diabasana Z, Hoarau A, et al. Primary ciliogenesis is a crucial step for multiciliated cell determinism in the respiratory epithelium. *J Cell Mol Med* 2021; 25: 7575–7579.
- 21 Plotnikova OV, Pugacheva EN, Golemis EA. Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol* 2009; 94: 137–160.

- 22 Ma N, Zhou J. Functions of endothelial cilia in the regulation of vascular barriers. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 626.
- 23 Goetz JG, Steed E, Ferreira RR, et al. Endothelial cilia mediate low flow sensing during zebrafish vascular development. *Cell Rep* 2014; 6: 799–808.
- 24 Luu VZ, Chowdhury B, Al-Omran M, et al. Role of endothelial primary cilia as fluid mechanosensors on vascular health. *Atherosclerosis* 2018; 275: 196–204.
- 25 Dummer A, Rol N, Szulcek R, et al. Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: loss of cilia length regulation upon cytokine stimulation. *Pulm Circ* 2018; 8: 2045894018764629.
- 26 Singh S, Adam M, Matkar PN, et al. Endothelial-specific loss of IFT88 promotes endothelial-to-mesenchymal transition and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 2020; 10: 4466.
- 27 Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- β -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2012; 181: 2126–2137.
- 28 Shi W, Ma Z, Zhang G, et al. Novel functions of the primary cilium in bone disease and cancer. *Cytoskeleton* 2019; 76: 233–242.
- 29 Upadhyai P, Guleria VS, Udupa P. Characterization of primary cilia features reveal cell-type specific variability in *in vitro* models of osteogenic and chondrogenic differentiation. *PeerJ* 2020; 8: e9799.
- 30 Zhou H, Wu S, Ling H, et al. Primary cilia: a cellular regulator of articular cartilage degeneration. *Stem Cells Int* 2022; 2022: 2560441.
- 31 Oltean A, Schaffer AJ, Bayly PV, et al. Quantifying ciliary dynamics during assembly reveals stepwise waveform maturation in airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018; 59: 511–522.
- 32 Shoemark A, Hogg C. Electron tomography of respiratory cilia. *Thorax* 2013; 68: 190–191.
- 33 Button B, Cai L-H, Ehre C, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* 2012; 337: 937–941.
- 34 Chilvers MA, O'Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 2000; 55: 314–317.
- 35 Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and mucociliary clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9: a028241.
- 36 Workman AD, Cohen NA. The effect of drugs and other compounds on the ciliary beat frequency of human respiratory epithelium. *Am J Rhinol Allergy* 2014; 28: 454–464.
- 37 Luczka-Majérus E, Bonnomet A, Germain A, et al. Ciliogenesis is intrinsically altered in COPD small airways. *Eur Respir J* 2022; 60: 2200791.
- 38 Wildung M, Herr C, Riedel D, et al. miR449 protects airway regeneration by controlling AURKA/HDAC6-mediated ciliary disassembly. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 7749.
- 39 Germain A, Perotin J-M, Delepine G, et al. Whole-exome sequencing of bronchial epithelial cells reveals a genetic print of airway remodelling in COPD. *Biomedicines* 2022; 10: 1714.
- 40 Thomas B, Koh MS, O'Callaghan C, et al. Dysfunctional bronchial cilia are a feature of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *COPD* 2021; 18: 657–663.
- 41 Ancel J, Belgacemi R, Diabasana Z, et al. Impaired ciliary beat frequency and ciliogenesis alteration during airway epithelial cell differentiation in COPD. *Diagnostics* 2021; 11: 1579.
- 42 Perotin J-M, Polette M, Deslée G, et al. CiliOPD: a ciliopathy-associated COPD endotype. *Respir Res* 2021; 22: 74.
- 43 Gindele JA, Kiechle T, Benediktus K, et al. Intermittent exposure to whole cigarette smoke alters the differentiation of primary small airway epithelial cells in the air-liquid interface culture. *Sci Rep* 2020; 10: 6257.
- 44 Gohy S, Carlier FM, Fregimilicka C, et al. Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 2019; 9: 17963.
- 45 Petit A, Knabe L, Khelloufi K, et al. Bronchial epithelial calcium metabolism impairment in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. Decreased ORAI3 signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; 61: 501–511.
- 46 Qiao D, Ameli A, Prokopenko D, et al. Whole exome sequencing analysis in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mol Genet* 2018; 27: 3801–3812.
- 47 Åstrand ABM, Hemmerling M, Root J, et al. Linking increased airway hydration, ciliary beating, and mucociliary clearance through ENaC inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308: L22–L32.
- 48 Hessel J, Heldrich J, Fuller J, et al. Intraflagellar transport gene expression associated with short cilia in smoking and COPD. *PLoS One* 2014; 9: e85453.
- 49 Lam HC, Cloonan SM, Bhashyam AR, et al. Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *J Clin Invest* 2013; 123: 5212–5230.
- 50 Yaghi A, Zaman A, Cox G, et al. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respir Med* 2012; 106: 1139–1147.

- 51 Koblizek V, Tomsova M, Cermakova E, et al. Impairment of nasal mucociliary clearance in former smokers with stable chronic obstructive pulmonary disease relates to the presence of a chronic bronchitis phenotype. *Rhinology* 2011; 49: 397–406.
- 52 Piatti G, Ambrosetti U, Santus P, et al. Effects of salmeterol on cilia and mucus in COPD and pneumonia patients. *Pharmacol Res* 2005; 51: 165–168.
- 53 Pampliega O, Cuervo AM. Autophagy and primary cilia: dual interplay. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 39: 1–7.
- 54 Cloonan SM, Lam HC, Rytter SW, et al. "Ciliophagy": the consumption of cilia components by autophagy. *Autophagy* 2014; 10: 532–534.
- 55 Tilley AE, Walters MS, Shaykhiiev R, et al. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu Rev Physiol* 2015; 77: 379–406.
- 56 Lucas JS, Davis SD, Omran H, et al. Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 202–216.
- 57 Wain LV, Sayers I, Soler Artigas M, et al. Whole exome re-sequencing implicates CCDC38 and cilia structure and function in resistance to smoking related airflow obstruction. *PLoS Genet* 2014; 10: e1004314.
- 58 Bailey KL. Aging diminishes mucociliary clearance of the lung. *Adv Geriatr Med Res* 2022; 4: e220005.
- 59 Alter P, Baker JR, Dauletbaev N, et al. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2019. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 202: 348–355.
- 60 Tran HB, Jersmann H, Truong TT, et al. Disrupted epithelial/macrophage crosstalk via Spinstar homologue 2-mediated S1P signaling may drive defective macrophage phagocytic function in COPD. *PLoS One* 2017; 12: e0179577.
- 61 Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen C-T, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet* 2014; 46: 646–651.
- 62 Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, et al. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med* 2023; 29: 1563–1577.
- 63 Liu Z, Nguyen QPH, Guan Q, et al. A quantitative super-resolution imaging toolbox for diagnosis of motile ciliopathies. *Sci Transl Med* 2020; 12: eaay0071.
- 64 Gil DA, Sharick JT, Mancha S, et al. Redox imaging and optical coherence tomography of the respiratory ciliated epithelium. *J Biomed Opt* 2019; 24: 1–4.
- 65 Tratnjek L, Kreft M, Kristan K, et al. Ciliary beat frequency of *in vitro* human nasal epithelium measured with the simple high-speed microscopy is applicable for safety studies of nasal drug formulations. *Toxicol In Vitro* 2020; 66: 104865.
- 66 Ishikawa T, Ueno H, Omori T, et al. Cilia and centrosomes: ultrastructural and mechanical perspectives. *Semin Cell Dev Biol* 2021; 110: 61–69.
- 67 Ijaz F, Ikegami K. Live cell imaging of dynamic behaviors of motile cilia and primary cilium. *Microscopy* 2019; 68: 99–110.
- 68 Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, et al. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis* 2017; 15: 25.
- 69 Gilley SK, Stenbit AE, Pasek RC, et al. Deletion of airway cilia results in noninflammatory bronchiectasis and hyperreactive airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 306: L162–L169.
- 70 Zheng R, Yang W, Wen Y, et al. *Dnah9* mutant mice and organoid models recapitulate the clinical features of patients with PCD and provide an excellent platform for drug screening. *Cell Death Dis* 2022; 13: 559.
- 71 Belgacemi R, Luczka E, Ancel J, et al. Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. *EBioMedicine* 2020; 51: 102572.
- 72 Carlier FM, Dupasquier S, Ambroise J, et al. Canonical WNT pathway is activated in the airway epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *EBioMedicine* 2020; 61: 103034.
- 73 Serra CFH, Liu H, Qian J, et al. Prominin 1 and Notch regulate ciliary length and dynamics in multiciliated cells of the airway epithelium. *iScience* 2022; 25: 104751.
- 74 Koh YY, Sun YH, Min Y-G, et al. Chemotaxis of blood neutrophils from patients with primary ciliary dyskinesia. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 36–41.
- 75 McFie M, Koneva L, Collins I, et al. Ciliary proteins specify the cell inflammatory response by tuning NFκB signalling, independently of primary cilia. *J Cell Sci* 2020; 133: jcs.239871.
- 76 Schmid A, Baumlin N, Ivonnet P, et al. Roflumilast partially reverses smoke-induced mucociliary dysfunction. *Respir Res* 2015; 16: 135.
- 77 Katsumata M, Fujisawa T, Kamiya Y, et al. Effects of long-acting muscarinic antagonists on promoting ciliary function in airway epithelium. *BMC Pulm Med* 2022; 22: 186.

Chapitre IV : La voie Hedgehog

1. Découverte de la voie Hedgehog

Le gène *hedgehog* (*Hh*) a été décrit pour la première fois par E. Wieschaus et C. Nüsslein-Volhard en 1980 lors d'études menées sur le développement de la drosophile (*Drosophila Melanogaster*) [117]. Une mutation sur le locus du gène a été observée chez des mutants de drosophiles, présentant un phénotype ressemblant à un hérisson, donnant ainsi le nom du gène.

Les composants et le mécanisme de signalisation ont été initialement élucidés chez la drosophile (**Figure 13**). Le gène *Hh* code une protéine éponyme qui agit en ligand, en amont de la signalisation. Il se fixe sur le récepteur *patched* (*Ptc*) levant l'inhibition exercée sur *Smo* (*smoothened*) et entraînant l'activation de la voie [118]. Le facteur de transcription *Ci* (*cubitus interruptus*) est alors transloqué dans le noyau et active la transcription des gènes cibles [119].

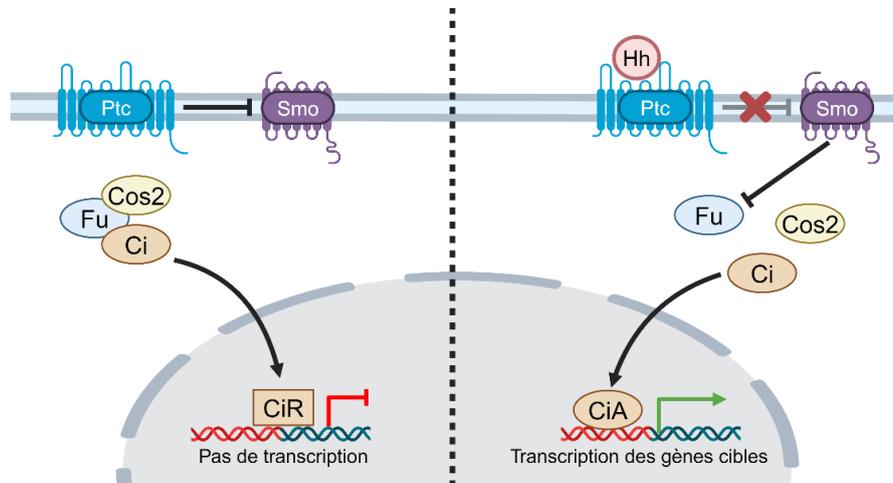


Figure 13 : Schéma de la voie de signalisation Hedgehog chez la drosophile

Ci : *cubitus interruptus* / *Cos2* : *costal 2* / *Fu* : *fused*
Hh : *hedgehog* / *Ptc* : *patched* / *Smo* : *smoothened*

2. Acteurs principaux de la voie Hedgehog chez les vertébrés

L'activation de la voie de signalisation Hedgehog (HH) chez les vertébrés peut s'effectuer par la voie non-canonique (dépendante ou indépendante du ligand), non localisée dans le cil primaire ou par la voie canonique dont le mécanisme sera décrit.

2.1. Les ligands : de la synthèse à la sécrétion

2.1.1. Généralités sur les trois ligands

Des éléments orthologues de la voie HH ont été identifiés chez les vertébrés. En effet, la voie de signalisation comporte trois ligands dont deux portent le nom d'une espèce d'hérisson, *Desert hedgehog* (Dhh) impliqué dans le développement des gonades et le maintien des gaines nerveuses [120–122] et *Indian hedgehog* (Ihh) impliqué dans le développement osseux et cartilagineux [123,124]. Le dernier, nommé d'après un personnage de jeux vidéo, *Sonic hedgehog* (Shh), est ubiquitaire et participe au développement des organes, ainsi qu'au maintien de l'homéostasie dans un contexte physiologique et à leur régénération lors de lésions. Ces trois ligands peuvent activer la voie HH à des niveaux d'intensité différents. L'activation induite par Shh est plus importante que celle de Ihh, elle-même plus importante que celle induite par Dhh [125].

2.1.2. Synthèse et modification de *Sonic hedgehog*

Shh est produit sous la forme d'un précurseur (45kDa) puis subit une auto-protéolyse entre les acides aminés Gly257 and Cys258 entraînant la libération de deux peptides (**Figure 14**) [126]. La partie C-terminale de 25 kDa va être dirigée vers le protéasome pour digestion et la partie N-terminale de 20 kDa va être modifiée par l'ajout d'une molécule de cholestérol de manière covalente sur le groupement carboxy-terminal [127].

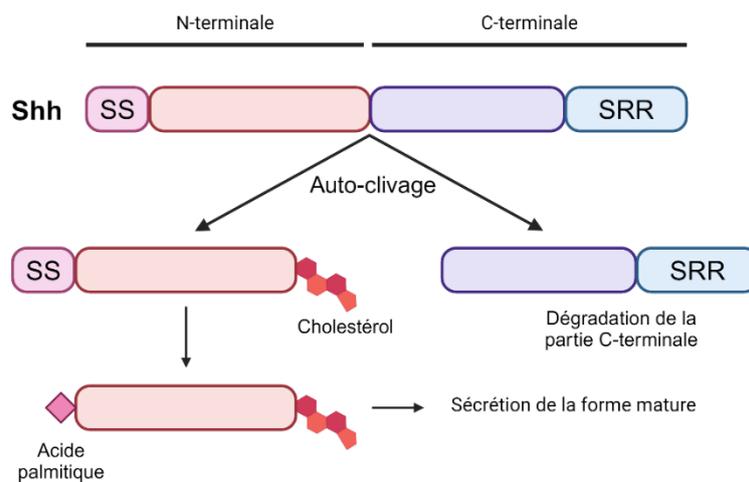


Figure 14 : Modifications post-transcriptionnelles de *Sonic hedgehog*

(modifié d'après Pereira et al., 2014)

Shh : *Sonic hedgehog* / SRR : *Sterol-recognition region* / SS : *Séquence Signal*

Ce peptide est par la suite dirigé vers le réticulum endoplasmique pour permettre l'ajout d'un acide palmitique en N-terminal sur un groupement amine par une palmitoyl-acyltransférase Hhat (*hedgehog acyltransferase*) localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique [128]. Cette palmitoylation est effectuée de manière indépendante du clivage et de l'ajout du cholestérol mais ces modifications, induisant une dualité lipidique, sont nécessaires et importantes pour constituer la forme mature de Shh et permettre sa sécrétion optimale [129,130].

2.1.3. Sécrétion et distribution de la forme mature de *Sonic hedgehog*

La forme mature de Shh (Shh-Np : *processed Shh amino-terminal*) est ancrée à la membrane plasmique par l'insertion du cholestérol dans la bicouche lipidique puis elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire pour permettre une action autocrine et paracrine [131]. La protéine transmembranaire *Dispatched-1* (Disp1) joue un rôle clé dans la sécrétion de Shh-Np, notamment pour l'effet paracrine, car elle interagit avec le cholestérol lié à Shh-Np par une liaison transitoire et permet sa libération sous différentes formes (**Figure 15**) [132,133]. Des analyses de poids moléculaires de Shh-Np ont identifié un poids élevé lors de la sécrétion indiquant la formation de multimères, et notamment d'hexamères [134–136]. Le ligand s'associe également à d'autres protéines, notamment des lipoprotéines ou des protéoglycanes à héparanes sulfate [137,138]. Sa distribution aux cellules avoisinantes peut être effectuée par transport le long du cytonème ou par vésicules extracellulaires [139,140].

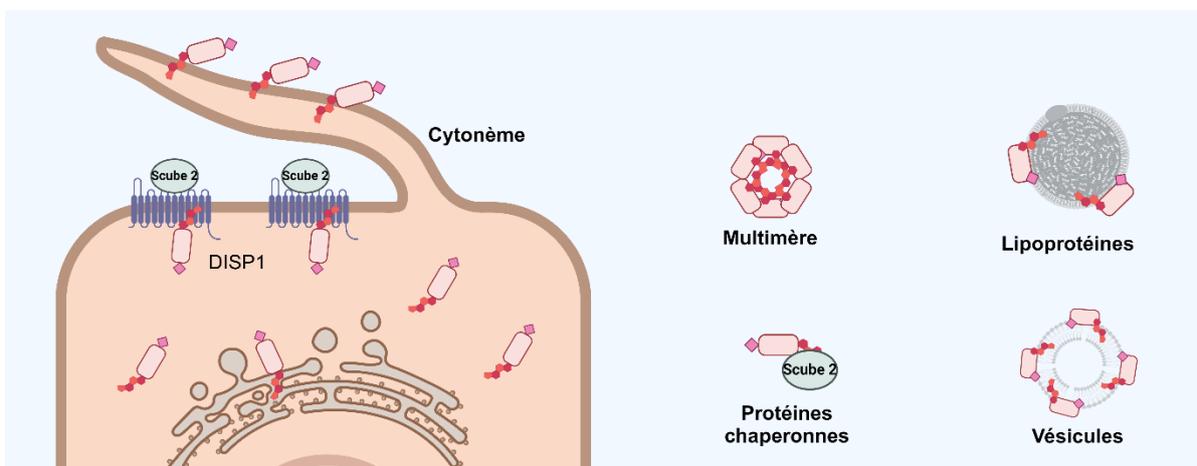


Figure 15 : Sécrétion et distribution de *Sonic Hedgehog*

Disp1 : *Dispatched-1* / Scube2 : *Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2* / Shh : *Sonic hedgehog*

Néanmoins, la forme majoritaire de distribution de Shh-Np semble associée aux protéines chaperonnes de la famille SCUBE, notamment Scube2 (*Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2*). Cette dernière est une protéine présente uniquement chez les vertébrés possédant trois domaines CRD (*cysteine-rich domain*) et un domaine CUB nécessaires pour la libération de Shh-Np. Scube2 interagit avec un motif du cholestérol lié à Shh-Np permettant son transfert de Disp1 sur celle-ci à l'aide du gradient Na⁺ et entraînant ainsi sa sécrétion dans le milieu extracellulaire pour une distribution et action paracrine [133,141–143].

2.2. Les récepteurs de la voie Hedgehog

2.2.1. Patched

La protéine *Patched-1* (Ptc1) est un récepteur de 161 kDa. Ses extrémités carboxy-terminale et amino-terminale sont localisées en intracellulaire. Il possède 12 domaines transmembranaires (TM), 2 boucles extracellulaires (entre TM1-TM2 et entre TM7-TM8) et une boucle intracellulaire (entre TM6-TM7). Le ligand Shh-Np se loge entre les deux boucles extracellulaires pour activer la voie de signalisation, ce qui souligne leur importance dans la structure du récepteur [144,145].

Ptc1 possède un récepteur homologue moins étudié, Ptc2 (*Patched-2*) [146]. Il peut également lier Shh mais son rôle dans la signalisation n'est pas totalement élucidé. Il semble néanmoins minoritaire et non-essentiel à l'activation de la voie HH [147–149].

2.2.2. Smoothed

Smo est un récepteur de 86 kDa de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est composé de 7 TM et 4 régions extracellulaires riches en cystéines impliquées dans son changement de conformation lors de son activation. Il peut lier plusieurs ligands permettant une régulation de son activité tels que des stérols (cholestérol et 20(S)-hydroxycholestérol) ou des molécules ressemblant à des stérols (cyclopamine et 22-azacholestérol) [150–153].

2.3. Les facteurs de transcription Glis

Le facteur de transcription Ci chez la drosophile possède trois orthologues de la famille Glis (*Glioma-associated oncogen*) chez les vertébrés, Gli1, Gli2, Gli3. Ce sont des facteurs de transcription possédant tous 5 domaines de type doigt de zinc et un domaine transactivateur (Figure 16).

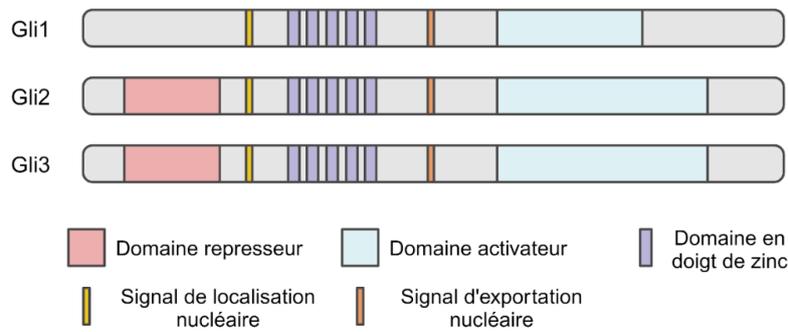


Figure 16 : Domaines et motifs des facteurs de transcription Glis

Glis : Glioma-associated oncogen

Cependant, Gli1 est décrit comme activateur de la voie uniquement alors que Gli2 et Gli3 possèdent également un domaine répressueur en N-terminal pouvant être clivé et transloqué dans le noyau pour inhiber la voie HH [154,155]. Ils sont décrits comme forme complète (FL), forme répressive (R) et forme activatrice (A). Généralement, Gli2 et Gli1 sont les facteurs activateurs, respectivement principal et secondaire, alors que Gli3 est le facteur répressueur [156].

3. Réception et transduction du signal de la voie Hedgehog

3.1. Signalisation en absence du ligand

3.1.1. Inhibition de Ptch1 sur Smo

En absence du ligand, Ptch1, localisé dans le cil primaire, exerce une inhibition sur Smo et empêche son accumulation dans le cil [157]. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer les mécanismes d'action. La première suggérait une inhibition par contact direct entre les deux récepteurs mais elle a été réfutée car une mole de Ptch1 peut inhiber 50 moles de Smo [158].

La seconde suggère que Ptch1 inhibe Smo en modifiant la distribution et/ou la concentration de petites molécules affectant le transport et l'activation de Smo, telles que des stéroïls [159,160]. En effet, Ptch1 pourrait empêcher la fixation de molécules de cholestérol sur le domaine CRD de Smo en modifiant sa localisation (du feuillet externe au feuillet interne) (**Figure 17A**). Il pourrait également extraire la molécule de ce domaine à l'aide du gradient K^+ et ainsi inhiber l'activation de Smo (**Figure 17B**) [143,161].

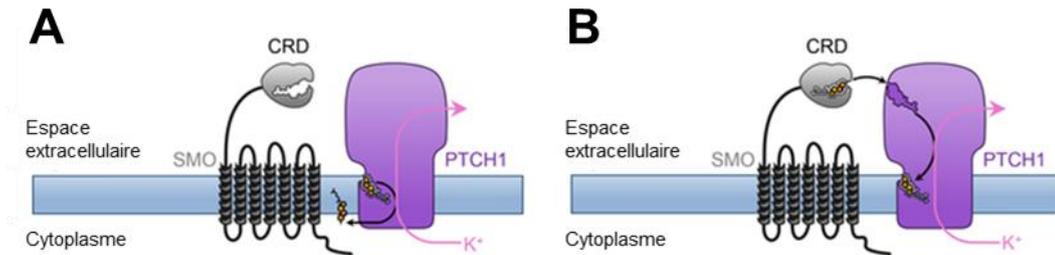


Figure 17 : Hypothèse d'inhibition de *Patched-1* sur *Smoothened*

(modifié d'après Petrov et al. 2020)

CRD : cysteine-rich domain / Ptch1 : *Patched-1* / Smo : *Smoothened*

3.1.2. Modifications et translocation de Gli3

L'inhibition de Smo exercée par Ptch1 permet le recrutement du récepteur GPR161 (*G-protein coupled receptor 161*) à la membrane du cil primaire (**Figure 18**). Il intervient dans la régulation de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et entraîne son augmentation intracellulaire [162]. Smo est ubiquitinylé et endocyté pour être dégradé par le protéasome ou pour être recyclé à la membrane plasmique. Le facteur de transcription Gli3^{FL} se fixe sur les protéines Kif7 (*Kinesin-like protein 7*) phosphorylé et SuFu (*Suppressor of Fused protein*) qui le stabilisent et le séquestrent à la base du cil primaire [163]. Il est alors phosphorylé par des kinases activées par l'augmentation de l'AMPc, PKA (*Protein Kinase A*), GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) et CK1 (*Casein Kinase I*) [164,165]. Cette phosphorylation augmente son affinité pour une ubiquitine ligase, entraînant la dégradation partielle de Gli3^{FL} en Gli3^R [166,167]. Pour finir, la forme répressive Gli3^R est transloquée dans le noyau pour inhiber la voie HH.

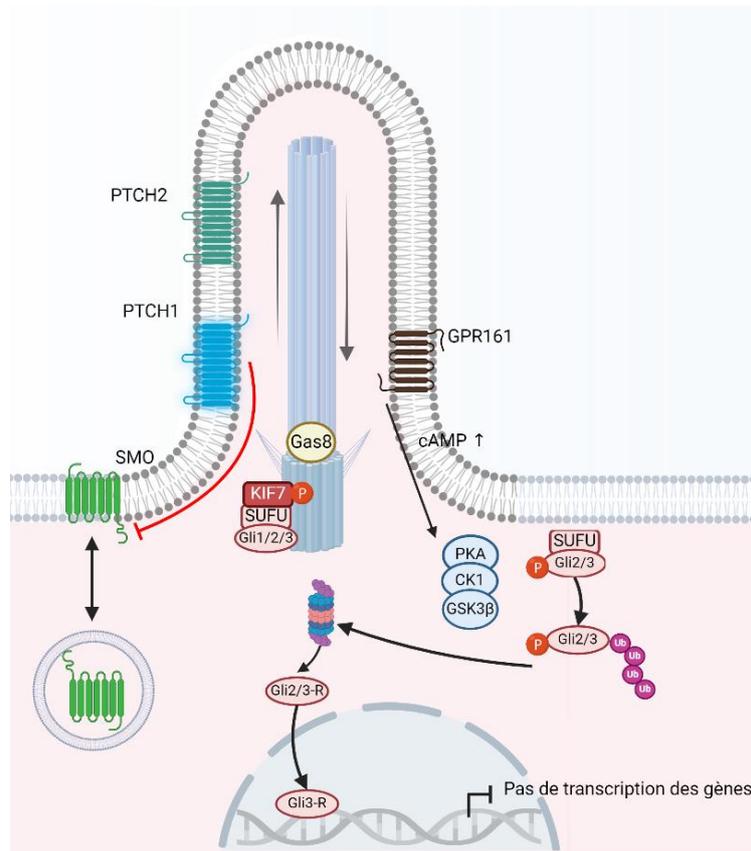


Figure 18 : Signalisation de la voie Hedgehog en absence du ligand

CK1 : Casein Kinase I / Gas8 : Growth arrest-specific protein 8 / Glis : Glioma-associated oncogen / GPR161 : G-protein coupled receptor 161 / GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β / Kif7 : Kinesin-like protein 7 / PKA : Protein Kinase A / Ptch : Patched / Smo : Smoothened / SuFu : Suppresor of Fused protein

3.2. Signalisation en présence du ligand

3.2.1. Fixation du ligand sur les récepteurs et corécepteurs

Après sécrétion de Shh-Np lié à Scube2, la fixation sur Ptch1 nécessite plusieurs étapes préliminaires car Scube2 interfère dans l'interaction et entraîne une diminution de l'affinité du ligand pour le récepteur (**Figure 19**). Le complexe Scube2/Shh-Np se fixe d'abord sur les corécepteurs Cdo (*Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes*) ou Boc (*Brother of Cdo*) formant un complexe tripartite. Shh-Np se fixe sur le motif Fn3 (fibronectine) du corécepteur et Scube2 sur les motifs Fn1 et Fn2 provoquant une accumulation localisée du ligand. Shh-Np est transféré seul sur un autre corécepteur Gas1 (*Growth arrest-specific protein 1*) puis finalement sur Ptch1. Gas1 semble indispensable pour l'activation alors que Cdo/Boc semblent requis pour une activation optimale [168–170]. Le ligand peut également se fixer sur GPC3 (*Glypican-3*) ou GPC6 (*Glypican-6*), facilitant l'interaction de Shh avec Ptch1 [171].

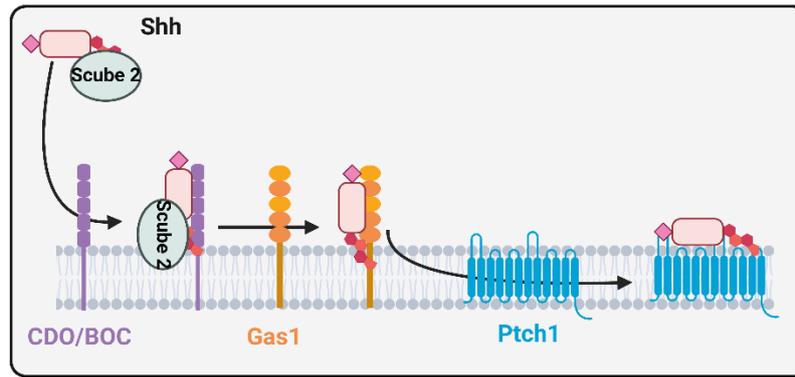


Figure 19 : Fixation du Shh-Np sur Ptch1 par l'intermédiaire de corécepteurs

(modifié d'après Wierbowski et al. 2020)

Boc : *Brother of Cdo* / Cdo : *Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes* / Gas1 : *Growth arrest-specific protein 1* / Ptch1 : *Patched-1* / Scube2 : *Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2* / Shh : *Sonic hedgehog*

La fixation du ligand sur Ptch1 permet la levée de l'inhibition sur Smo et induit un déplacement de Ptch1 hors du cil [144,157]. Des ubiquitines ligases de la famille des Smurfs (*Smad ubiquitination regulatory factor*) induisent l'ubiquitylation de Ptch1 sur des motifs PPXY (Proline-Proline-X-Tyrosine) entraînant son endocytose et celle de Shh par des radeaux lipidiques de type cavéoline-1 et médiée par des endosomes tardifs puis des lysosomes [172].

3.2.2. Transport et activation de Smo

La levée de l'inhibition de Smo induit son transport et son accumulation dans le cil primaire régulés par plusieurs protéines. Le recrutement de kinases, CK1 et GRK2 (*G-protein-coupled receptor kinase 2*), initie la phosphorylation du récepteur, son changement de conformation et son accumulation [173,174]. Smo est également sumoylé, indépendamment de la phosphorylation, participant à son activation mais également à son transport [175]. La bonne localisation du récepteur dans le cil est dépendante du complexe Smo/Kif3A (*Kinesin-like protein 3A*)/ β -arrestine et de la protéine Gas8 (*Growth arrest-specific protein 8*) [176,177].

3.2.3. Modifications et translocation de Gli2

La β -arrestine, recrutée lors du transport de Smo, se fixe sur la protéine GPR161 au niveau de son extrémité C-terminale et induit son endocytose [178]. L'AMPc intracellulaire se trouve diminué localement car il est dégradé par la phosphodiesterase 4 (PDE4) (**Figure 20**). Gli2^{FL} forme un complexe avec SuFu et est transporté à l'extrémité du cil par Kif7 déphosphorylé [163].

Les protéines EVC (*Ellis-van Creveld syndrome protein*) et EVC2 se fixent sur Smo phosphorylé et assure la transduction du signal en régulant la balance entre Gli^R et Gli^A [179]. Ils entraînent une dissociation du complexe à l'extrémité du cil, une instabilité de Gli2^{FL} et une libération de SuFu dans le cytoplasme qui est ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome [164,165,180]. Gli2^{FL} est transloqué dans le noyau puis phosphorylé pour être sous la forme Gli2^A. Sa fixation à l'ADN provoque la transcription des gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire (cycline-D/E, N-myc), l'apoptose (Bcl2), ou encore des éléments de la voie HH, tels que Ptch1/2, Gli1 et Hhip [181–183].

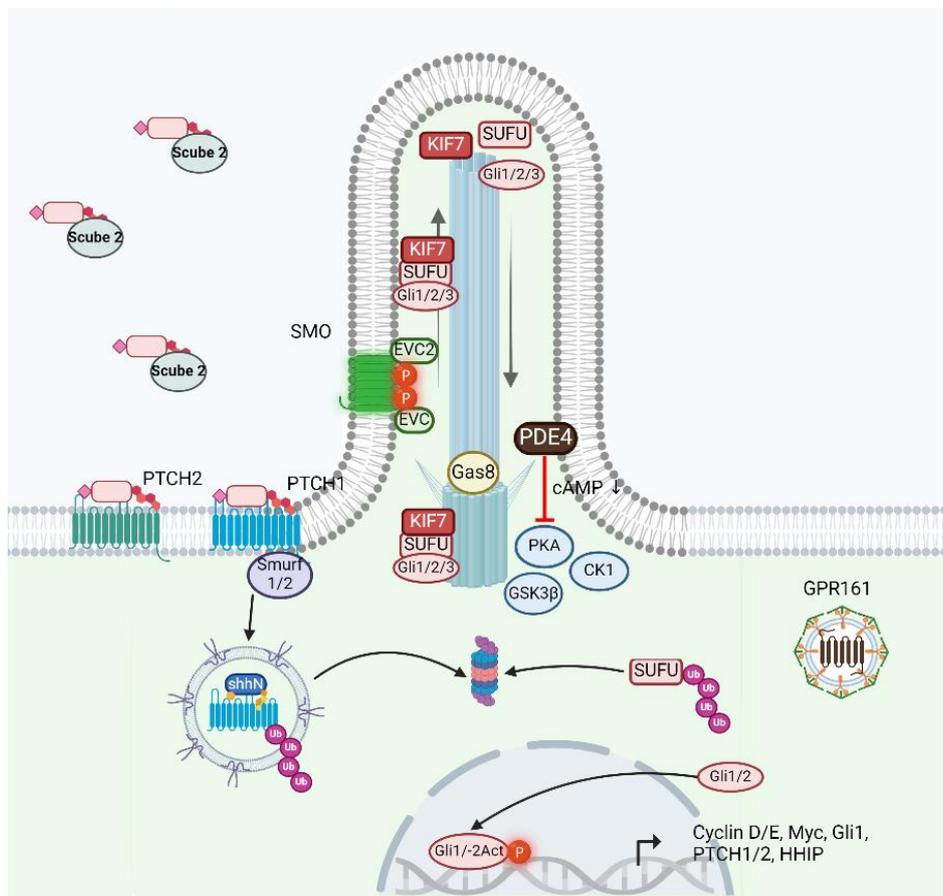


Figure 20 : Signalisation de la voie Hedgehog en présence du ligand

CK1 : *Casein Kinase I* / EVC : *Ellis-van Creveld syndrome protein* / Gas8 : *Growth arrest-specific protein 8* / Glis : *Glioma-associated oncogen* / GPR161 : *G-protein coupled receptor 161* / GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β* / Hhip : *Hedgehog interacting protein* / Kif7 : *Kinesin-like protein 7* / PDE4 : *phosphodiesterase 4* / PKA : *Protein Kinase A* / Ptch : *Patched* / Scube2 : *Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2* / Shh : *Sonic hedgehog* / Smo : *Smoothened* / Smurf : *Smad ubiquitination regulatory factor* / SuFu : *Suppressor of Fused protein*

3.3. Rétro-contrôle en présence du ligand

Le ligand Shh-Np peut également être impliqué dans le rétro-contrôle de la voie HH et entraîner son inhibition. En effet, le corécepteur Hhip a été longtemps considéré comme transmembranaire ou lié à une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). Récemment, il a été décrit comme un antagoniste sécrété ou lié aux protéoglycanes à héparanes sulfate [184]. La fixation de Shh-Np sur Hhip prévient l'interaction avec Ptch1, il agit donc par séquestration du ligand. De plus, la fixation du ligand sur GPC3 peut entraîner une inhibition de la voie par compétition avec Ptch1 [185].

4. Implications physiologiques de l'activation de la voie Hedgehog

La voie HH est impliquée dans de nombreux processus cellulaires durant l'embryogenèse, tels que la différenciation et la prolifération cellulaire. Shh agit comme un morphogène pour le développement de différents organes, tels que les membres, le système nerveux central et les poumons.

4.1. Dans le développement pulmonaire

Le développement pulmonaire humain se déroule en 5 étapes, embryonnaire (0-7 semaines *in utero*), pseudoglandulaire (7-17 semaines *in utero*), caniculaire (17-27 semaines *in utero*), sacculaire (28-36 semaines *in utero*) et alvéolaire (36 semaines *in utero* - 2 ans). Les gènes principaux de la voie HH, Shh, Ptch1, Smo, Glis, sont exprimés de façon différentielle chez l'embryon humain en fonction des stades avec, pour certains, une diminution au cours du développement [186,187]. Cependant, l'expression de l'acteur régulateur Hhip augmente au cours du développement pulmonaire.

L'activation et la régulation de la voie HH est nécessaire et indispensable au développement pulmonaire. Le développement des bronches s'effectue par ramification induite par le facteur FGF-10 (*Fibroblast Growth Factor-10*) et notamment régulée par la voie HH. En effet, l'expression du ligand Shh entraîne une perte spatiale de FGF-10. Il est alors exprimé au niveau du bourgeon épithélial terminal, provoquant la ramification dichotomique des bronches [187,188].

L'inhibition de la voie HH au cours du développement provoque une anomalie dans cette ramification. La diminution du pourcentage de ramifications est causée par l'augmentation de la prolifération des cellules épithéliales et de la mort des cellules mésenchymateuses entraînant un défaut dans la balance des cellules progénitrices [187]. De plus, des malformations pulmonaires telles qu'une perte d'asymétrie, un défaut de ramification ou une taille et forme de lobe anormales sont retrouvées chez des souris mutantes respectivement pour Shh, Ptch1, Gli2, Gli3, avec pour certaines, une létalité précoce [189–191].

4.2. Dans l'homéostasie pulmonaire chez l'adulte

Chez l'adulte, la voie HH peut être impliquée dans le maintien de l'homéostasie ou la réparation tissulaire lors de lésions. Le ligand Shh semble exprimé dans l'épithélium pulmonaire (cellules club et multiciliées) et les pneumocytes de type II, alors que les Glis semblent exprimés dans les cellules épithéliales ou les cellules mésenchymateuses avoisinantes. L'activation de la voie est plus importante dans les cellules mésenchymateuses proximales que dans les cellules mésenchymateuses distales [192].

Récemment, la voie HH a été mise en évidence dans le maintien de l'état de quiescence des cellules mésenchymateuses en atténuant le cycle cellulaire et celui des cellules épithéliales par rétro-contrôle [193]. En effet, la déplétion de Shh dans les cellules épithéliales induit une prolifération accrue des cellules mésenchymateuses. Après une lésion, l'activation de la voie HH est diminuée ou inhibée entraînant la perte de la quiescence des cellules mésenchymateuses et la prolifération des cellules épithéliales pour réparer la lésion. L'expression de la voie HH redevient normale après plusieurs mois, lorsque l'état d'homéostasie est rétabli.

5. Implications pathologiques de la voie Hedgehog

L'activation exacerbée ou l'inhibition partielle/complète de la voie peuvent entraîner de nombreuses complications souvent pathologiques. La première implication d'une altération d'un élément de la voie HH a été mise en évidence dans la cancérogénèse puis dans diverses pathologies notamment respiratoires.

5.1. Cancérogénèse

La mise en cause d'un élément de la voie HH dans l'apparition d'une tumeur a été découverte en 1996. Une mutation inactivant Ptch1, entraînant une hyperactivation de la voie, a été mise en évidence chez des patients atteints du syndrome de Gorlin [194,195]. Il s'agit d'une maladie héréditaire avec une prédisposition à différents cancers notamment les carcinomes basocellulaires. Ces derniers sont majoritairement causés par une mutation de Ptch1 (85%) ou de Smo (10%). Ces cancers sont dits « de type I » car l'altération de la voie HH, causée par une mutation des récepteurs, est indépendante du ligand (**Figure 21**). Dans certains cancers tels que les médulloblastomes, la mutation peut être localisée dans le gène codant SuFu [196].

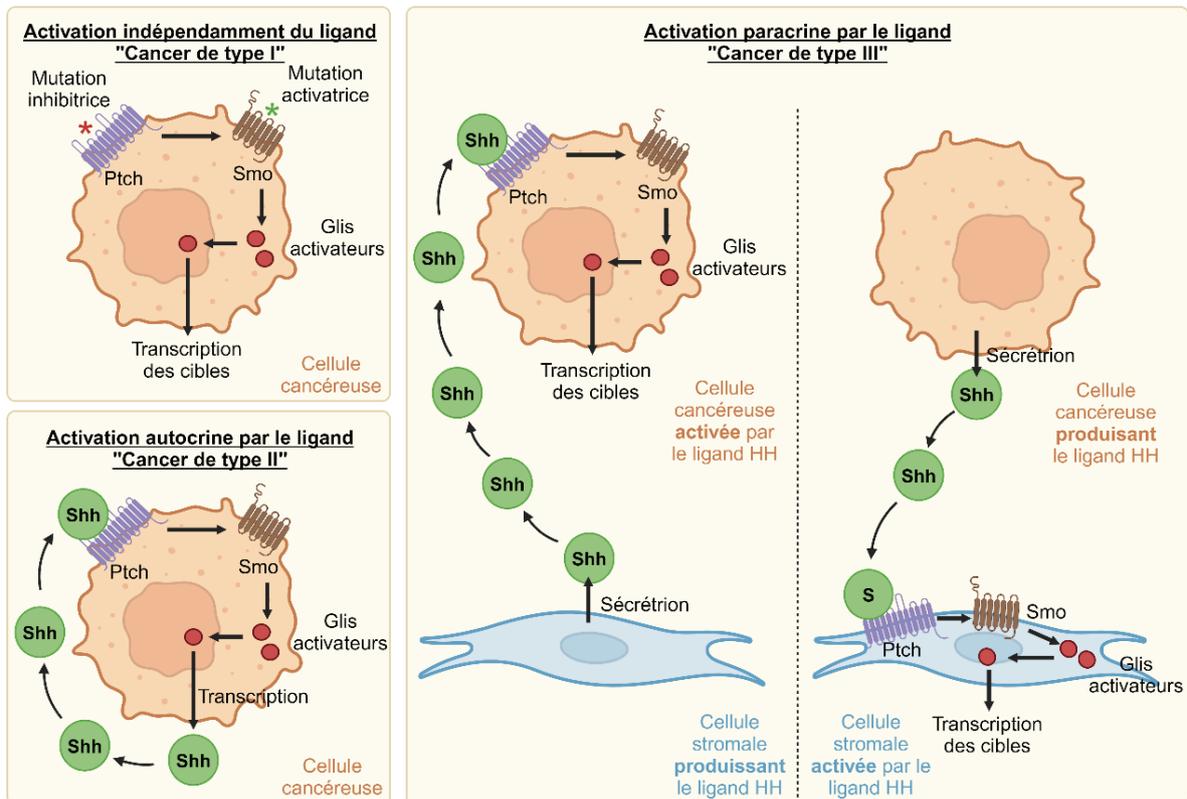


Figure 21 : Mécanismes d'action de la voie Hedgehog dans la cancérogénèse

(modifié d'après Hui et al. 2013)

Glis : Glioma-associated oncogen / Ptch : Patched / Shh : Sonic hedgehog / Smo : Smoothened

Dans les cancers dit « de type II » et « de type III », l'altération de la voie HH est dépendante du ligand et l'action est autocrine ou paracrine respectivement (**Figure 21**). Ces cancers touchent de nombreux organes, notamment le sein, le pancréas ou les poumons. Une surexpression du ligand Shh a été observée chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules et cancer bronchique à petites cellules [197,198]. De plus, la surproduction de Shh dans des modèles murins de cancer bronchique à petites cellules entraîne une augmentation de la taille de la tumeur alors que son inhibition entraîne une réduction de la croissance tumorale [199].

5.2. Pathologies respiratoires chroniques

5.2.1. Implication dans l'asthme

L'asthme est une pathologie respiratoire chronique causée par une inflammation des voies aériennes. Une surexpression de la voie HH, notamment Shh, a été mise en évidence dans les tissus de patients asthmatiques ou des modèles murins avec un asthme induit [200]. Cette altération de la voie peut être en partie à l'origine du remodelage observé, notamment une hyperplasie des cellules caliciformes, ou de l'inflammation par une réponse accrue des lymphocytes Th-2 et une augmentation de la sécrétion de IL-4 [200–202].

L'asthme est également caractérisé par un épaississement des parois bronchiques. L'augmentation du dépôt de MEC est causée par la surexpression de COL1A1 (*Collagen type Ia1*) et MMP2 induite par TGFβ1. Il a été démontré que la voie HH, notamment l'axe Smo/Gli, peut jouer un rôle dans la régulation de l'expression du collagène sous-épithélial dans le contexte asthmatique [203]. En effet, l'inhibition de Ptch1 dans des cellules traitées avec du TGFβ1 entraîne une diminution de l'expression induite de COL1A1 et MMP2. A l'inverse, une surexpression de Ptch1 entraîne davantage la surexpression des gènes induite par la stimulation de TGFβ1. Le même constat est retrouvé *in vivo* dans un contexte d'asthme sur des modèles murins Ptch1^{+/-}.

5.2.2. Implication dans la bronchopneumopathie chronique obstructive

Les causes de la BPCO ne sont pas totalement élucidées. Néanmoins, la susceptibilité du développement de cette pathologie peut être partiellement associée à la modification mineure d'un seul nucléotide dans le génome, les SNPs.

La région chromosomique 4q31 est très souvent mise en évidence dans les analyses GWAS (*genome-wide association studies*) liées à cette pathologie et un déclin de la fonction pulmonaire [66,204,205]. Cette région est localisée proche du locus du gène Hhip, régulateur de la voie HH, et présente différents SNPs qui peuvent être associés à la fréquence d'exacerbation et le développement d'emphysème dans la BPCO (**Figure 22**) [67,206].

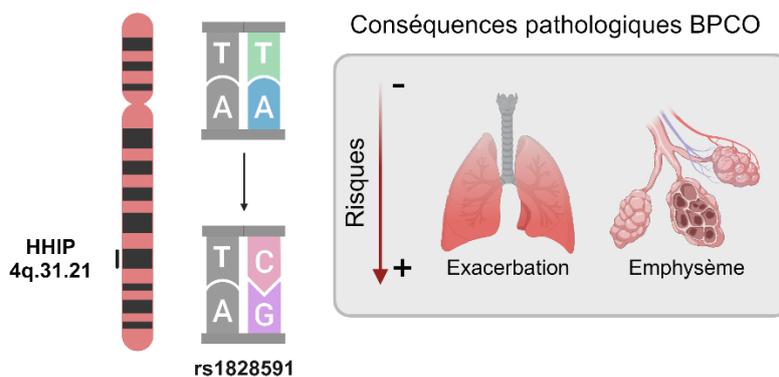


Figure 22 : Implications d'un SNP proche de Hhip dans la BPCO

Hhip : *Hedgehog interacting protein*

Les acteurs principaux de la voie HH semblent impliqués dans le contexte pathologique de la BPCO. En effet, l'expression des acteurs principaux Gli2, Smo et Shh est diminuée chez les patients BPCO [207]. La concentration du ligand Shh est également plus faible dans le liquide broncho-alvéolaire (LBA) de patients BPCO [208]. De plus, l'inhibition de la voie HH par un anticorps fixant le ligand, AB5E1, entraîne un remodelage caractéristique de la BPCO, tel qu'une hyperplasie des cellules basales, une diminution de cellules multiciliées et un rapport des mucines Muc5ac/Muc5b altéré [207]. Ces résultats témoignent de l'implication de la voie HH dans la différenciation des cellules épithéliales, d'une diminution de l'activation de la voie dans cette pathologie participant au remodelage et son potentiel ciblage thérapeutique.

6. Modulations pharmacologiques de la voie Hedgehog en clinique

Les différents acteurs de la voie HH peuvent être ciblés par un agent thérapeutique dans des contextes pathologiques. Néanmoins, la majorité des agents en développement ciblent le récepteur Smo car il est membranaire, ce qui facilite la fixation de l'antagoniste sur le récepteur.

Le premier antagoniste de la voie HH est la cyclopamine, composé dérivant d'une plante [209,210]. Il empêche l'activation de la voie en se fixant sur le récepteur Smo. Malgré des résultats prometteurs dans la cancérogenèse, il n'est pas utilisé comme agent thérapeutique en raison de sa faible solubilité et de sa toxicité provoquant de nombreux effets indésirables. Des dérivés de ce composé sont donc en développement, notamment le IPI-926, aussi appelé Saridegib [211,212]. Il est étudié dans le cas d'essais cliniques de phase 2 ou 3 dans le contexte du syndrome de Gorlin, de carcinomes basocellulaires ou de cancers pancréatiques.

D'autres inhibiteurs sont en cours de développement, tel que l'Itraconazole, anti-fongique inhibant l'accumulation de Smo dans le cil primaire [213]. Des essais cliniques de phase 2 sont en cours pour étudier son efficacité dans les carcinomes basocellulaires ou les cancers pulmonaires non à petites cellules (**Tableau 1**). Le Taladegib, quant à lui, est utilisé en phase 1 et 2 d'essais cliniques, seul ou en combinaison avec des traitements plus conventionnels ou d'autres agents thérapeutiques [214,215]. Les essais portent sur différents types de cancers, notamment pulmonaires ou encore des pathologies respiratoires comme la fibrose pulmonaire idiopathique.

Tableau 1 : Essais cliniques des inhibiteurs de Smo dans le contexte pulmonaire

Inhibiteurs	Pathologies pulmonaires	Statut de l'essai clinique	Référence
Itraconazole	Cancer pulmonaire non à petites cellules	Complété	NCT02357836
Taladegib	Cancer pulmonaire à petites cellules	Terminé	NCT01722292
	Fibrose pulmonaire idiopathique	Complété	NCT05817240 NCT04968574
Sonidegib	Cancer pulmonaire à petites cellules	Complété	NCT01579929
Vismodegib	Cancer pulmonaire à petites cellules	Complété	NCT00887159

Quelques inhibiteurs ont obtenu des autorisations de mise sur le marché et sont désormais utilisés comme traitement ciblant Smo dans la voie HH. En 2013, le Vismodegib (Erivedge®) a été approuvé pour le traitement de carcinome basocellulaire de stade avancé ou métastatique [216,217]. En 2015, le Sonidegib (Erismodegib, Odomzo®) est le deuxième inhibiteur autorisé dans le même contexte [218]. Ces deux traitements sont également utilisés dans des essais cliniques sur les cancers pulmonaires à petites cellules (**Tableau 1**). Plus récemment, en 2020, le Glasdegib (Daurismo®) a été approuvé pour l'utilisation en combinaison avec un autre agent thérapeutique dans la leucémie myéloïde aigüe [219].

L'émergence de résistances à ces différents traitements engendre la nécessité de développer des nouvelles générations ou de cibler un autre acteur de la voie HH (**Figure 23**).

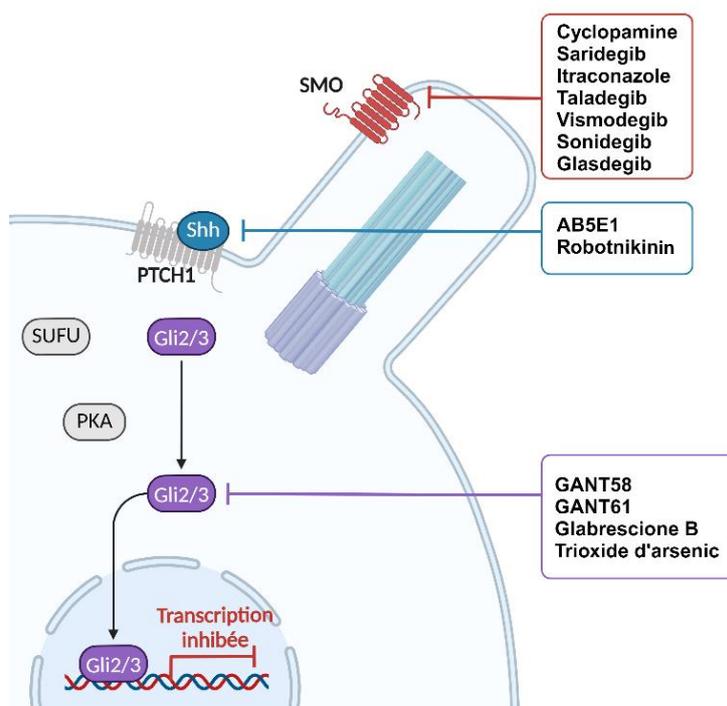


Figure 23 : Modulateurs pharmacologiques et cibles de la voie Hedgehog

Gli3 : *Glioma-associated oncogen* / PKA : *Protein Kinase A* / Ptch1 : *Patched-1* / Shh : *Sonic hedgehog* / Smo : *Smoothened* / SuFu : *Suppresor of Fused protein*

L'inhibition des facteurs de transcription Glis est étudiée et a permis de mettre en évidence des composés tels que Gli3 GANT58, GANT61 et Glabrescione B. Ils interfèrent avec la liaison des Glis à l'ADN et empêchent donc l'activation de la voie et la transcription des gènes cibles [220]. A ce jour, aucun essai clinique utilisant ces inhibiteurs n'a été réalisé.

L'inhibiteur ATO (trioxide d'arsenic, Trisenox®) a été approuvé dans le contexte de leucémie myéloïde aigüe. L'utilisation de ce composé en association avec l'Itraconazole semble montrer une efficacité accrue lors de résistance aux antagonistes de Smo [221]. Ce composé est également utilisé dans divers essais cliniques dans les cancers pulmonaires. La séquestration du Shh pourrait également permettre l'inactivation de la voie HH en empêchant la fixation du ligand sur le récepteur Ptch1. Deux composés sont étudiés *in vitro* ou dans des modèles précliniques, AB5E1 et Robotnikinin [222,223].

Objectifs de la thèse

La BPCO devient la troisième cause de mortalité par maladie. Le tabagisme est de loin le principal facteur de risque mais la BPCO est également observée en absence de celui-ci, suggérant une susceptibilité individuelle non encore élucidée. Des études ont démontré que la voie de signalisation HH est intrinsèquement liée au cil primaire et que des éléments principaux de la voie sont dérégulés au cours de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et dans la BPCO. En effet, il a été démontré, au sein du laboratoire, que la voie HH est activée lors de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et son inhibition entraîne un remodelage épithélial bronchique, caractéristique de la BPCO [207]. De plus, il existe une altération des éléments principaux de la voie HH dans la BPCO. La mécanistique et les conséquences de cette altération dans la physiopathologie restent à élucider.

Le projet de thèse s'articule selon deux axes afin de caractériser de nouveaux régulateurs de la voie HH dans le contexte pulmonaire en lien avec le remodelage épithélial.

L'objectif du premier axe est l'**identification de corécepteurs de la voie HH** essentiels dans le contexte pulmonaire et **régulant la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes**.

L'analyse des corécepteurs a été effectuée par l'exploitation d'une base de données de séquençage de cellule unique (scRNAseq) sur l'interface cellxgene au niveau de différentes populations cellulaires pulmonaires afin de déterminer le corécepteur le plus pertinent à caractériser *in vitro* et *ex vivo*. Le profil transcriptomique du corécepteur GPC3 a été investigué à partir de bases de données et à partir d'ARNm extraits de cellules issues de brossages bronchiques de patients BPCO et non-BPCO mises en culture en interface air-liquide (IAL) pour une cinétique de différenciation. La localisation du corécepteur GPC3 et son expression ont été déterminées par immunomarquages fluorescents à partir de coupes en paraffine de tissus pulmonaires de patients non-BPCO et BPCO. Enfin, une modulation de la signalisation du corécepteur a été réalisée afin de déterminer son impact sur la voie HH et sur le remodelage épithélial au cours de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes.

L'objectif du deuxième axe est l'**identification des cibles de Shh régulant la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes**.

A partir d'échantillons issus de fibroscopies de patients ne présentant pas de pathologie respiratoire, les cellules épithéliales bronchiques ont été mises en culture en IAL en présence ou non d'un anticorps de la voie HH (AB5E1), captant le ligand et entraînant une inhibition de la signalisation. Un séquençage a été réalisé à partir des ARNm extraits de cellules non différenciées après 7 jours de culture afin d'obtenir un profil transcriptomique comparatif. La sélection et la validation des cibles moléculaires ont été réalisées à l'échelle protéique par marquages immunofluorescents et à l'échelle transcriptomique par RT-qPCR. Ces expériences ont été réalisées à partir de tissus pulmonaires FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) de patients BPCO et non-BPCO et d'ARNm extraits de cellules issues de brossages bronchiques de patients BPCO et non-BPCO mises en culture pour une cinétique de différenciation.

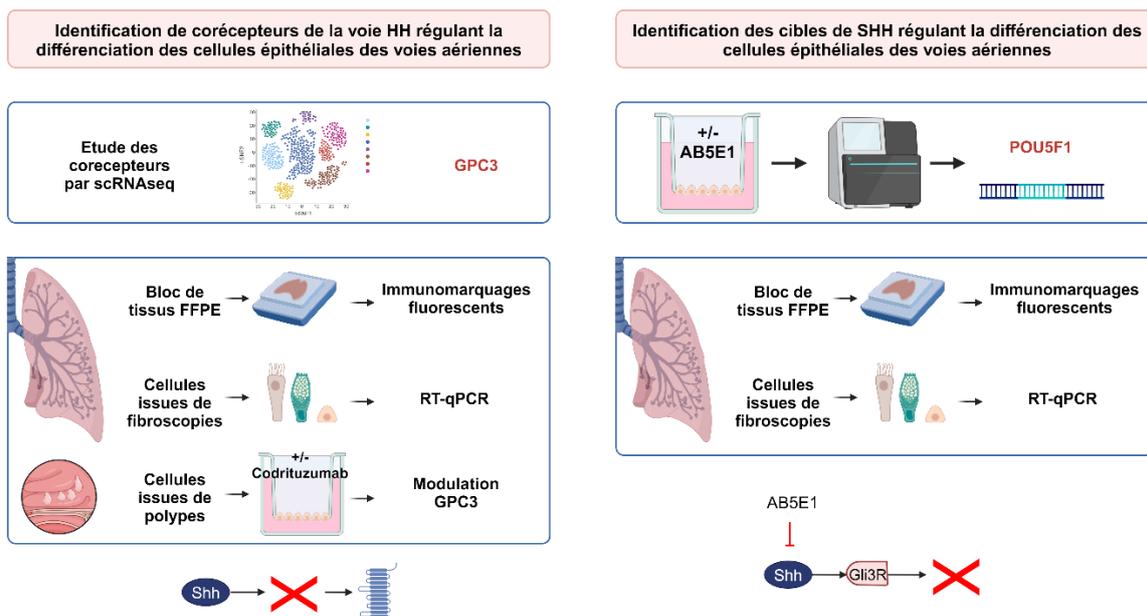


Figure 24 : Plan expérimental de l'étude des éléments secondaires de la voie HH

GPC3 : Glypican 3

MATÉRIELS & MÉTHODES

1. Recrutement des patients

Les prélèvements respiratoires utilisés proviennent de collaborations avec les équipes cliniques des services de pneumologie de différents centres hospitaliers et des membres du laboratoire afin d'établir différentes collections biologiques pour mener ces études.

1.1. Fibroscopies

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 des autorisations réglementaires du CPP et de l'ANSM. Le consentement des patients à leur participation était obtenu.

Les patients non-BPCO (n=11) ont été définis par une absence de trouble ventilatoire aux EFR et l'absence d'argument clinique pour une autre pathologie broncho-pulmonaire. Il s'agissait de patients bénéficiant d'un bilan respiratoire approfondi pour divers symptômes (hémoptysie, toux chronique, dyspnée, nodule(s) pulmonaire(s)) et qui ont été invités à participer à l'étude en l'absence de pathologie respiratoire chronique ou aiguë au cours de ce bilan. Les patients BPCO (n=11) ont été définis classiquement sur la base de données cliniques et spirométriques dont un rapport VEMS/CVF < 0.7 après bronchodilatation (**Tableau 2**).

La sévérité de la BPCO a été déterminée selon la classification spirométrique (GOLD 1 : VEMS ≥ 80%, GOLD 2 : VEMS ≤ 50%, GOLD 3 : VEMS ≤ 30%, GOLD 4 : VEMS < 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 comportaient : asthme, tuberculose ou autre pathologie respiratoire chronique, notamment bronchique (dilatation des bronches). Aucun patient n'était traité par immunosuppresseur. Les anciens fumeurs ont été considérés comme tel après une période d'au moins 6 mois sans cigarette.

A la date d'inclusion, chaque sujet bénéficiait d'une biologie sanguine, Gaz du sang (GDS), EFR (spirométrie, pléthysmographie et mesure du DLCO), éventuel test de réversibilité bronchique en cas de TVO, un entretien et examen clinique avec un investigateur, un Examen Cytobactériologique des Crachats (ECBC).

Tableau 2 : Paramètres cliniques des patients inclus pour les cultures en interface air-liquide et les cytopins

Paramètres	Patients non-BPCO	Patients BPCO
Nombre de patients	11	11
Sexe, F/M	4/7	2/9
Age, années	55,7±14,6	67,6±7,2
Tabagisme		
Non-fumeur	0	0
Ex-fumeur	5	6
Fumeur	6	5
Paquet-année	37±26,5	58,1±32,3
Fonction pulmonaire		
VEMS, % de la valeur théorique	88,5±10,6	58,5±21,3
VEMS/CVF	0,82±0,69	0,57±0,11

Un auto-questionnaire a été 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 ont été 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 hospitalisations sur les 12 derniers mois et leurs modalités de prise en charge. Chaque patient avait remis un consentement éclairé et écrit, après lecture d'une note d'information et d'explication par l'investigateur. Lorsqu'une fibroscopie bronchique était indiquée dans le cadre de la prise en charge clinique du patient, selon les recommandations internationales, une partie des prélèvements de brossage bronchique, de biopsies bronchiques et de LBA était utilisée pour la recherche. 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 non utilisés à des fins diagnostiques, étaient transmis à l'unité Inserm UMR-S 1250 pour la réalisation des protocoles expérimentaux.

1.2. Polypes nasaux

Les cellules utilisées pour la culture primaire sont également issues de polypes nasaux de patients (n=5) 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 otorhinolaryngologistes collaborateurs du CHU de Reims ou de la Clinique Mutualiste de la Sagesse de Rennes et transférés au laboratoire dans du RPMI 1640 contenant 1% Pénicilline/Streptomycine pour intégrer la collection du laboratoire (DC-2012–1583). 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 remise d'un consentement de la part des patients.

1.3. Résections pulmonaires

Les résections pulmonaires sont issues de patients non-BPCO (n=10) ou BPCO (n=19) caractérisés cliniquement par le service de pneumologie du CHU de Reims (IRB CHU-REIMS 20110612) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Paramètres cliniques des patients inclus pour les marquages sur les tissus FFPE

Paramètres	Patients non-BPCO	Patients BPCO
Nombre de patients	10	19
Sexe, F/M	3/7	6/13
Age, années	67,2±6,8	64,2±10,8
Tabagisme		
Non-fumeur	1	0
Ex-fumeur	6	11
Fumeur	3	8
Paquet-année	39,7±21,3	46,1±13,7
Fonction pulmonaire		
VEMS, % de la valeur théorique	105,2±12,3	76,5±13,1
VEMS/CVF	0,78±0,28	0,62±0,05

Des fragments de bronches sont prélevés afin d'être inclus en paraffine (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE). Les blocs de tissus FFPE sont issus de la collection du CRB (Centre de Ressources Biologiques) de Reims et sont conservés à 4°C. Les blocs FFPE sont coupés grâce au microtome Thermo Scientific™ HM 340E. Les coupes sont réalisées à une épaisseur de 3µm et déposées sur une goutte d'eau sur des lames adhésives Thermo Scientific™ SuperFrost Plus. Ces dernières sont conservées à 4°C avant utilisation.

2. Culture cellulaire primaire

2.1. Isolement des cellules épithéliales à partir des fibroscopies

Les cellules présentes sur les brosses bronchiques, réceptionnées après fibroscopie endobronchique, sont remises en suspension mécaniquement (frottement des brosses avec une pince stérile dans une boîte de pétri) dans du RPMI 1640 GlutaMAX contenant 1% Pénicilline/Streptomycine complété avec du sérum de veau fœtal (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 compteur de cellules automatique ADAM (NanoEnTek). 150 000 cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits contenant des inserts d'une porosité de 0,4µm (Corning, Fisher Scientific) recouverts de collagène IV (0,2 mg/mL) (Sigma-Aldrich).

Les cellules sont également utilisées pour la réalisation de cytopins afin d'effectuer des marquages immunofluorescents. 25 000 cellules sont centrifugées (800 rpm, 10 min) sur une lame Superfrost plus (Thermo Scientific) avec l'appareil Cytospin4 (Microm Microtech). Les cellules sont par la suite fixées au méthanol froid pendant 10 minutes et les lames sont conservées à -20°C.

2.2. Isolement des cellules épithéliales à partir des polypes nasaux

Après lavage et dissociation mécanique succincte, les polypes sont digérés enzymatiquement pendant une nuit à 4°C, dans du milieu RPMI 1640 GlutaMAX supplémenté de 0,05% (p/v) de protéase de type XIV de *Streptomyces griseus*. Les cellules sont ensuite centrifugées pour obtenir un culot cellulaire (1250 rpm, 5 min), remises en suspension dans du milieu CnT17 (CellnTec). Les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules automatique ADAM (NanoEnTek) selon les instructions du fournisseur.

Un million de cellules a été ensemencé dans une boîte de Petri de 10 cm jusqu'à la confluence cellulaire. Après un passage, 50 000 cellules ont été ensemencées dans des plaques 12 puits contenant des inserts d'une porosité de 0,4µm (Corning, Fisher Scientific) recouverts de collagène IV (0,2 mg/mL) (Sigma-Aldrich).

2.3. Différenciation de l'épithélium

Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules sont cultivées dans du milieu CnT17 jusqu'à confluence totale. 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. Les membranes sont récupérées à IAL7 et IAL35 pour les polypes et pour les fibroscopies. 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 transcriptomiques et une autre moitié est fixée au méthanol froid pour réaliser des marquages immunofluorescents. L'ensemble des inserts fixés est conservé à -20°C avant utilisation.

2.4. Modulation de la voie de signalisation médiée par Shh ou GPC3

L'inhibition de la signalisation de Shh est établie en ajoutant au milieu basal l'anticorps AB5E1 (AB_2188307, Interchim, 1 µg/mL) dilué dans de l'eau stérile [207]. L'anticorps est ajouté au milieu de culture à chaque changement de milieu, soit tous les deux jours, pendant une période de différenciation de 7 jours.

L'inhibition de la signalisation de GPC3 est établie en ajoutant au milieu basal l'anticorps Codrituzumab (HY-P99013, Interchim, dilué, 1µg/mL) dilué dans du PBS stérile [224]. L'anticorps est ajouté au milieu de culture à chaque changement de milieu, soit tous les deux jours, suivant une cinétique de différenciation.

3. Analyses transcriptomiques

3.1. Extraction d'acides nucléiques issus de fibroscopies pour séquençage

Les ARNs des cultures de cellules des voies aériennes en IAL traitées ou non avec AB5E1 sont extraits avec le kit *High Pure RNA isolation* (Roche Diagnostics). Les bibliothèques d'ARNs ont été préparées avec le kit *NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep* pour le protocole Illumina, conformément aux recommandations du fournisseur. En résumé, la purification des ARNm contenant des queues PolyA a été effectuée avec des oligo poly-T attachées à des billes magnétiques à partir d'ARNs totaux de 1 µg (avec le kit *Magnetic mRNA Isolation Kit* de NEB). Une fragmentation utilisant des cations divalents à température élevée a été réalisée pour obtenir des fragments double brins d'ADNc environ 300 pb. Enfin, la ligation des adaptateurs Illumina et l'amplification de la bibliothèque d'ADNc ont été réalisées par PCR pour le séquençage.

Le séquençage a été effectué sur les reads paired-end 100b d'Illumina NovaSeq. L'analyse a été effectuée à l'aide d'*Illumina Real Time Analysis* (3.4.4) avec des paramètres par défaut. Le contrôle de la qualité des données brutes de séquences a été effectué à l'aide de FastQC (version 0.11.5). Les bases de données ont été découpées pour les séquences d'adaptateurs, et les séquences de faible complexité ou de faible qualité ont été supprimées avec Trimmomatic (version 0.39). Les séquences restantes ont été mappées à l'assemblage de référence du génome d'*Homo sapiens* hg38 (hg38.fa) en utilisant tophat2 (version 2.1.1) avec des paramètres stricts générant le format bam. La qualité de l'alignement a été vérifiée à l'aide des métriques fournies par qualimap (version 2.2.1) et les alignements de faible qualité ont été supprimés. Les numérations brutes ont été obtenues à l'aide de htseq-count (version 0.6.1) et normalisées au moyen d'un facteur d'appel basé sur l'expression génique médiane dans les échantillons et filtrées pour exclure les gènes ayant moins de 5 numérations dans les échantillons.

Le jeu de données comprenant les 10 échantillons biologiques est déposé dans GEO avec le numéro d'accès GSE262404.

3.2. Extraction d'acides nucléiques issues de fibroscopies pour RT-qPCR

Les ARNs des cultures de fibroscopies sont extraits avec le kit *GenElute™ RNA/DNA/Protein Plus Purification* (#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 (6000 rpm, 1 min). Après un lavage (14 000 rpm, 1 min), 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 (14 000 rpm, 2x1 min), la colonne est asséchée (14 000 rpm, 2 min) puis éluée dans un volume final de 50µL d'eau stérile par centrifugation (2 000 rpm, 2 min puis 14 000 rpm, 1 min). 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 compris entre 2 et 2,2 et si le rapport 260/230 nm est proche de 2. Les éluats contenant les ARNs sont conservés à -80°C.

3.3. Transcription inverse

Une transcription inverse synthétisant des ADNc à partir d'ARNs est réalisée avec le kit Thermo Scientific (MAN0016392). La réaction comprend 4µL de Master Mix (*Maxima H Minus cDNA Synthesis Master Mix*), 250 ng d'ARNm et de l'eau stérile. Les tubes sont incubés pendant 10 minutes à 25°C, 15 minutes à 50°C et 5 minutes à 85°C. Les ADNc sont conservés à -20°C.

3.4. PCR

Une PCR quantitative est réalisée selon la méthode Taqman (Kit ThermoFisher, K0954). Pour chaque réaction, 10µL de Master Mix (*Luminaris Probe qPCR Master Mix*) sont ajoutés à 1µL de *Taqman Gene Expression Assay* contenant les amorces, la sonde spécifique et le tampon et 7µL d'eau stérile. Dans une plaque 96 puits (ThermoFisher, N8010560), 2µL d'ADNc (6,25 ng/µL) en duplicat, puis 18µL d'un Mix préalablement préparé sont déposés dans chaque puits. Les sondes utilisées sont référencées dans le **tableau 4**. La plaque est scellée, centrifugée pendant 1 minute à 1000 rpm puis insérée dans l'appareil QuantStudio3 de ThermoFisher.

Le programme de PCR comprend les étapes de prétraitement à l'*uracil-DNA-glycosylase* (50°C pendant 2 minutes), dénaturation initiale (95°C pendant 10 minutes), dénaturation (95°C pendant 15 secondes), et d'amplification (60°C pendant 1 minute). Les deux dernières étapes sont répétées 45 fois. Afin de comparer les résultats obtenus, un seuil de détermination de l'inflexion de la pente (calcul du CT, *cycle threshold*) a été déterminé pour chacune des cibles.

Tableau 4 : Sondes utilisées pour les qPCR

Gènes	Référence
GAPDH	Hs02758991_g1
GPC3	Hs01018936_m1
POU5F1	Hs00999632_g1

3.5. Analyses des données de qPCR

Les résultats sont normalisés à l'expression du gène de ménage GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Pour réaliser des analyses, les données suivantes ont été extraites :

- Moyenne des CT des dupliquats de réactions de PCR
- ΔCT : CTgène cible – CTgène de ménage

4. Immunomarquages et analyses

4.1. Immunomarquages des coupes en paraffine

Les tissus pulmonaires FFPE sont coupés au microtome en sections de 3µm. Les lames blanches sont incubées à 37°C pendant une nuit. Après déparaffinage par des bains de xylène pendant 10 et 5 minutes, elles sont réhydratées par des bains d'éthanol de concentrations décroissantes (100%, 70%, 50%, 0%) pendant 3 minutes chacun. Les sites antigéniques sont par la suite démasqués par autoclave avec le « *Vector antigen unmasking solution* » (Tampon citrate, VectorLab H3300, pH6, dilué 1/100) pendant 20 minutes à 120°C. Les lames sont lavées avec du PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, P3813-10PAK) puis les coupes sont entourées avec un marqueur hydrophobe permettant de contenir les liquides dans la zone délimitée. Une perméabilisation est réalisée en fonction de la localisation des antigènes. Elle s'effectue par ajout de PBST (PBS avec 0,1% Triton 100X) pendant 2 fois 5 minutes puis par lavage au PBS.

Les sites non spécifiques sont bloqués par ajout de PBS-BSA 10% (*Bovine Serum Albumine*, BSA 30% Sigma-Aldrich, A3299) pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 3% pendant une nuit à 4°C en chambre humide. Les anticorps utilisés sont référencés dans le **tableau 5**. L'anticorps primaire est récupéré et les lames sont lavées avec du PBS pendant 6 fois 3 minutes. Le deuxième anticorps primaire est ajouté pendant 1h à température ambiante en chambre humide afin de réaliser un co-marquage. Les lames sont lavées avec du PBS pendant 6 fois 3 minutes puis incubées avec les anticorps secondaires correspondants (dilués 1/500 dans PBS-BSA 3%) couplés à un fluorochrome (Alexa 594 ou Alexa 488) et le DAPI (dilué 1/1000 dans PBS-BSA 3%) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les lames sont lavées avec du PBS avant d'être montées à l'aide de milieu de montage polymérisant (*Aquapolymount*, Polyscience, 18606-20) recouvert d'une lamelle. Les lames sont conservées à 4°C, à l'abri de la lumière.

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés

Anticorps	Espèce	Référence	Fournisseurs	Concentrations
Arl13b	Lapin	17711-1-AP	ProteinTech	IF – 1:200
β -caténine	Souris	610153	BD Biosciences	WMIF – 1:500
CC10	Lapin	10490-1-AP	ProteinTech	WMIF – 1:100
Gli2 (amplifié)	Lapin	HPA074275	Sigma-Aldrich	WMIF – 1:100
GPC3	Souris	MAB2119	R&D systems	IF/WMIF – 1:200
Ki67	Souris	M7240	Agilent Dako	WMIF – 1:50
KP	Souris	NBP2-29463	Novus Biological	IF – 1:250
KP	Lapin	NB600-579	Novus Biological	IF – 1:250
Muc5ac	Souris	MAB2011	Millipore	WMIF – 1:100
Muc5b	Lapin	E-AB-15988	Elabscience	WMIF – 1:100
P63	Chèvre	AF1916	R&D systems	WMIF – 1:100
POU5F1	Chèvre	AF1759	R&D systems	IF – 1 :50
Tubuline acétylée	Souris	T6793	Sigma-Aldrich	WMIF – 1:1000

4.2. Immunomarquages des membranes d'inserts

Les cellules primaires cultivées en IAL sur des membranes perméables sont prélevées à différents temps (7 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 2h 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 6 fois 10 min au PBT. Les anticorps secondaires correspondants sont incubés pendant 2h à température ambiante et à l'abri de la lumière. La liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages (WMIF - *Whole mount immunofluorescence*) est détaillée dans le **tableau 5**. Les fragments sont également marqués au DAPI pendant 15 min. Les membranes sont lavées 6 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 *Aquapolymount* et mis sous poids durant une nuit. Elles sont conservées à 4°C.

4.3. Immunomarquages des cytopins

Les lames sont lavées avec du PBS puis les coupes sont entourées avec un marqueur hydrophobe permettant de contenir les liquides dans la zone délimitée. Les sites non spécifiques sont bloqués par ajout de PBS-BSA 10% pendant 45 minutes à température ambiante. Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 3% pendant une nuit à 4°C en chambre humide. La liste des anticorps utilisés est détaillée dans le **tableau 5**. L'anticorps primaire est récupéré et les lames sont lavées avec du PBS pendant 6 fois 3 minutes.

Le deuxième anticorps primaire est ajouté pendant 1h à température ambiante en chambre humide afin de réaliser un co-marquage. Les lames sont lavées avec du PBS pendant 6 fois 3 minutes puis incubées avec les anticorps secondaires correspondants (dilués 1/500 dans PBS-BSA 3%) couplés à un fluorochrome (Alexa 594 ou Alexa 488) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les noyaux sont marqués à l'aide du DAPI pendant une incubation de 15 min. Les lames sont lavées avec du PBS avant d'être montées à l'aide de milieu de montage polymérisant, *Aquapolymount*, recouvert d'une lamelle. Les lames sont conservées à 4°C, à l'abri de la lumière.

4.4. Analyses par microscopie

4.4.1. Analyse des coupes FFPE et cytopins

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 Achromatique (NA 0.75) et une caméra Coolsnap FX. Les images des immunomarquages en fluorescence acquises par microscope sont traitées en utilisant les logiciels ZEN (8.1, 2012) et ImageJ. Trois zones représentatives de chacune des lames sont acquises et les taux de GPC3 et POU5F1 sont quantifiés en utilisant les niveaux de gris moyen sur le canal d'acquisition de fluorescence d'intérêt après avoir retiré le bruit de fond.

4.4.2. Analyse des membranes d'inserts

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 x40 et une caméra Coolsnap FX. Cinq zones représentatives de chacune des lames sont acquises. Afin d'étudier l'effet du GPC3 sur la différenciation de l'épithélium respiratoire, la quantité de cellules basales (p63), multiciliées (Arl13b), mucosécrétrices (Muc5ac ou Muc5b), et intermédiaires (CC10) 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 avec le logiciel ImageJ. L'impact de la modulation de GPC3 est également évalué sur la voie HH par la quantification de Gli2.

5. Analyses de données publiques

5.1. Single cell

Le séquençage en cellule unique est disponible sur l'interface Cellxgene avec la base de donnée « Sikkema et al. » [5]. Seuls les échantillons pulmonaires (« lung » et « lung parenchyma ») de patients de plus de 18 ans, sans maladie respiratoire (n=181) sont considérés.

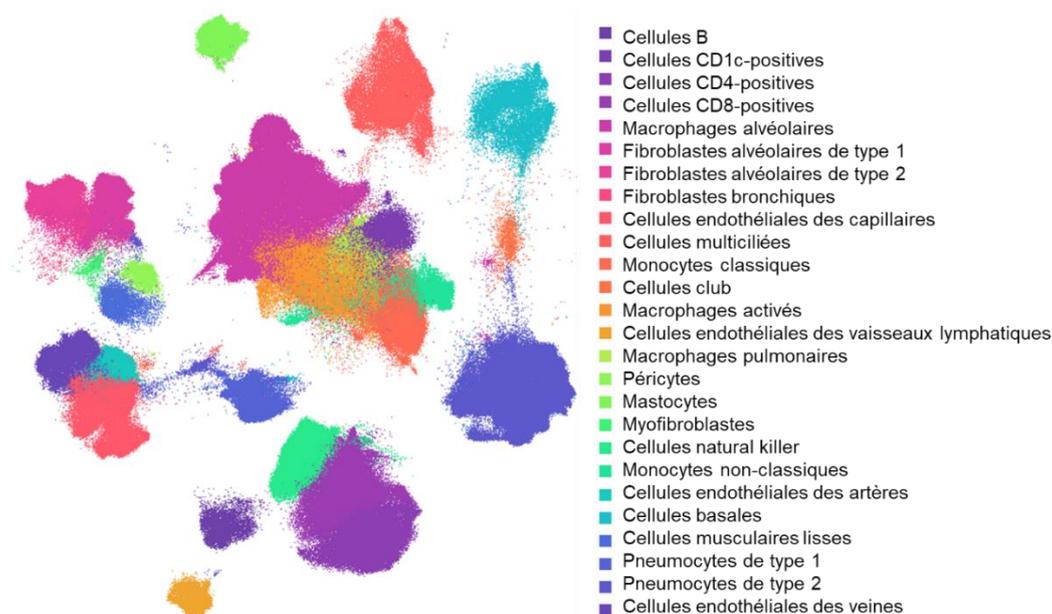


Figure 25 : Populations cellulaires pulmonaires établies par le HLCA

UMAP montrant les différentes populations cellulaires définies par le HLCA et générée par l'interface cellxgene.

Quatre catégories sont définies regroupant les populations cellulaires établies par le consortium HLCA (*Human Lung Cell Atlas*) :

- Les cellules épithéliales trachéobronchiques regroupant 40 822 cellules : les cellules multiciliées (n=25 114) ; les cellules club (n=1 816) et les cellules basales (n=13 892).
- Les pneumocytes regroupant 123 456 cellules : les pneumocytes de type I (n=19 418) et les pneumocytes de type II (n=104 038).
- Les cellules stromales regroupant 120 988 cellules : les fibroblastes alvéolaires de type I (n=21 389) et de type II (n=16 752) ; les fibroblastes bronchiques (n=921) ; les cellules endothéliales des capillaires (n=37 538), des vaisseaux lymphatiques (n=8 675), des artères pulmonaires (n=10 173) et des veines (n=14 113) ; les péricytes (n=5 157), les myofibroblastes (n=1 048) et les cellules musculaires lisses (n=5 222).

- Les cellules immunitaires regroupant 408 371 cellules : les cellules B (n=6 723), CD1c-positives (n=10 628), CD4-positives (n=35 984), CD8-positives (n=43 839) ; les macrophages alvéolaires (n=174 329) ; les macrophages activés (n=39 642) ; les macrophages pulmonaires (n=6 331) ; les monocytes classiques (n=33 862) ; les monocytes non-classiques (n= 14 566) ; les mastocytes (n=11 712) et les cellules natural killer (n=30 755).

5.2. STRING

Le réseau d'interaction protéine-protéine pour Shh (humain) a été généré par String (<https://string-db.org/>). Seules les interactions à haute fiabilité (0,7), déterminées expérimentalement ou issues de bases de données sont présentées. Les protéines ont été classées avec un code de couleur : rouge pour Shh, violet pour les corécepteurs du Shh et bleu pour GPC3. L'analyse des termes GO (*Gene ontology*) a été effectuée par String sur 371 gènes exprimés différemment ($\log_2FC = -0,5 < DEG < \log_2FC = 0,5$) avec trois catégories : processus biologiques (en vert), composants cellulaires (en rouge) et mots clés (en bleu). Tous les termes statistiquement significatifs ont été représentés sur l'histogramme.

5.3. Données publiques GSE

Les niveaux d'expression de GPC3 et POU5F1 ont été recueillis à partir de données de RNAseq accessibles en ligne sur l'interface GEO (GSE57148 et GSE137557). L'analyse a été effectuée sur tous les gènes et les différences entre les deux groupes ont été déterminées à l'aide du test t de Student et de la correction FDR de Benjamini-Hochberg.

6. Statistiques

Les comparaisons relatives aux données continues ont été analysées selon le test de Student relatif aux petits échantillons après vérification des hypothèses de normalité et d'égalité de variance, ou selon le test de Student à un échantillon à la valeur hypothétique de 1 représentant le groupe Contrôle. Les tests non paramétriques ont été traités selon le test de Mann-Whitney. Les corrélations sont établies avec le test de Pearson. 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 ou Rstudio.

RÉSULTATS

1. Analyse des corécepteurs de la voie HH

Glypican-3 is a key tuner of the Hedgehog pathway in COPD

Petit et al., soumis

Résumé

La voie Hedgehog (HH) est impliquée dans le développement pulmonaire et le maintien de l'homéostasie. Elle orchestre la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes et contribue au développement de pathologies respiratoires. En effet, les éléments principaux de la voie HH, Gli2, Smo et Shh, sont diminués dans l'épithélium bronchique de patients BPCO. Dans cette étude, nous avons étudié les corécepteurs de la voie HH (BOC, CDON, GAS1, GPC1, GPC3, GPC5, GPC6, HHIP et PTCH2) pour déchiffrer le mécanisme complexe de l'activation de la voie HH dans les voies aériennes et dans la BPCO. Les éléments principaux et les corécepteurs de la voie HH ont été étudiés dans les populations cellulaires pulmonaires par l'analyse de données issues de séquençage en cellule unique. Les niveaux de transcription du corécepteur GPC3 ont été étudiés à partir de données de RNAseq public et par RT-qPCR. La localisation du GPC3 a été évaluée par immunomarquages fluorescents sur des cellules épithéliales bronchiques isolées et des tissus pulmonaires de patients non-BPCO et BPCO. La modulation pharmacologique du GPC3 a été réalisée avec le Codrituzumab lors de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes. Nous avons démontré que les éléments principaux n'étaient pas abondants dans les populations cellulaires pulmonaires. En se concentrant sur les corécepteurs, GPC3 était le transcrit le plus exprimé dans les cellules épithéliales trachéobronchiques. La diminution des niveaux de transcription du GPC3 était corrélée à une réduction de la fonction pulmonaire chez les patients BPCO. Enfin, l'interférence avec la signalisation GPC3 lors de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes induit une altération de la voie HH attestée par une diminution du Gli2 conduisant à une ciliogénèse réduite et à une production altérée de mucines. Le GPC3 apparaît comme un corécepteur crucial pour la voie HH dans le contexte respiratoire. La modulation de GPC3 pourrait représenter une nouvelle stratégie expérimentale pour ajuster la signalisation de la voie HH dans les perspectives thérapeutiques.

Mots clés : BPCO, cellules épithéliales des voies aériennes, voie Hedgehog, GPC3

Manuscrit preprint (version auteur)

1 **Glypican-3 is a key tuner of the Hedgehog pathway in COPD**

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

Laure M. G. Petit¹, Lynda Saber Cherif¹, Maëva A. Devilliers¹, Sarah Hatoum¹, Julien Ancel²,
Gonzague Delepine¹, Anne Durlach¹, Xavier Dubernard³, Jean-Claude Mérol¹, Christophe
Ruau⁴, Myriam Polette², Gaëtan Deslée², Jeanne-Marie Perotin², Valérian Dormoy¹

¹Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, P3Cell UMR-S1250, Reims, France

²Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, CHU de Reims, P3Cell UMR-S1250,
Reims, France

³Université de Reims Champagne-Ardenne, CHU de Reims, Reims, France

⁴Clinique Mutualiste La Sagesse, Département d’Otorhinolaryngologie, Rennes, France

Correspondence to:

Dr Valérian Dormoy

Inserm UMR-S 1250

University of Reims Champagne-Ardenne

CHU Maison Blanche

45 rue Cognacq-Jay

51092 Reims

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

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

Brief title: GPC3 modulation of HH pathway in COPD

Word count: 4906

29 **Abstract**

30 *Background:* Hedgehog (HH) pathway is involved in pulmonary development and lung
31 homeostasis. It orchestrates airway epithelial cell (AEC) differentiation and contributes to
32 respiratory pathogenesis. The core elements Gli2, Smo, and Shh were found altered in the
33 bronchial epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Here, we
34 investigated the co-receptors to fully decipher the complex machinery of airway HH pathway
35 activation in health and COPD.

36 *Methods:* The core elements and co-receptors of HH signalling were investigated in lung cell
37 populations using single-cell RNAseq analysis. The transcript levels of the principal co-
38 receptor GPC3 were investigated on public RNAseq datasets and by RT-qPCR. The localisation
39 of GPC3 was evaluated through immunofluorescent stainings on isolated bronchial AEC and
40 tissues from non-COPD and COPD patients. GPC3 pharmacological modulation was achieved
41 with Codrituzumab during AEC differentiation.

42 *Findings:* We demonstrated that the core elements were not abundant in pulmonary cell
43 populations. Focusing on co-receptors, GPC3 was the most expressed transcript in
44 tracheobronchial epithelial cells. The decrease in GPC3 transcript levels correlated with the
45 severity of airway obstruction in COPD patients. Finally, interfering with GPC3 signalling
46 during AEC differentiation induced downregulation of the HH pathway attested by a decrease
47 of Gli2 leading to reduced ciliogenesis and altered mucin production.

48 *Interpretation:* GPC3 appears as a crucial co-receptor for the HH pathway in the respiratory
49 context. The modulation of GPC3 may represent a novel experimental strategy to tune HH
50 signalling in therapeutic perspectives.

51 *Funding:* The University of Reims Champagne-Ardenne (URCA) and the French National
52 Institute of Health and Medical Research (Inserm) funded this research.

53

54 **Keywords:** COPD, Airway epithelial cells, Hedgehog, GPC3

55 Research in context*56 Evidence before this study*

57 Hedgehog signalling is essential during the development and maintenance of homeostasis. We
58 recently demonstrated that the main core elements including the ligand Shh and the
59 transcription factor Gli2 orchestrated human lung branching morphogenesis and airway
60 epithelial cell differentiation. In addition, the alteration of the HH pathway was observed in
61 COPD patients. However, the complex molecular interaction network responsible for the
62 activation of the signalling cascade remains elusive.

63 Added value of this study

64 This is the first study to analyse the secondary components of the HH pathway in the context
65 of respiratory pathology. We described the abundance of HH co-receptor transcript levels at a
66 single-cell resolution in the airways and highlighted GPC3. We characterized GPC3 expression
67 and localisation in the non-COPD and COPD bronchi. We provided the first experimental clues
68 linking GPC3 modulation, HH pathway activation, and airway epithelial cell remodelling in the
69 context of COPD pathogenesis.

70 Implications of all the available evidence

71 The complete molecular and cellular characterisation of all the HH pathway effectors including
72 the co-receptors unveils key elements to understand respiratory system homeostasis and
73 pathophysiology. Our findings suggest GPC3 analysis and targeting in the context of COPD to
74 limit or prevent epithelial remodelling. Future investigations are required to fully decipher the
75 role of GPC3 and other co-receptors in the HH pathway activation and their involvement during
76 respiratory dysfunctions.

77

78

79 1. Introduction

80 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is becoming the third leading cause of death in
81 the world. Despite recent advances in patient phenotyping and understanding of the molecular
82 and cellular components, clinical management is focused on symptoms and there are no
83 available curative treatments. The epithelial remodelling of the airways is the main hallmark of
84 the physiopathology, particularly characterised by basal cell hyperplasia, ciliary defects, and an
85 imbalance of mucin secretion [1-5]. The origins of these alterations are not fully understood.
86 To identify novel biomarkers and innovative therapies, it is necessary to decipher the
87 mechanisms involved in the development of epithelial remodelling.

88 Hedgehog (HH) pathway is crucial for lung development, tissue repair, and regeneration [6-9].
89 The canonical HH pathway is initiated by the interaction of the ligand (Shh, Dhh, Ihh) with its
90 receptor Ptch1 (Patched-1) resulting in Smoothed (Smo) activation. Finally, the transcription
91 factors (Gli) are translocated into the nucleus, which triggers the transcription of target genes
92 [10]. HH signalling defined by these core elements was found dysregulated in respiratory
93 diseases [8,11,12]. Gli2, Smo, and Shh were reduced in airway epithelial cells from COPD
94 patients. In addition, interfering with Shh signalling caused epithelial remodelling, such as
95 ciliogenesis defects, impaired mucin abundance, and high proliferation of basal cells [13,14].
96 To date, mainly the core elements have been studied in the context of COPD. The molecular
97 mechanisms regulating ligand release and signal reception have not been fully deciphered
98 mainly because they involve a large panel of secondary elements (including BOC, CDON,
99 DISP1, DISP2, GAS1, GAS8, GPC1, GPC3, GPC5, GPC6, GPR161, HHAT, HHIP, KIF7,
100 PTCH2, SCUBE2, and SUFU) [10]. Interestingly, several single nucleotide polymorphisms
101 (SNPs) of Hedgehog Interacting Protein (HHIP) were associated with COPD susceptibility and
102 emphysema suggesting the importance of the secondary elements to relay a correct HH
103 signalisation [15,16].

104 Here, we aimed to characterise the potential involvement of the HH pathway co-receptors in
105 the development of COPD features in tissues and isolated airway epithelial cells. We focused
106 on Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (CDON), Brother of CDON
107 (BOC), Growth arrest-specific protein 1 (GAS1), Glypicans (GPC1, GPC3, GPC6), HHIP, and
108 PTCH2.

109

110 2. Materials and methods

111 Human subjects

112 Patients scheduled for lung resection for cancer (University Hospital of Reims, France) (n=23,
113 **Table 1**) or for fiberoptic bronchoscopy with bronchial brushings (n=22, **Table 1**) were
114 prospectively recruited following standards established and approved by the institutional
115 review board of the University Hospital of Reims, France (IRB Reims-CHU 20110612), and
116 included in the cohort for research and innovation in chronic inflammatory respiratory disease
117 (RINNOPARI, NCT02924818). The study included patients with or without COPD who gave
118 their consent. Patients with other respiratory diseases (asthma, cystic fibrosis, bronchiectasis or
119 pulmonary fibrosis) were excluded. At inclusion, age, sex, smoking history, and pulmonary
120 function test results were recorded. COPD was defined by post-bronchodilator FEV₁ (forced
121 expiratory volume in 1s) / FVC (forced vital capacity) < 0.7. Former smokers were considered
122 for a smoking cessation longer than 6 months.

123 Human primary airway epithelial cell cultures

124 Isolated airway epithelial cells (AEC) were obtained from bronchial brushings of non-COPD
125 (n=7) and COPD patients (n=7) to establish air-liquid interface (ALI) cultures as previously
126 described [17]. The cells were recovered by scraping the brushes and dissociation using trypsin-
127 versene (MS019B200D, Biowest). They were counted with ADAM (NanoEnTek) according to
128 NanoEnTek instructions. 150,000 cells were seeded on 12-well plates containing 0.4 µm
129 Transwells (Corning, Fisher Scientific) coated with 0.2 mg/mL collagen type IV from the
130 human placenta (Sigma-Aldrich).

131 Human primary AEC were also obtained from nasal polyps resected from non-COPD patients
132 (n=5) at the University Hospital of Reims and the Clinic *La Sagesse* of Rennes to establish air-
133 liquid interface (ALI) cultures as previously described [18]. Cells were dissociated by overnight
134 pronase incubation (0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich) and counted with ADAM (NanoEnTek)
135 according to NanoEnTek instructions. One million cells were seeded on a 10cm petri dish until
136 cell confluency. After a passage, 50,000 cells were seeded on 12-well plates containing 0.4 µm
137 Transwells (Corning, Fisher Scientific) coated with 0.2 mg/mL collagen type IV from the
138 human placenta (Sigma-Aldrich). Inhibition of GPC3 was achieved with Codrituzumab (HY-
139 P99013, Interchim, diluted in sterile PBS, 1µg/mL as described *in vitro* test) addition to the
140 culture medium as indicated in the following figures [19].

141 CnT-17 media (CellnTec) was used for initial proliferation in apical and basal chambers. Upon
 142 reaching cell confluency, the apical medium was removed and PneumaCult-ALI (PnC-ALI,
 143 StemCell) medium was used in the basal chamber. The culture medium was changed every 2
 144 days and cells were kept for 35 days in incubators at 37 °C, 5% CO₂.

145 Cytospin

146 Fresh AEC were obtained from bronchial brushings of COPD (n=7) and non-COPD patients
 147 (n=7). Cells were recovered by scraping the brushes and dissociation using trypsin-versene
 148 (MS019B200D, Biowest). They were counted with ADAM (NanoEnTek) according to
 149 NanoEnTek instructions. 25,000 cells were centrifuged (800rpm, 10min) with Cytospin4
 150 (Microm Microtech) on a Superfrost® plus slide (Thermo Scientific) and fixed with ice-cold
 151 methanol for 10 minutes. Slides were stored at -20°C until immunofluorescence analysis.

152 RT-qPCR analyses

153 Total RNA from AEC (ALI cultures from bronchial brushings) was isolated by GenElute RNA
 154 Plus purification Kit (RDP300, Sigma-Aldrich) and 250 ng were reverse-transcribed into cDNA
 155 by Maxima H Minus cDNA Synthetis Master Kit (MAN0016392, Thermo Scientific).
 156 Quantitative PCR reactions were performed with Luminaris Probe qPCR Master Kit (K0954,
 157 ThermoFisher) and Taqman Gene Expression Assay in a QuantStudio3 instrument (QS3,
 158 Thermo Scientific) as recommended by the manufacturer. The primers for GPC3 were
 159 purchased from ThermoFischer Scientific (Hs01018936_m1). The results for GPC3 transcript
 160 expressions were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH
 161 (Hs02758991_g1) and expressed as Δ CT.

162 Immunofluorescent staining and analyses

163 Immunofluorescent stainings were performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)
 164 lung tissues distant from the tumour. Three μ m sections were processed for these
 165 immunostainings. FFPE lung tissue section slides were deparaffinised and blocked with 10%
 166 BSA in PBS for 30 min at room temperature. The tissue sections were then incubated with the
 167 primary antibody (listed in **Supplemental materials: Table S1**) for one night at 4 °C in 3%
 168 BSA in PBS. After washing with PBS, a second primary antibody was used for 1h at room
 169 temperature. The sections were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary
 170 antibodies in 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature. The DNA was stained with

171 DAPI during incubation with the secondary antibodies. Micrographs were acquired by
172 AxioImageur Zeiss (20x Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ
173 (National Institutes of Health) for analysis. For each patient, three random fields per section
174 containing bronchi were taken to evaluate the localization of GPC3 on epithelial cells. For each
175 field, a threshold was established by subtracting the background, and setting the minimum at 0.
176 GPC3 expression was determined by the pixel mean grey values (PMGV) in the region of
177 interest defined by the epithelium in the two groups.

178 *Whole-mount immunofluorescent immunostaining*

179 Methanol-fixed AEC from ALI cultures were rehydrated by decreasing methanol concentration
180 (75%, 50% and 25%) before a post-fixation with acetone. The cells were blocked with 10%
181 BSA in PBT (PBS + 1% DMSO + 0.1% Triton) for 2 h at room temperature. The cells were
182 then incubated with the primary antibody (listed in **Supplemental materials: Table S1**) for
183 one night at 4 °C in 3% BSA-PBT. After washing with PBT, the cells were incubated with the
184 appropriate secondary antibodies in PBT for 2 h at room temperature. DNA was stained with
185 DAPI during incubation for 15min. Clarification of cells was achieved by a glycerol gradient
186 (25%, 50%, 75%) before mounting the slides. Micrographs were acquired by AxioImageur
187 Zeiss (40x Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ (National Institutes
188 of Health) for analysis. The pixel mean grey values (PMGV) for each detected antibody were
189 quantified and compared between two groups for each staining.

190 *Cytospin immunofluorescent immunostaining*

191 The cells were washed with PBS, blocked with 3% BSA in PBS for 45 minutes, and then
192 incubated with the primary antibody (listed in **Supplemental materials: Table S1**) for one
193 night at 4 °C in 3% BSA in PBS. After washing with PBS, a second primary antibody was used
194 for 1h at room temperature. The cells were washed with PBS and incubated with the appropriate
195 secondary antibodies in 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature. DNA was stained
196 with DAPI during incubation for 15min. The micrographs were acquired by AxioImageur Zeiss
197 (20x Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ (National Institutes of
198 Health) for analysis. Three random fields per slide were taken. For each field, a threshold was
199 established by subtracting the background and setting the minimum at 0. GPC3 expression was
200 determined by the pixel mean grey values (PMGV) of the detected antibody for 24 randomly
201 selected cells in the two groups.

202 Network of protein-protein interaction by String

203 The protein-protein interaction network for SHH (human) was generated by String
 204 (<https://string-db.org/>). Only the interactions with high confidence (0.7), experimentally
 205 determined or from curated databases are shown. No more than 10 interactors in the 1st shell
 206 and the 2nd shell are represented. The proteins were classified with a colour code: red for Shh,
 207 purple for Shh co-receptors and blue for GPC3.

208 RNAseq analyses

209 Gene expressions of Hedgehog pathway elements were collected from datasets publically
 210 available online (GEO database: GSE57148 and GSE137557). COPD and non-COPD patients
 211 were included with the clinical features listed in **Supplemental Materials: Table S2**. The
 212 analysis was performed on all genes and the differences between the two groups were
 213 determined using the Student's t-test and Benjamini-Hochberg FDR correction.

214 Single-cell sequencing dataset

215 The published single-cell sequencing (scRNAseq) can be found on the Cellxgene interface with
 216 "Sikkema et al." dataset [20]. Only lung samples (lung and lung parenchyma) from subjects
 217 over 18 years without respiratory disease (n=181) were considered. Four categories were
 218 defined regrouping cell populations as established by the HLCA (Human Lung Cell Atlas)
 219 consortium. The categories were identified as: (1) tracheobronchial epithelial cells (40,822
 220 cells): ciliated columnar cell of tracheobronchial tree (25,114 cells), club cell (1,816 cells) and
 221 respiratory basal cell (13,892 cells); (2) pneumocytes (123,456 cells): type I pneumocyte
 222 (19,418 cells) and type II pneumocyte (104,038 cells) ; (3) stromal cells (120,988 cells):
 223 alveolar type 1 fibroblast cell (21,389 cells), alveolar type 2 fibroblast cell (16,752 cells),
 224 bronchus fibroblast of lung (921 cells), capillary endothelial cell (37,538 cells), endothelial cell
 225 of lymphatic vessel (8,675 cells), lung pericyte (5,157 cells), myofibroblast cell (1,048 cells),
 226 pulmonary artery endothelial cell (10,173 cells), tracheobronchial smooth muscle cell (5,222
 227 cells) and vein endothelial cell (14,113 cells); (4) immune cells (408,371 cells): B cell (6,723
 228 cells), CD1c-positive myeloid dendritic cell (10,628 cells), CD4-positive alpha-beta T cell
 229 (35,984 cells), CD8-positive alpha-beta T cell (43,839 cells), alveolar macrophage (174,329
 230 cells), classical monocyte (33,862 cells), elicited macrophage (39,642 cells), lung macrophage
 231 (6,331 cells), mast cell (11,712 cells), natural killer cell (30,755 cells) and non-classical
 232 monocyte (14,566). The median expression levels and the proportion of expressing cells for

233 Hedgehog pathway markers are shown in a bubble plot generated by Rstudio with the ggplot2
234 package. The UMAP was generated with the CellxGene interface.

235 Statistics

236 Data are expressed as mean values \pm Standard deviation (SD) and percentages. Normality was
237 assessed for each group using the Shapiro-Wilk test. Differences between the two groups were
238 determined using the Student's t-test (two-tailed) for parametric data, Mann-Whitney for non-
239 parametric data or the one-sample t-test compared with the hypothetical value of 1. The
240 correlations were established with the Pearson test. A p-value < 0.05 was considered significant;
241 *, p < 0.05 ; **, p < 0.01 .

242

243 **3. Results**244 ScRNAseq highlights GPC3 as an essential co-receptor for the Hedgehog pathway in the
245 airways

246 Considering the essential role of HH signalling in the respiratory system, we initially assessed
247 the transcriptomic profile of HH core elements (DHH, IHH, SHH, GLI1, GLI2, GLI3, PTCH1,
248 and SMO) and secondary co-receptors (BOC, CDON, GAS1, GPC1, GPC3, GPC5, GPC6,
249 HHIP, PTCH2) at a cellular level. The selection of a large panel of immune cell populations
250 indicated a low proportion of cells expressing HH pathway elements ($0.6\pm 0.8\%$ [0.01-3.56])
251 (**Figure 1A**). In the diverse category of stromal cells, HH pathway elements were present in
252 $4\pm 4.5\%$ [0.03-17.69] of cells. Focusing on epithelial cells, the HH pathway elements were
253 detected in $6.4\pm 11.5\%$ [0.03-47.03] of pneumocytes and $4.5\pm 5.4\%$ [0.05-20.21] of
254 tracheobronchial epithelial cells. GPC5 and HHIP transcripts were the most abundant in
255 pneumocytes (17.94% and 47.03% respectively). GPC5 was also the gene with the highest
256 median of expression in this population (1.90). GPC3 was the most expressed gene in stromal
257 cells (17.69%) and tracheobronchial epithelial cells (20.21%). Since the HH pathway is
258 essential for airway epithelial cell differentiation, and GPC3 is the co-receptor showing the
259 highest abundance in tracheobronchial epithelial cells, we next analysed its expression in the
260 subsets of airway cell populations (**Figure 1B**). Interestingly, GPC3 was mainly found in three
261 populations: it was highly expressed in fibroblasts (51%), multiciliated cells (26.83%), and
262 basal cells (10.79%). This bioinformatics analysis prompted us to evaluate GPC3 as a key
263 regulator of HH pathway signalling in COPD.

264 GPC3 transcript levels are associated with pulmonary function in COPD patients

265 To determine the impact of GPC3 in COPD pathology, we analysed GPC3 transcript
266 expressions in non-COPD and COPD patients. First, we investigated publically available
267 RNAseq data of mild, and moderate COPD patients (GSE57148) and very severe COPD
268 patients (GSE137557). There was a decrease of 14.5% in the expression of GPC3 in the whole
269 lung of COPD patients (67.99 ± 34.21 FPKM vs 79.54 ± 35.05 FPKM, COPD vs non-COPD,
270 $p<0.05$) (**Figure 2A**). Considering cultured airway epithelial cells obtained from bronchial
271 brushings of very severe COPD patients, GPC3 transcript expressions did not differ in
272 proliferative basal cells (2.47 ± 0.75 FPKM vs 2.46 ± 0.36 FPKM, COPD vs non-COPD, $p>0.05$)
273 before the experimental switch in the air-liquid interface (**Figure 2B**). However, there was a

274 61.6% decrease of GPC3 transcripts at the end of cell differentiation (0.49 ± 0.22 FPKM vs
275 1.26 ± 0.27 FPKM, COPD vs non-COPD, $p < 0.01$).

276 Since GPC3 is not solely expressed by airway epithelial cells (**Figures 1A and 2A**), and very
277 severe COPD patients are highly heterogeneous (**Figure 2B**), we secondly analysed GPC3
278 transcripts in cultured airway epithelial cells collected during bronchial brushing in mild to
279 severe COPD patients (**Figure 3**). During the early steps of epithelial cell differentiation
280 (ALI7), there was no difference in GPC3 transcript expressions between non-COPD and COPD
281 samples ($9.29 \pm 1.32 \Delta Ct$ vs $9.10 \pm 1.08 \Delta Ct$, COPD vs non-COPD, $p > 0.05$) (**Figure 3A**). There
282 was no correlation between GPC3 transcript levels and FEV₁ in COPD patients ($r^2 = 0.4349$,
283 $p > 0.05$) (**Figure 3B**). Interestingly, low GPC3 transcript expressions in COPD patients were
284 correlated with low pulmonary functional parameters defined by FEV₁/FVC ($r^2 = 0.8419$,
285 $p < 0.01$) (**Figure 3C**). In fully differentiated epithelia (ALI35), GPC3 transcript expressions did
286 not differ between COPD and non-COPD patients ($8.26 \pm 1.48 \Delta Ct$ vs $8.33 \pm 1 \Delta Ct$, COPD vs non-
287 COPD, $p > 0.05$) (**Figure 3D**). Importantly, there was an association between GPC3 transcript
288 levels and lung function in COPD: the patients with low FEV₁ and FEV₁/FVC harboured low
289 GPC3 transcript levels ($r^2 = 0.7013$, $p < 0.05$ and $r^2 = 0.9486$, $p < 0.001$, respectively) (**Figure 3E,**
290 **F**). Altogether, these findings suggest a decrease in GPC3 transcript levels in association with
291 the severity of lung function impairment in COPD patients.

292 The localisation of GPC3 is altered in COPD patients

293 We first investigated GPC3 protein levels and localisations in airway multiciliated cells from
294 bronchial brushings of non-COPD and COPD patients. GPC3 was mainly localised in the sub-
295 ciliary compartment (**Figure 4A**). We did not observe a significant modification of GPC3
296 localisation between COPD and non-COPD patients (901.8 ± 253.2 PMGV vs 1110 ± 400.4
297 PMGV, COPD vs non-COPD, $p > 0.05$) (**Figure 4B**). There was no association between FEV₁
298 or FEV₁/FVC of COPD patients and GPC3 abundance in multiciliated cells ($r^2 = 0.1864$, $p > 0.05$
299 and $r^2 = 0.1608$, $p > 0.05$, respectively) (**Figure 4C, D**).

300 We then analysed GPC3 protein levels and localisations in the bronchial epithelia of FFPE lung
301 tissues. We confirmed the presence of GPC3 preferentially in differentiated cells, localised in
302 cilia and cytoplasm (**Figure 5A**). There was a 30.3% decrease in GPC3 localisation in COPD
303 patients (2664 ± 872.4 PMGV vs 3820 ± 983.5 PMGV, COPD vs non-COPD, $p < 0.05$) (**Figure**
304 **5B**). Nonetheless, there was no correlation between FEV₁ or FEV₁/FVC in COPD patients and

305 GPC3 epithelial abundance (**Figure 5C, D**). Taken together, GPC3 protein levels are decreased
306 in the epithelial cells of COPD patients.

307 *Interfering with GPC3 signalling induced epithelial remodelling*

308 Considering the HH pathway is involved in airway epithelial remodelling and the co-receptor
309 GPC3 is altered in COPD patients, we evaluated the impact of GPC3 modulation *in vitro*. We
310 selected a monoclonal antibody directed against GPC3 (Codrituzumab, also known as GC33)
311 to interfere with GPC3 transduction signals [19,21]. We verified the effects of the
312 pharmacological modulation on the GPC3 protein: Codrituzumab did not influence the GPC3
313 protein levels between the two conditions at the end of the differentiation (Fold Change
314 1.13 ± 0.24 , Codrituzumab vs control, $p > 0.05$) (**Figure S1**).

315 Firstly, we built a protein-protein interaction network for SHH and GPC3 (**Figure 6A**) showing
316 the links between the HH ligands, the receptors, the co-receptors, and the potential other
317 interactors. Because we identified an association with the Wnt pathway, we examined β -catenin
318 staining as a readout. There was no difference in β -catenin localisation between cells treated
319 with Codrituzumab and untreated (**Figure S2**). The proportion of basal cells (p63 positive cells)
320 or their proliferative status (Ki67 positive cells) during differentiation (ALI7) was also not
321 affected by GPC3 modulation (Fold Change 1.16 ± 0.38 and 1.12 ± 0.45 , Codrituzumab vs
322 control, $p > 0.05$, respectively) (**Figure S3, S4**).

323 We next assessed the molecular effects of GPC3 inhibition on the HH pathway signalling. Gli2
324 protein levels were reduced in Codrituzumab-treated cells at an early stage of differentiation
325 (Fold Change 0.59 ± 0.25 , Codrituzumab vs control, $p < 0.05$) but not at a late stage (Fold Change
326 0.89 ± 0.25 , Codrituzumab vs control, $p > 0.05$) (**Figure 6B, C**).

327 Finally, we investigated the epithelial remodelling induced by GPC3 modulation. Interestingly,
328 Codrituzumab treatment induced a reduction of multiciliated cells at ALI7 (Fold Change
329 0.69 ± 0.24 , Codrituzumab vs control, $p < 0.05$) that did not persist at ALI35 (Fold Change
330 0.98 ± 0.39 , Codrituzumab vs control, $p > 0.05$) (**Figure 6D, E**). Focusing on the secreting cell
331 populations, we did not observe a modification of CC10 protein levels (Fold Change 1.20 ± 0.46 ,
332 Codrituzumab vs control, $p > 0.05$) (**Figure 6F, G**). However, Muc5b protein levels were
333 significantly reduced in Codrituzumab-treated cells (Fold Change 0.48 ± 0.25 , Codrituzumab vs
334 control, $p < 0.01$), while Muc5ac protein levels did not differ (Fold Change 0.99 ± 0.40 ,
335 Codrituzumab vs control, $p > 0.05$) (**Figure 6H, I**). In addition, the ratios Muc5ac/Muc5b were

336 increased when GPC3 signalling was altered (2.24 ± 0.86 vs 1.11 ± 0.65 , Codrituzumab vs
337 control, $p < 0.05$) (**Figure 6J**). In summary, interfering with GPC3 signalling during AEC
338 differentiation impaired HH pathway activation and induced epithelial remodelling.
339

340 4. Discussion

341 We identified GPC3 as a crucial regulator of HH signalling in the respiratory context with
342 transcriptional and localisation alterations in COPD patients. We also highlighted the
343 involvement of GPC3 in epithelial remodelling and HH signalling in the lung.

344 The exploration of the scRNAseq from the HLCA has been recently very successful in
345 identifying transcripts of interest and establishing a molecular print of cells in the respiratory
346 system [20]. This dataset includes the major scRNAseq analyses of respiratory samples already
347 published to represent the large diversity of lung cell populations. Interestingly, the transcript
348 levels of the core elements of the HH pathway were not abundant, whereas the co-receptors
349 reached up to 47.03% of expressing cells in pneumocytes. This is consistent with the recent and
350 only partial elucidation of the plethora of HH pathway molecular effectors: if the core elements
351 are necessary for the activation, the secondary elements including, in particular, the co-
352 receptors are essential for the fine-tuning of the signal transduction [10,22-24]. GPC3 appeared
353 as a novel candidate in the complex machinery involving the HH pathway to control respiratory
354 homeostasis. Therefore, we dissected its molecular signature in the context of COPD where we
355 previously demonstrated the involvement of the HH pathway in the associated epithelial
356 remodelling [13].

357 There was a decrease of GPC3 transcripts in the whole lung of mild and moderate COPD
358 patients, as well as in fully differentiated AEC from severe COPD patients in ALI culture.
359 Interestingly, GPC3 transcript levels correlated exclusively with the respiratory function in
360 COPD patients suggesting that COPD patient heterogeneity also emerged through the lens of
361 HH pathway co-receptors. Consequently, GPC3 protein levels were found significantly reduced
362 in the epithelium of the bronchi of COPD patients. Even if the localization appeared mainly on
363 multiciliated cells in the tissues, there was no statistically significant reduction of GPC3 on
364 isolated multiciliated cells from COPD patients. A complex subcellular microscopic analysis
365 may help decipher the molecular signal transduction and its alteration in COPD since
366 intracellular regional localisation and concentration gradients are often described for HH
367 components [6,8,25].

368 Our experimental design showed for the first time that the blockage of GPC3 signalling using
369 Codrituzumab altered the HH pathway activation in the respiratory context without impacting
370 the Wnt pathway during the initiation of AEC differentiation. In addition, we demonstrated that
371 preventing GPC3 signalling induced an alteration of ciliogenesis and mucin production

372 mimicking the epithelial remodelling described in COPD bronchi [4,5]. For instance, Muc5b is
 373 a major element of the epithelial defence in the lung as illustrated by the Muc5b^{-/-} mice lacking
 374 a proper mucociliary clearance and therefore more sensitive to infections [26]. These findings
 375 complete our previous investigations focusing on the HH core elements where the alteration of
 376 the HH pathway was highlighted in COPD patients [13,14]. The decrease in Gli2 and Shh that
 377 we originally described may be partly due to a dysfunction of GPC3 signalling in these patients
 378 preventing the binding of the ligand to the co-receptor for optimal activation and therefore
 379 downregulating the HH pathway.

380 GPC3 is a heparan sulfate proteoglycan bound to the cell membrane by glycosyl-phosphatidyl-
 381 inositol (GPI) anchor that can undergo cleavage by Furin-like protein forming a pocket for
 382 binding various substrates [27]. Consequently, GPC3 is an ideal co-receptor that occupies a
 383 restricted space at the cell membrane, binds specifically to Shh, and can release the ligand for
 384 the extracellular compartment or to a nearby receptor. GPC3 regulates cell proliferation,
 385 apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition in various cancers, such as hepatocellular
 386 carcinoma, breast cancer or lung cancer [28-30]. The involvement of GPC3 in HH signalling
 387 seems to be context-dependent and has not been explored in the respiratory system so far.
 388 Investigations on developmental models such as the GPC3^{-/-} mouse reported that Shh can bind
 389 to GPC3 inducing ligand endocytosis and inhibition of the HH pathway by competition with
 390 Ptch1 [31,32]. Our results are in accordance with a recent study that demonstrated the necessity
 391 of Shh bound on heparin sulfate chains of GPC3 for HH pathway activation as illustrated by a
 392 decrease of Gli1 and Gli2 in primary cilia of mouse embryonic GPC3^{-/-} fibroblasts [33].

393 Despite the novelty and the multi-level cellular and molecular characterization of GPC3 that
 394 we report, our study presents some limitations. We focused on the bronchial epithelium of
 395 COPD patients. Nonetheless, COPD is also a small airway disease characterized by an
 396 important inflammation [3,34]. Expanding the experimental approaches on the bronchiolar and
 397 alveolar compartments, as well as mimicking the inflammation will provide important clues to
 398 improve the understanding of the HH pathway activation in respiratory research. We selected
 399 GPC3 but the synergy with other glypicans such as GPC5 abundant in pneumocytes, or other
 400 co-receptors like CDON may also unveil additional modulators of the HH pathway. GPC3 was
 401 found highly expressed in fibroblasts but we did not explore this aspect while the literature
 402 indicated an upregulation of GPC3 in cancer-associated fibroblasts, and an activation of
 403 fibroblasts by the HH pathway in the context of idiopathic lung fibrosis [35,36]. Interestingly,

404 with the advent of RNA therapeutics and cellular targeting, it could be possible to restore GPC3
405 signalling to prevent COPD-associated epithelial remodelling as microRNAs controlling GPC3
406 expression such as miR129-1-3P, miR1303, and miR1291 have already been identified [37,38].

407 In conclusion, we reported the first analysis of the transcript levels of HH co-receptors in the
408 lung. *Ex vivo* and *in vitro* analysis highlighted the involvement of GPC3 in airway epithelial
409 remodelling and its alteration in COPD patients. Understanding the mechanisms of GPC3
410 regulation in HH signalling is crucial to consider GPC3 as a potential biomarker or therapeutic
411 strategy in the context of COPD.

412

413 Contributors

414 GaD, JMP, and VD contributed to the conceptualisation of the research. GoD, AD, XD, JCM,
415 CR, MP, GaD, JMP, and VD contributed to data curation. LMGP, GaD, JMP, and VD
416 contributed to the formal analysis. MP, GaD, JMP, and VD contributed to funding acquisition
417 and project administration. LMGP, LSC, MAD, SH, JA, JMP, and VD contributed to the
418 investigation. LMG, GoD, AD, XD, JCM, CR, MP, GaD, JMP, and VD contributed to
419 methodology, resources, and software. JMP, and VD contributed to the supervision. LMGP,
420 MP, GaD, JMP, and VD contributed to validation and visualisation. LMGP, and VD wrote the
421 original draft of the manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript and approved
422 the final version for submission.

423

424 Declaration of Interests

425 Dr Ancel reports grants funds from Amgen France, Fund for Science and Humanity, personal
426 fees from Roche, Pfizer, MSD, Bristol-Myers Squibb, Novartis, AstraZeneca, Takeda, Sanofi,
427 Regeneron and Amgen, and support for attending meeting from Roche, Pfizer, MSD, Sanofi,
428 Regeneron ; outside the submitted work. Dr. Deslée reports personal fees from Nuvaira,
429 personal fees from BTG/PneumRx, personal fees from Chiesi, personal fees from Boehringer,
430 and personal fees from AstraZeneca; outside the submitted work. Dr. Perotin reports lecture
431 honoraria from AstraZeneca, and support for attending meetings from AstraZeneca and Chiesi;
432 outside the submitted work. Dr. Dormoy reports personal fees from AstraZeneca; outside the
433 submitted work.

434

435 Acknowledgments

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

439

440 Data sharing

441 RNAseq and scRNAseq data were obtained through publically available depositories and
442 interfaces. All data generated or analysed during this study are included in this published
443 article. Additional data are available upon request to the corresponding author.

444 **References**

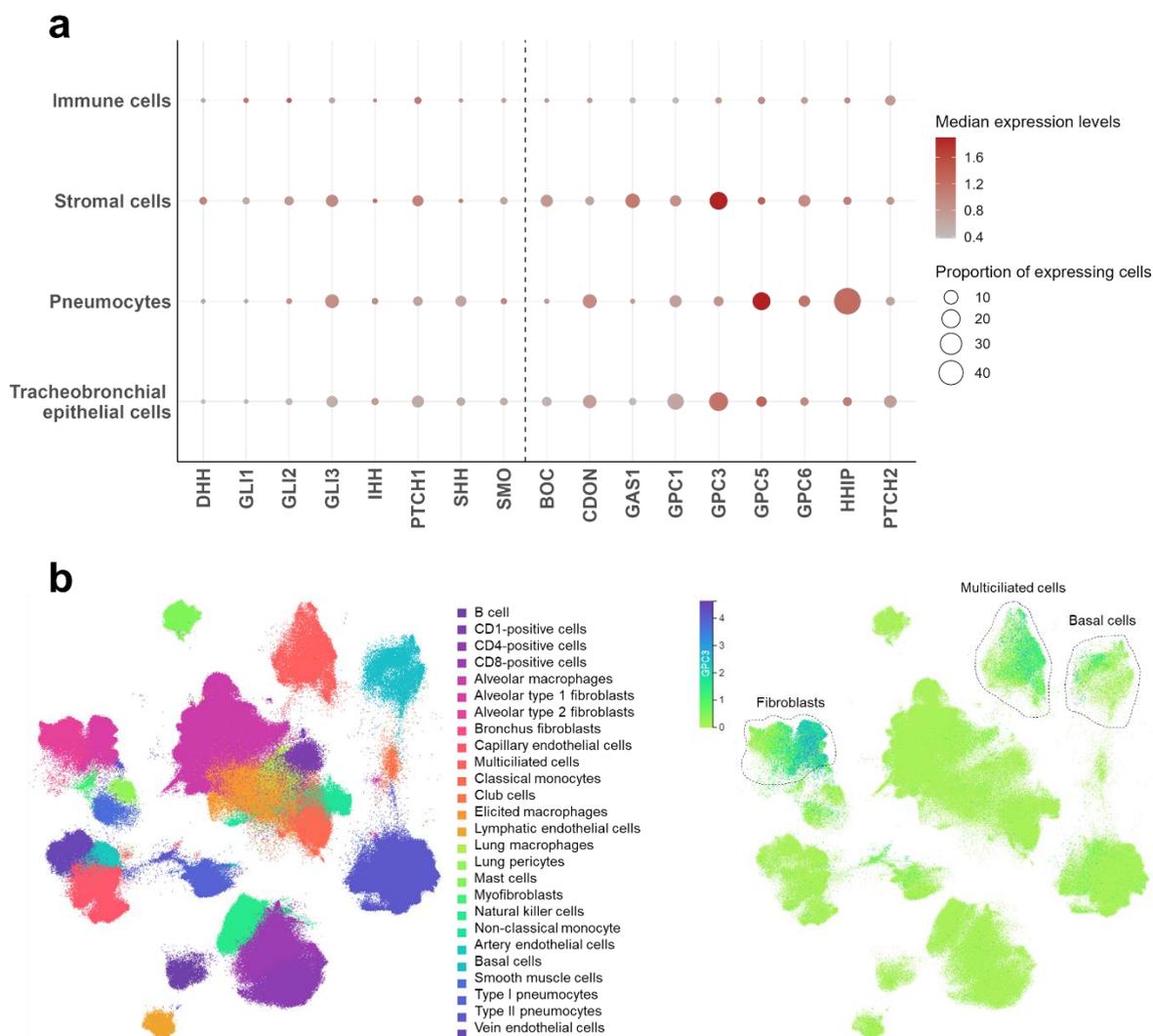
- 445 [1] Agustí A, Celli BR, Criner GJ, Halpin D, Anzueto A, Barnes P, et al. Global Initiative
 446 for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD Executive Summary. *Eur Respir J*
 447 2023;61:2300239. <https://doi.org/10.1183/13993003.00239-2023>.
- 448 [2] Crystal RG. Airway Basal Cells. The “Smoking Gun” of Chronic Obstructive
 449 Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1355–62.
 450 <https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1492PP>.
- 451 [3] Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, et al. Goblet Cell
 452 Hyperplasia and Epithelial Inflammation in Peripheral Airways of Smokers with Both
 453 Symptoms of Chronic Bronchitis and Chronic Airflow Limitation. *Am J Respir Crit Care Med*
 454 2000;161:1016–21. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.3.9907080>.
- 455 [4] Radicioni G, Ceppe A, Ford AA, Alexis NE, Barr RG, Bleecker ER, et al. Airway mucin
 456 MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive
 457 pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort. *Lancet Respir Med* 2021;9:1241–
 458 54. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00079-5).
- 459 [5] Gohy S, Carlier FM, Fregimilicka C, Detry B, Lecocq M, Ladjemi MZ, et al. Altered
 460 generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 2019;9:17963.
 461 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54292-x>.
- 462 [6] Zhang M, Wang H, Teng H, Shi J, Zhang Y. Expression of SHH signaling pathway
 463 components in the developing human lung. *Histochem Cell Biol* 2010;134:327–35.
 464 <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0738-2>.
- 465 [7] Belgacemi R, Danopoulos S, Deutsch G, Glass I, Dormoy V, Bellusci S, et al. Hedgehog
 466 Signaling Pathway Orchestrates Human Lung Branching Morphogenesis. *Int J Mol Sci*
 467 2022;23:5265. <https://doi.org/10.3390/ijms23095265>.
- 468 [8] Wang C, Mochel NSR de, Christenson SA, Cassandras M, Moon R, Brumwell AN, et
 469 al. Expansion of hedgehog disrupts mesenchymal identity and induces emphysema phenotype.
 470 *J Clin Invest* 2018;128:4343–58. <https://doi.org/10.1172/JCI99435>.
- 471 [9] Peng T, Frank DB, Kadzik RS, Morley MP, Rathi KS, Wang T, et al. Hedgehog actively
 472 maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature* 2015;526:578–
 473 82. <https://doi.org/10.1038/nature14984>.
- 474 [10] Petrov K, Wierbowski BM, Salic A. Sending and Receiving Hedgehog Signals. *Annu*
 475 *Rev Cell Dev Biol* 2017;33:145–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060847>.

- 476 [11] Bolaños AL, Milla CM, Lira JC, Ramírez R, Checa M, Barrera L, et al. Role of Sonic
 477 Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*
 478 2012;303:L978–90. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00184.2012>.
- 479 [12] Tam A, Osei ET, Cheung CY, Hughes M, Yang CX, McNagny KM, et al. Hedgehog
 480 Signaling as a Therapeutic Target for Airway Remodeling and Inflammation in Allergic
 481 Asthma. *Cells* 2022;11:3016. <https://doi.org/10.3390/cells11193016>.
- 482 [13] Belgacemi R, Luczka E, Ancel J, Diabasana Z, Perotin J-M, Germain A, et al. Airway
 483 epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. *EBioMedicine*
 484 2020;51:102572. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.033>.
- 485 [14] Ancel J, Belgacemi R, Perotin J-M, Diabasana Z, Dury S, Dewolf M, et al. Sonic
 486 hedgehog signalling as a potential endobronchial biomarker in COPD. *Respir Res* 2020;21:207.
 487 <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01478-x>.
- 488 [15] Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, et al. A Genome-Wide
 489 Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two
 490 Major Susceptibility Loci. *PLOS Genet* 2009;5:e1000421.
 491 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000421>.
- 492 [16] Zhou X, Baron RM, Hardin M, Cho MH, Zielinski J, Hawrylkiewicz I, et al.
 493 Identification of a chronic obstructive pulmonary disease genetic determinant that regulates
 494 HHIP. *Hum Mol Genet* 2012;21:1325–35. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr569>.
- 495 [17] Saber Cherif L, Diabasana Z, Perotin J-M, Ancel J, Petit LMG, Devilliers MA, et al.
 496 The Nicotinic Receptor Polymorphism rs16969968 Is Associated with Airway Remodeling and
 497 Inflammatory Dysregulation in COPD Patients. *Cells* 2022;11:2937.
 498 <https://doi.org/10.3390/cells11192937>.
- 499 [18] Diabasana Z, Perotin J-M, Belgacemi R, Ancel J, Mulette P, Launois C, et al. Chr15q25
 500 Genetic Variant rs16969968 Alters Cell Differentiation in Respiratory Epithelia. *Int J Mol Sci*
 501 2021;22:6657. <https://doi.org/10.3390/ijms22136657>.
- 502 [19] Nakano K, Orita T, Nezu J, Yoshino T, Ohizumi I, Sugimoto M, et al. Anti-glypican 3
 503 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res*
 504 *Commun* 2009;378:279–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.033>.
- 505 [20] Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madissoon E, et al.
 506 An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med* 2023;29:1563–77.
 507 <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02327-2>.

- 508 [21] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, Miyazaki Y, Nakano K, Tsunoda H, et al. Anti-
 509 glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. *Cancer Res*
 510 2008;68:9832–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1973>.
- 511 [22] Wierbowski BM, Petrov K, Aravena L, Gu G, Xu Y, Salic A. Hedgehog Pathway
 512 Activation Requires Coreceptor-Catalyzed, Lipid-Dependent Relay of the Sonic Hedgehog
 513 Ligand. *Dev Cell* 2020;55:450-467.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.017>.
- 514 [23] Svärd J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström A, et al.
 515 Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the
 516 mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* 2006;10:187–97.
 517 <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.013>.
- 518 [24] Petrova E, Rios-Esteves J, Ouerfelli O, Glickman JF, Resh MD. Inhibitors of Hedgehog
 519 acyltransferase block Sonic Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* 2013;9:247–9.
 520 <https://doi.org/10.1038/nchembio.1184>.
- 521 [25] Simon E, Aguirre-Tamaral A, Aguilar G, Guerrero I. Perspectives on Intra- and
 522 Intercellular Trafficking of Hedgehog for Tissue Patterning. *J Dev Biol* 2016;4:34.
 523 <https://doi.org/10.3390/jdb4040034>.
- 524 [26] Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et
 525 al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014;505:412–6.
 526 <https://doi.org/10.1038/nature12807>.
- 527 [27] De Cat B, Muyltermans S-Y, Coomans C, Degeest G, Vanderschueren B, Creemers J,
 528 et al. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell
 529 survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *J Cell Biol* 2003;163:625–35.
 530 <https://doi.org/10.1083/jcb.200302152>.
- 531 [28] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3: a
 532 novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*
 533 2003;125:89–97. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00689-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00689-9).
- 534 [29] Alshammari FO, Satari AO, Aljabali AS, Al-mahdy YS, Alabdallat YJ, Al-sarayra YM,
 535 et al. Glypican-3 Differentiates Intraductal Carcinoma and Paget’s Disease from Other Types
 536 of Breast Cancer. *Medicina (Mex)* 2023;59:86. <https://doi.org/10.3390/medicina59010086>.
- 537 [30] Ning J, Jiang S, Li X, Wang Y, Deng X, Zhang Z, et al. GPC3 affects the prognosis of
 538 lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. *BMC Pulm Med* 2021;21:199.
 539 <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01549-9>.
- 540 [31] Capurro MI, Shi W, Filmus J. LRP1 mediates Hedgehog-induced endocytosis of the
 541 GPC3-Hedgehog complex. *J Cell Sci* 2012;125:3380–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.098889>.

- 542 [32] Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling
 543 during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell* 2008;14:700–
 544 11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.006>.
- 545 [33] Liu YC, Wierbowski BM, Salic A. Hedgehog pathway modulation by glypican 3-
 546 conjugated heparan sulfate. *J Cell Sci* 2022;135:jcs259297. <https://doi.org/10.1242/jcs.259297>.
- 547 [34] Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The Nature of
 548 Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*
 549 2004;350:2645–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032158>.
- 550 [35] Li D, Wang Y, Shi C, Fu S, Sun Y-F, Li C. Targeting GPC3high cancer-associated
 551 fibroblasts sensitizing the PD-1 blockage therapy in gastric cancer. *Ann Med* 2023;55:2189295.
 552 <https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2189295>.
- 553 [36] Effendi WI, Nagano T. The Hedgehog Signaling Pathway in Idiopathic Pulmonary
 554 Fibrosis: Resurrection Time. *Int J Mol Sci* 2022;23:171. <https://doi.org/10.3390/ijms23010171>.
- 555 [37] Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Sagliocco F, et al. A functional
 556 screening identifies five microRNAs controlling glypican-3: role of miR-1271 down-regulation
 557 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md* 2013;57:195–204.
 558 <https://doi.org/10.1002/hep.25994>.
- 559 [38] Maurel M, Dejeans N, Taouji S, Chevet E, Grosset CF. MicroRNA-1291-mediated
 560 silencing of IRE1 α enhances Glypican-3 expression. *RNA N Y N* 2013;19:778–88.
 561 <https://doi.org/10.1261/rna.036483.112>.
- 562

Figure 1



564

565 Figure 1: Expression of GPC3 at a single-cell resolution in the human airways. (A) Bubble plot

566 representing cell populations in y-axis and genes (regrouped in two categories: HH pathway

567 core elements (DHH, GLI1, GLI2, GLI3, IHH, PTCH1, SHH, and SMO) and co-receptors

568 (BOC, CDON, GAS1, GPC1, GPC3, GPC5, GPC6, HHIP, and PTCH2)) in x-axis. The size of

569 the dots represents the proportion of expressing cells and the colour intensity represents the

570 median of expression levels. Four categories of respiratory cell populations were selected:

571 immune cells (n= 408371 cells), stromal cells (n=120988 cells), pneumocytes (n=123456 cells)

572 and tracheobronchial epithelial cells (n= 40822 cells). (B) Left panel, UMAP of the HLCA

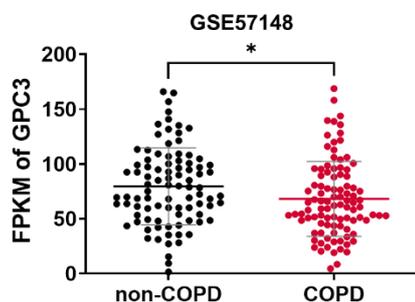
573 pulmonary cell clusters. Right panel, UMAP of the GPC3 transcript levels for each cell

574 population. The colour intensity represents the median of GPC3 transcript levels. The dashed

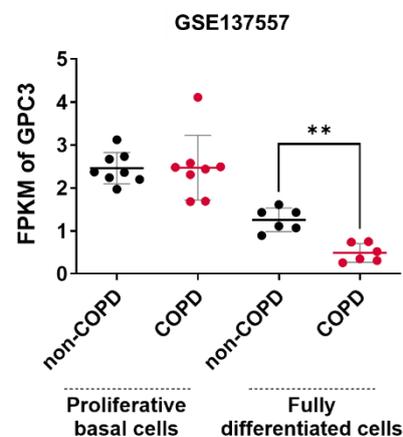
575 lines highlight the population of fibroblasts, multiciliated cells, and basal cells.

Figure 2

a



b

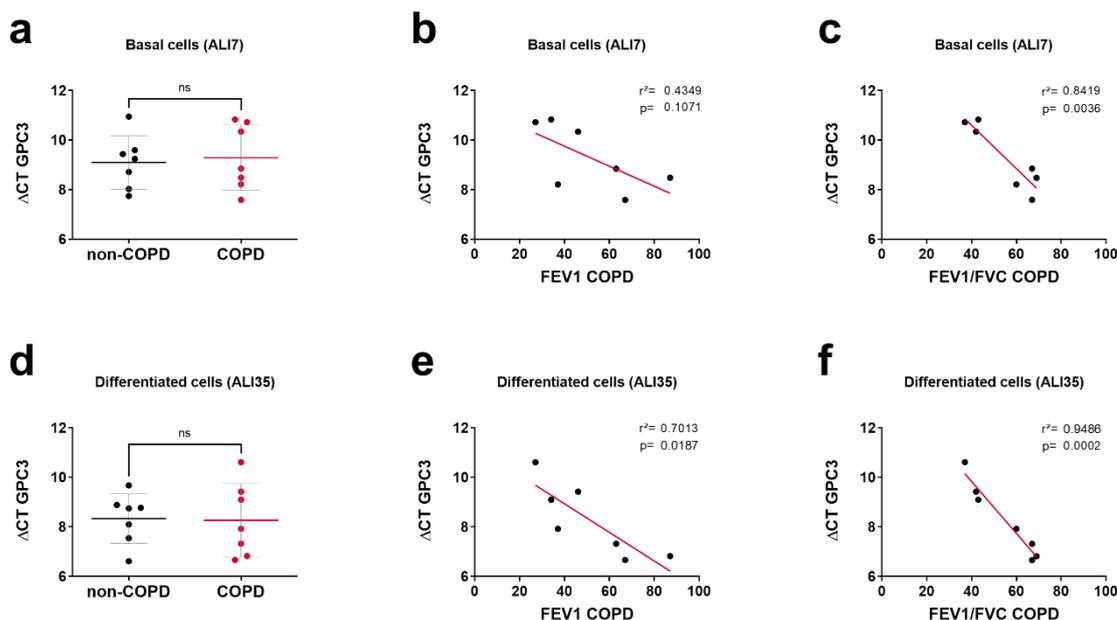


576

577 Figure 2: GPC3 transcript levels are decreased in COPD patients. (A) Dot plot with mean±SD
 578 showing GPC3 expression analysis from RNAseq data (GSE57148). The whole-lung tissues
 579 were obtained from COPD (n=98, red) and non-COPD (n=91, black) patients. *p<0.05; non-
 580 COPD vs COPD. (B) Dot plot with mean±SD showing GPC3 expression analysis from
 581 RNAseq data (GSE137557). The airway epithelial cells were obtained from tracheobronchial
 582 segments of non-COPD and COPD patients and cultured in air-liquid interface conditions. The
 583 proliferative basal cells (n=8) were collected for analysis before the air switch and the fully
 584 differentiated cells (n=6) were collected for analysis after 28 days of differentiation. **p<0.01;
 585 non-COPD vs COPD. FPKM: Fragments per kilobase million.

586

Figure 3

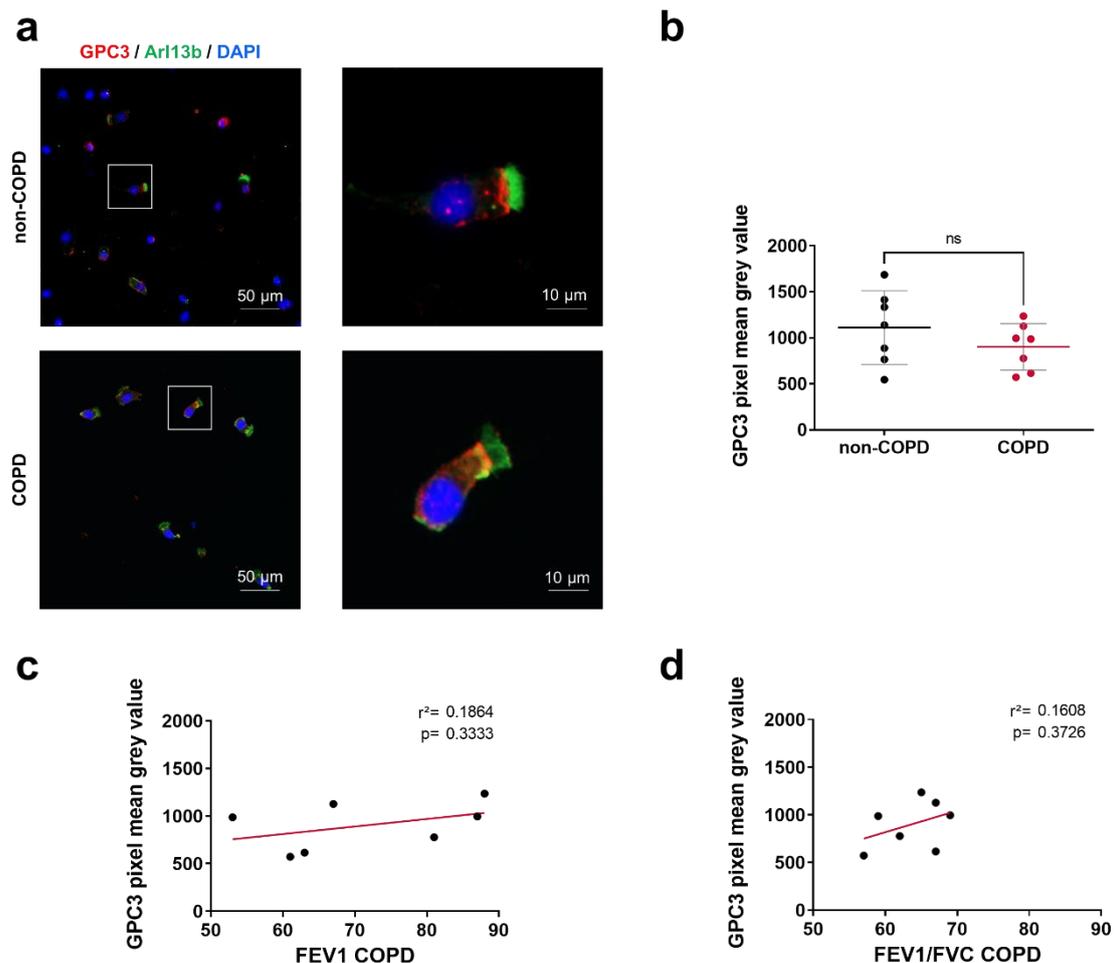


587

588 Figure 3: GPC3 transcript levels are associated with lung function in COPD patients. ALI
 589 cultures were performed from isolated AEC obtained from COPD patients (n=7, red) and non-
 590 COPD (n=7, black), and collected for transcript analysis after 7 days (basal cells) or 35 days
 591 (differentiated cells). (A) Dot plot with mean±SD showing ΔCT GPC3 expression analysis on
 592 basal cells. ns: non-significant; non-COPD vs COPD. (B) Linear regression representing a
 593 correlation between GPC3 transcript levels and FEV₁ (forced expiratory volume in 1s) in ALI7
 594 cultures of COPD patients (n=7). (C) Linear regression representing a correlation between
 595 GPC3 transcript levels and FEV₁/FVC (forced vital capacity) in ALI7 cultures of COPD
 596 patients. (D) Dot plot with mean±SD showing GPC3 expression analysis on differentiated cells.
 597 ns: non-significant; non-COPD vs COPD. (E) Linear regression representing a correlation
 598 between GPC3 transcript levels and FEV₁ in ALI35 cultures of COPD patients (n=7). (F) Linear
 599 regression representing a correlation between GPC3 transcript levels and FEV₁/FVC in ALI35
 600 cultures of COPD patients.

601

Figure 4



602

603 Figure 4: Localisation of GPC3 in isolated AEC of non-COPD and COPD patients. (A)

604 Representative micrographs taken from cytopun AEC of non-COPD and COPD patients

605 showing cilia (Arl13b, green) and GPC3 (red). Nuclei are stained in blue (DAPI). Magnification

606 corresponding to the selected area is shown. (B) Dot plot with mean \pm SD representing GPC3

607 pixel mean grey values of non-COPD (n=7, black) and COPD (n=7, red) patients. ns: non-

608 significant; non-COPD vs COPD. (C) Linear regression representing a correlation between

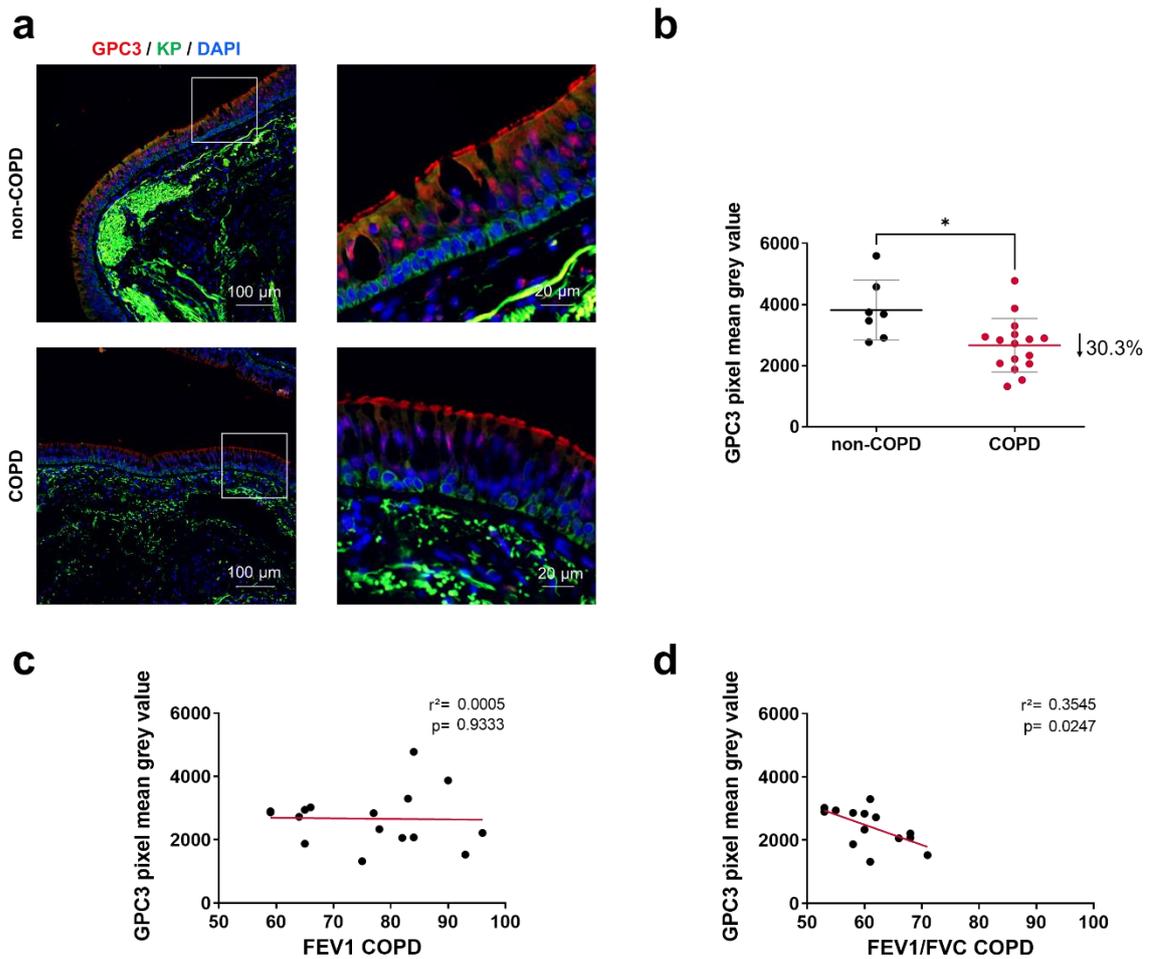
609 GPC3 pixel levels and FEV₁ in cytopspins of COPD patients (n=7). (D) Linear regression

610 representing a correlation between GPC3 pixel levels and FEV₁/FVC in cytopspins of COPD

611 patients (n=7).

612

Figure 5

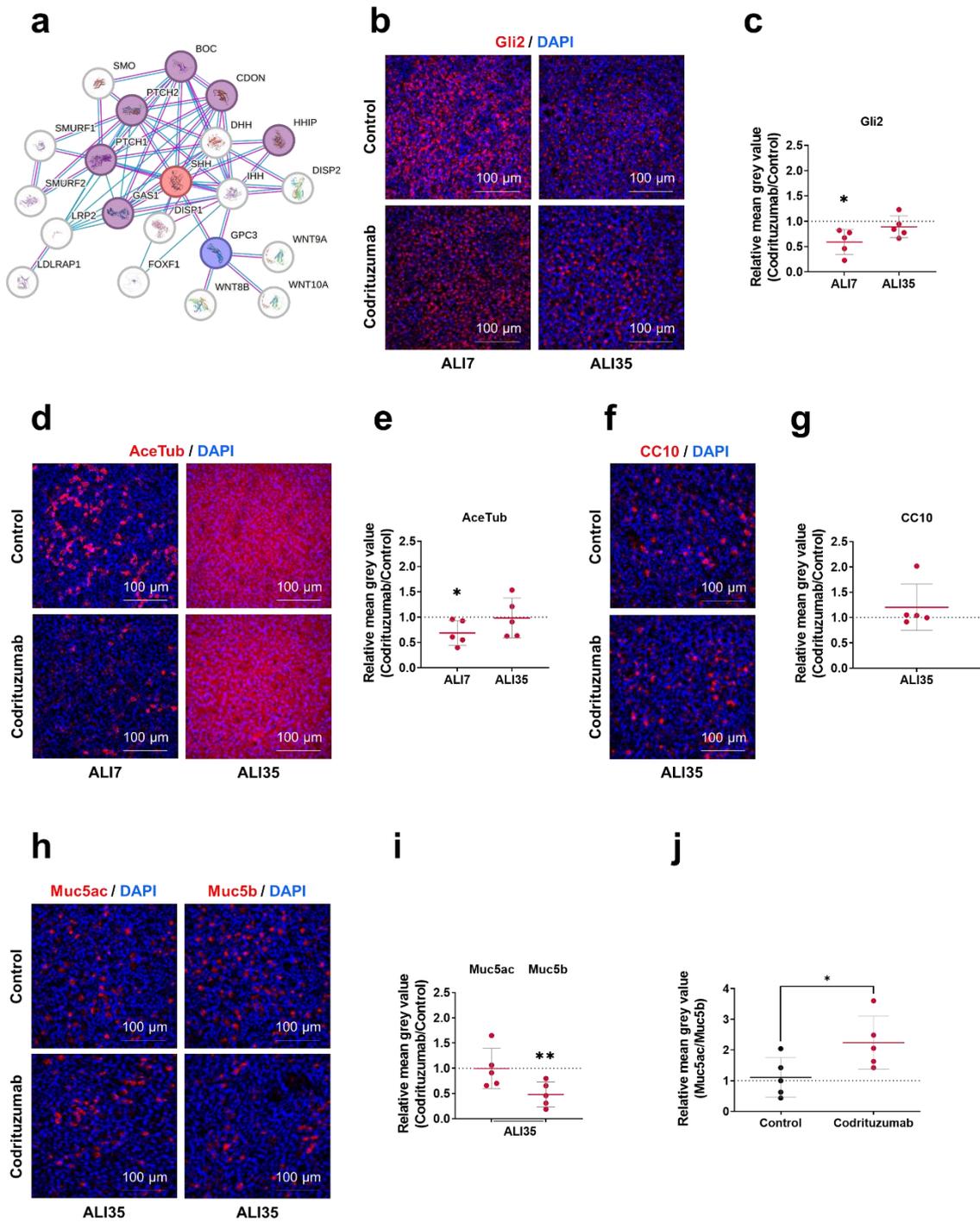


613

614 Figure 5: Localisation of GPC3 on FFPE lung tissues of non-COPD and COPD patients. (A)
 615 Representative micrographs showing bronchial epithelia of non-COPD and COPD patients
 616 stained for GPC3 (red), basal cells (KP, green) and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification
 617 corresponding to the selected area is shown. (B) Dot plot with mean±SD representing GPC3
 618 pixel mean grey values of non-COPD (n=7, black) and COPD (n=16, red) patients. *p<0.05;
 619 non-COPD vs COPD. (C) Linear regression representing a correlation between GPC3 pixel
 620 levels and FEV₁ in bronchial epithelia of COPD patients (n=16). (D) Linear regression
 621 representing a correlation between GPC3 pixel levels and FEV₁/FVC in bronchial epithelia of
 622 COPD patients (n=14).

623

Figure 6



625 Figure 6: GPC3 inhibition by Codrituzumab alters AEC differentiation. (A) Network of protein-
 626 protein interaction generated on the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
 627 (STRING). (B) Representative micrographs taken from AEC cultures codrituzumab-treated or
 628 untreated at ALI7 and ALI35 stained for Gli2 (red) and cell nuclei (blue). (C) Dot plot with
 629 mean±SD showing relative pixel mean grey values of Gli2 at ALI7 and ALI35. *p<0.05;
 630 Control vs Codrituzumab. (D) Representative micrographs of AEC cultures codrituzumab-
 631 treated or untreated at ALI7 and ALI35 showing cilia (Acetylated tubulin, red) and cell nuclei
 632 (blue). (E) Dot plot with mean±SD showing relative pixel mean grey values of acetylated
 633 tubulin at ALI7 and ALI35. *p<0.05; Control vs Codrituzumab. (F) Representative
 634 micrographs of AEC cultures codrituzumab-treated or untreated at ALI35 stained for CC10
 635 (red) and cell nuclei (blue). (G) Dot plot with mean±SD showing relative pixel mean grey
 636 values of CC10 at ALI35 in Codrituzumab-treated conditions compared to untreated cultures.
 637 (H) Representative micrographs taken from AEC cultures codrituzumab-treated or untreated at
 638 ALI35 stained for mucins (Muc5ac or Muc5b, red) and cell nuclei (blue). (I) Dot plot with
 639 mean±SD showing relative pixel mean grey values of Muc5ac or Muc5b at ALI35. **p<0.01;
 640 Control vs Codrituzumab. (J) Dot plots with mean±SD representing the relative pixel mean
 641 grey value ratios of Muc5ac/Muc5b in untreated (black) and Codrituzumab-treated cells (red).
 642 *p<0.05; Control vs Codrituzumab.
 643

644 Table 1: Clinical characteristics of patients.

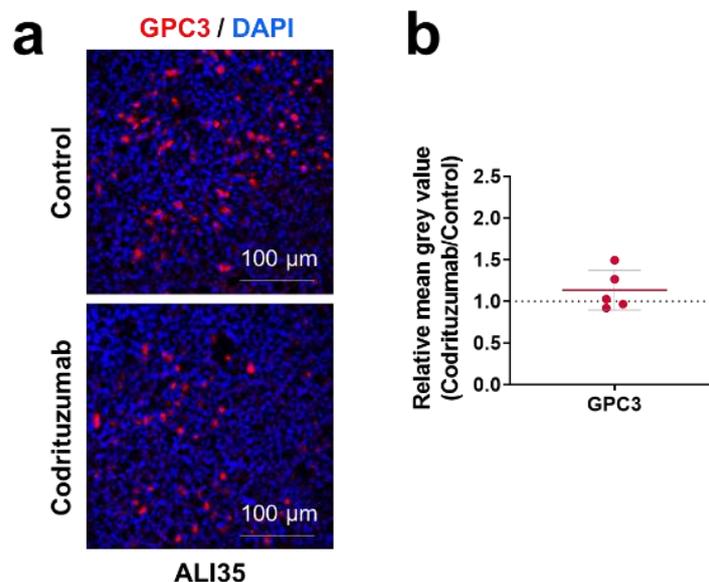
645 Data are expressed as mean±SD, number or percentage. FEV₁: Forced Expiratory Volume in
 646 1s; FVC: Forced Capacity Capacity. Ns: non-significant; *p<0.05; ***p<0.001.

647

	Bronchial brushing		
	Non-COPD	COPD	
Number of subjects	11	11	
Gender F/M	4/7	2/9	ns
Age, years	55.5±14.6	67.6±7.2	*
Smoking history			
Never	0	0	ns
Former	5	6	ns
Current	6	5	ns
Pack-years	37±26.5	58.1±32.3	ns
Pulmonary function test			
FEV ₁ % pred	88.5±10.6	58.5±21.3	***
FEV ₁ /FVC	0.82±0.07	0.57±0.11	***
COPD			
GOLD 0/1/2/3/4		3/5/3/0	
	FFPE tissues		
	Non-COPD	COPD	
Number of subjects	7	16	
Gender F/M	1/6	6/10	ns
Age, years	68.9±6.8	62.3±10.5	ns
Smoking history			
Never	0	0	
Former	5	9	ns
Current	2	7	ns
Pack-years	41±27.8	46.6±12.9	ns
Pulmonary function test			
FEV ₁ % pred	103.2±12.4	76.3±12	***
FEV ₁ /FVC	0.78±0.03	0.61±0.06	***
COPD			
GOLD 0/1/2/3/4		8/8/0/0	

648 Supplemental materials: Figures

Figure S1

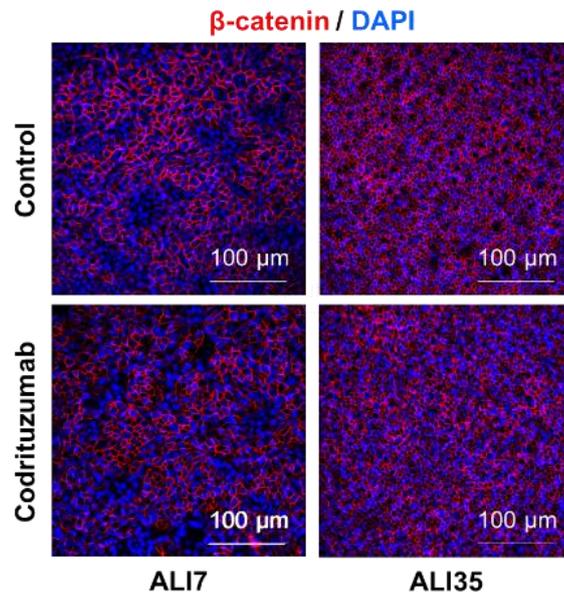


649

650 Figure S1: The treatment with Codrituzumab did not alter GPC3 localisation. (A)
651 Representative micrographs taken from AEC cultures Codrituzumab-treated or untreated at
652 ALI35 stained for GPC3 (red) and cell nuclei (blue). (B) Dot plot with mean \pm SD showing
653 relative pixel mean grey values of GPC3 at ALI35 in Codrituzumab-treated cultures compared
654 to untreated cultures.

655

Figure S2

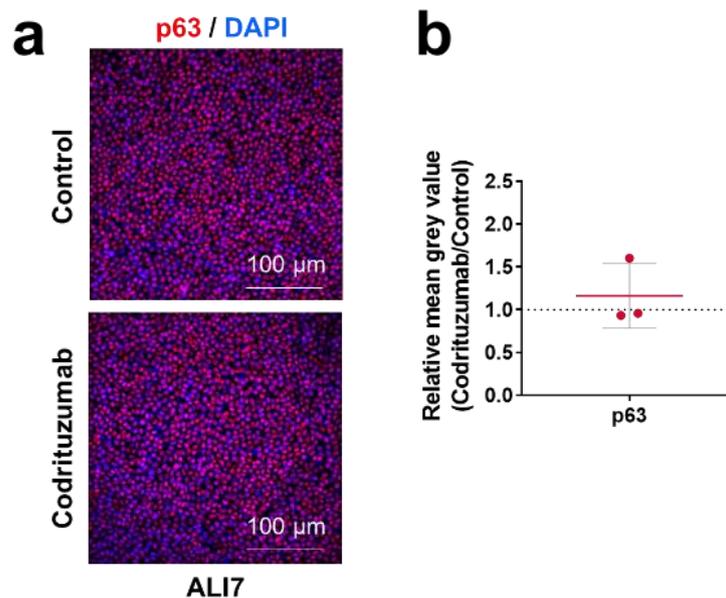


656

657 Figure S2: The treatment with Codrituzumab did not impact the Wnt pathway. Representative
658 micrographs showing AEC cultures Codrituzumab-treated or untreated at ALI7 and ALI35
659 stained for β -catenin (red) and cell nuclei (blue).

660

Figure S3



661

662 Figure S3: The treatment with Codrituzumab did not alter basal cell proportions. (A)

663 Representative micrographs taken from AEC cultures Codrituzumab-treated or untreated at

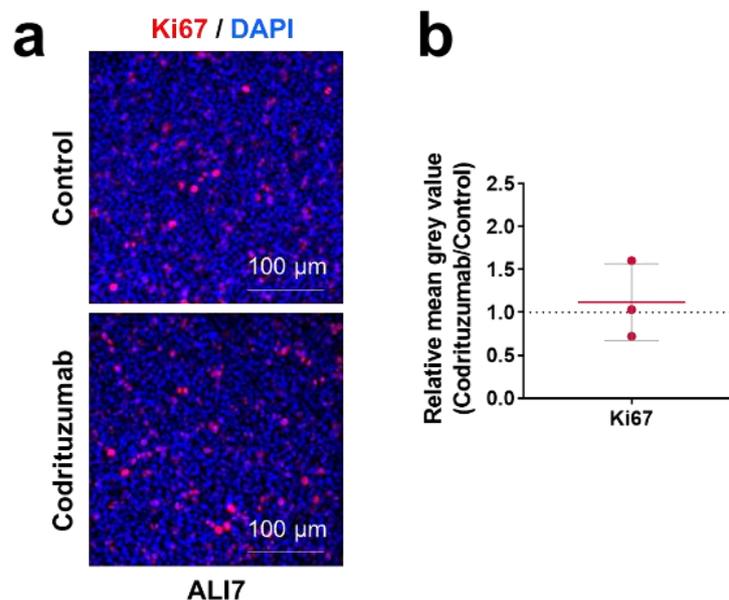
664 ALI7 stained for p63 (red) and cell nuclei (blue). (B) Dot plot with mean \pm SD showing relative

665 pixel mean grey values of p63 at ALI7 in Codrituzumab-treated cultures compared to untreated

666 cultures.

667

Figure S4



668

669 Figure S4: The treatment with Codrituzumab did not alter the proliferative index. (A)
670 Representative micrographs showing AEC cultures Codrituzumab-treated or untreated at ALI7
671 stained for Ki67 (red) and cell nuclei (blue). (B) Dot plot with mean \pm SD showing relative pixel
672 mean grey values of Ki67 at ALI7 in Codrituzumab-treated cultures compared to untreated
673 cultures.

674

675 Table S1: List of antibodies.

676

Antibodies	Species	Reference	Companies	Concentrations	RRID
Acetylated tubulin	Mouse	T6793	Sigma-Aldrich	WMIF – 1:1000	AB_477585
Arl13b	Rabbit	17711-1-AP	ProteinTech	IF – 1:200	AB_2060867
β -catenin	Mouse	610153	BD Biosciences	WMIF – 1:500	AB_397554
CC10	Rabbit	10490-1-AP	ProteinTech	WMIF – 1:100	AB_2183285
Gli2 (amplified)	Rabbit	HPA074275	Sigma-Aldrich	WMIF – 1:100	AB_2686677
GPC3	Mouse	MAB2119	R&D systems	IF/WMIF – 1:200	AB_2112033
Ki67	Mouse	M7240	Agilent Dako	WMIF – 1:50	AB_2142367
KP	Rabbit	NB600-579	Novus Biological	IF – 1:250	AB_2296857
Muc5ac	Mouse	MAB2011	Millipore	WMIF – 1:100	AB_2146983
Muc5b	Rabbit	E-AB-15988	Elabscience	WMIF – 1:100	AB_3107123
p63	Goat	AF1916	R&D systems	WMIF – 1:100	AB_2207174

677 Table S2: Clinical characteristics of patients from GSE datasets.

678 Data are expressed as mean±SD, number or percentage. FEV₁: Forced Expiratory Volume in
 679 1s; FVC: Forced Volume Capacity.

680

	GSE57148		GSE137557	
	Non-COPD	COPD	Non-COPD	COPD
Number of subjects	91	98	8	8
Gender F/M	0/91	0/98	4/4	3/5
Age, years	60.9±9.5	67.5±6.4	46.3±15	55.1±7.7
Smoking history				
Never, %	NA	NA	100	NA
Former, %	NA	NA	0	100
Current, %	NA	NA	0	NA
Pack-years	35.2±17.2	48±22		57.5±39.2
Pulmonary function test				
FEV ₁ % pred	91±12.4	71.9±13.4	NA	18.6±5.1
FEV ₁ /FVC	0.75±0.04	0.51±0.08	NA	NA

2. Acteurs moléculaires altérés lors de l'inhibition de la voie HH

POU5F1 bridges Hedgehog signalling and epithelial remodelling in COPD

Petit et al., soumis

Résumé

Le remodelage de l'épithélium des voies aériennes est une des caractéristiques principales de la BPCO. La voie de signalisation Hedgehog (HH) est activée pendant la réparation épithéliale des voies aériennes pour assurer la prolifération en cas de lésion, et pendant la différenciation cellulaire pour rétablir un épithélium fonctionnel avec une clairance mucociliaire optimale. L'inhibition de la voie HH cause également un remodelage épithélial tel qu'il est observé dans la BPCO. Dans cette étude, nous avons étudié des acteurs moléculaires altérés lors de l'inhibition de la voie HH au cours de la différenciation, pouvant être impliqués dans le développement du remodelage. Une analyse transcriptomique a été réalisée sur des cultures de cellules épithéliales bronchiques traitées ou non avec un inhibiteur de la voie HH au début de la différenciation. Les niveaux de transcription de POU5F1 (Oct3/4) ont été étudiés à partir de données de RNAseq public et par RT-qPCR. La localisation de POU5F1 a été évaluée par immunomarquages fluorescents sur des tissus pulmonaires de patients non-BPCO et BPCO. Nous avons démontré une diminution de la localisation de POU5F1 dans l'épithélium bronchique des patients BPCO, corrélée à une baisse de la fonction respiratoire. Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires, les résultats mettent en évidence le rôle clé de la voie HH au travers de POU5F1 pour orchestrer la plasticité des cellules épithéliales respiratoires.

Mots clés : Hedgehog, BPCO, cellules épithéliales des voies aériennes, POU5F1

Manuscrit preprint (version auteur)

1 **POU5F1 bridges Hedgehog signalling and epithelial remodelling in COPD**

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

Laure M. G. Petit¹, Randa Belgacemi², Pauline Mulette³, Audrey Brisebarre¹, Lynda Saber Cherif¹, Maëva A. Devilliers¹, Sarah Hatoum¹, Julien Ancel³, Gonzague Delepine³, Anne Durlach³, Myriam Polette³, Gaëtan Deslée³, Jeanne-Marie Perotin³, Valérian Dormoy¹

¹Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, P3Cell UMR-S1250, Reims, France

²Lundquist Institute for Biomedical Innovation, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA.

³Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, CHU de Reims, P3Cell UMR-S1250, Reims, France

Correspondence to:
Dr Valérian Dormoy
Inserm UMR-S 1250
University of Reims Champagne-Ardenne
CHU Maison Blanche
45 rue Cognacq-Jay
51092 Reims
Phone +33 (0)3 10 73 62 28; Fax +33 (0)3 26 06 58 61
e-mail: valerian.dormoy@univ-reims.fr

28 **Abstract**

29 Airway epithelium remodelling is a hallmark of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)
30 pathogenesis. Hedgehog signalling is activated during airway epithelial repair to warrant
31 proliferation and during cell differentiation to establish a fully functional epithelium with
32 optimal mucociliary clearance. Consequently, it was found altered in COPD patients. Using
33 transcriptomic analysis on air-liquid interface airway epithelial cells during differentiation upon
34 Hedgehog pathway inhibition, we highlighted potential regulators of the COPD-associated
35 epithelial remodelling. Furthermore, the alteration of POU5F1 (OCT3/4) was validated in
36 COPD airway epithelial cells and lung tissues. Although further investigations are required, the
37 findings uncovered essential clues tethering respiratory epithelial cell plasticity and Hedgehog
38 signalling.

39

40 **Keywords:** Hedgehog, COPD, airways, epithelial cells, POU5F1

41 1. Introduction

42 Epithelial remodelling is a hallmark of COPD observed in lung tissues as a result of the
43 dysfunction of the airway epithelial cell differentiation and inflammatory challenges [1-3].
44 Genomics and transcriptomics highlighted the association of Hedgehog (HH) effectors with
45 epithelial cell plasticity and declined lung function in COPD patients [4-6].

46 We originally demonstrated that proper airway epithelial cell differentiation relies on HH
47 pathway activation, and the core elements including Gli2 and Shh were downregulated in
48 COPD patients [7,8]. The remodelling of the epithelium was particularly associated with an
49 alteration of ciliated cells [9-11]. In addition, the lung progenitors and branching
50 morphogenesis were disrupted during organogenesis in the absence of Shh [12]. The complex
51 machinery responsible for the fine-tuning of HH pathway during differentiation in respiratory
52 research is not elucidated.

53 In this study, we hypothesized that the HH pathway activation intertwined with differentiation
54 markers to maintain airway homeostasis. Therefore, we investigated the key molecular players
55 impacted by HH signalling inhibition during airway epithelial cell differentiation and their
56 potential alterations in COPD patients.

57

58 2. Materials and methods

59 *Human subjects*

60 COPD and non-COPD patients treated by lung resection or scheduled for fiberoptic
61 bronchoscopy with bronchial brushings (**Supplementary material: Table S1 and S2**) were
62 recruited following standards established and approved by the institutional review board of the
63 University Hospital of Reims, France (IRB Reims-CHU 20110612), and included in the cohort
64 for research and innovation in chronic inflammatory respiratory disease (RINNOPARI,
65 NCT02924818). The study included patients with or without COPD who gave their consent.
66 Exclusion criteria included all other acute or chronic respiratory diseases (asthma, cystic
67 fibrosis, bronchiectasis, or pulmonary fibrosis). At inclusion, age, sex, smoking history, and
68 pulmonary function test results were recorded. COPD was defined by post-bronchodilator FEV₁
69 (forced expiratory volume in 1s) / FVC (forced vital capacity) < 0.7. Former smokers were
70 considered for a smoking cessation longer than 6 months.

71 Human primary airway epithelial cell cultures

72 Isolated airway epithelial cells (AEC) were obtained from bronchial brushings of non-COPD
73 (n=11) and COPD patients (n=6) to establish air-liquid interface (ALI) cultures
74 (**Supplementary material: Table S1 and S2**) as previously described [13]. The cells were
75 recovered by scraping the brushes and dissociation using trypsin-versene. They were counted
76 with ADAM (NanoEnTek) according to NanoEnTek instructions. 150,000 cells were seeded
77 on 12-well plates containing 0.4 µm Transwells (Corning, Fisher Scientific) coated with 0.2
78 mg/mL collagen type IV from the human placenta (Sigma-Aldrich). CnT-17 media (CellnTec)
79 was used for initial proliferation in apical and basal chambers. Upon reaching cell confluency,
80 the apical medium was removed and PneumaCult-ALI (PnC-ALI, StemCell) medium was used
81 in the basal chamber. The culture medium was changed three times a week and cells were kept
82 up to 35 days in incubators at 37 °C, 5% CO₂. Inhibition of Shh signalling was achieved by
83 AB5E1 (AB_2188307, Interchim, 1µg/ml, diluted in sterile water) addition to the culture
84 medium as previously shown [7].

85 Transcriptomics

86 RNA sequencing, single-cell RNA analysis, and RT-qPCR methods are described in
87 **Supplementary material.**

88 Immunofluorescent staining and analyses

89 Immunofluorescent stainings were performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)
90 lung tissues distant from the tumour. Three µm FFPE lung tissue section slides were
91 deparaffinised and blocked with 10% BSA in PBS for 30 min at room temperature. The tissue
92 sections were then incubated with the primary antibody (POU5F1: AF1759 – R&D systems –
93 1:50) for one night at 4 °C in 3% BSA in PBS. After washing with PBS, a second primary
94 antibody was used for 1h at room temperature (KP: NBP2-29429 – Novus Biologicals – 1:250).
95 The sections were washed with PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies
96 in 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature. The DNA was stained with DAPI during
97 incubation with the secondary antibodies. Micrographs were acquired by AxioImageur Zeiss
98 (20x Ph) with ZEN software (8.1, 2012) and processed with ImageJ (National Institutes of
99 Health) for analysis. For each patient, five random fields per section containing bronchi were
100 taken to evaluate the localization of POU5F1 on epithelial cells. For each field, a threshold was
101 established by subtracting the background and setting the minimum at 0. POU5F1 expression

102 was determined by the pixel mean grey values (PMGV) in the region of interest defined by the
 103 epithelium in the two groups.

104 GO terms analysis

105 Gene ontology (GO) analysis was performed by String on 371 DEG (differentially expressed
 106 gene) ($\log_2FC = -0.5 < DEG < \log_2FC = 0.5$) with three categories: biological process (in green),
 107 cellular component (in red), and annotated keywords (in blue). All the statistically significant
 108 terms were represented on the histogram.

109 Statistics

110 The data are expressed as mean values \pm Standard deviation (SD). The differences between the
 111 two groups were determined using the Student's t-test (two-tailed) for parametric data, and
 112 Mann-Whitney for non-parametric data. The correlations were analysed using the Pearson test.
 113 A p-value < 0.05 was considered significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

114

115 **3. Results**

116 Since airway epithelial cell differentiation is readily analysable in air-liquid interface cultures
 117 and we previously highlighted the involvement of HH pathway during differentiation with an
 118 experimental strategy relying on an antibody targeting Shh (AB5E1), we investigated the global
 119 differential transcriptomic signature of the AB5E1-treated cells in the early step of the
 120 differentiation process (ALI7) [7]. 1,596 genes were significantly deregulated in AB5E1-
 121 treated cells (**Figure 1A**, listed in **Supplementary material: Table S4**). Eighteen genes were
 122 deregulated over 2-fold, five were downregulated (CXCL5, DEFB4A, SFRP1, SLC5A8,
 123 FCGBP) and thirteen were upregulated (ASB14, C1QTNF8, CILP, COL11A2, FER1L5, HPX,
 124 LIMS2, MYH3, OVCH2, POU5F1, SULT1A2, TMEM52, TNNI3) (**Figure 1A, B**). The
 125 transcriptomic profile of these eighteen genes at a single-cell level evidenced low proportions
 126 of lung populations expressing the transcripts consistent with a biological role oriented towards
 127 differentiation. In immune and stromal cells, $1.10 \pm 2.62\%$ [0.001-10.18] and $2.50 \pm 6.39\%$ [0.01-
 128 26.87] of cells respectively expressed the 18 genes (**Figure 1C**). They were detected in
 129 $1.52 \pm 2.72\%$ [0.01-11.35] of pneumocytes and $1.89 \pm 2\%$ [0.12-5.69] of tracheobronchial
 130 epithelial cells. A gene ontology (GO) analysis revealed that all the statistically significant GO
 131 terms (biological process, cellular component, and annotated keywords) were associated with
 132 ciliogenesis and cilia structure in AEC (**Figure 1D**). This bioinformatics analysis prompted us

133 to evaluate the master gene of differentiation POU5F1 (POU Class 5 Homeobox 1, also named
 134 OCT3/4) in COPD patients.

135 First, we analysed POU5F1 transcripts in non-COPD and COPD patients. In a public dataset
 136 (GSE137557) including very severe COPD patients ($FEV_1\%=18.6\pm 5.1$), there was a decrease
 137 of 22.3% in the expression of POU5F1 in proliferative basal cells (2.74 ± 0.147 FPKM vs
 138 3.52 ± 0.45 FPKM, COPD vs non-COPD, $p<0.05$) (**Figure 2A**), and a 24.2 % reduction in fully
 139 differentiated cells (3.09 ± 0.27 FPKM vs 4.08 ± 0.3 FPKM, COPD vs non-COPD, $p<0.01$). We
 140 analysed POU5F1 transcripts in AEC isolated from bronchial brushings of non-COPD and
 141 moderate COPD patients ($FEV_1\%=51.6\pm 21.5$). There was no difference in POU5F1 transcript
 142 expressions between non-COPD and COPD samples at ALI7 and ALI35 ($9\pm 0.53\Delta CT$ vs
 143 $8.99\pm 1.56\Delta CT$, and $8.56\pm 1.52\Delta CT$ vs $8.29\pm 0.86\Delta CT$, COPD vs non-COPD, $p<0.05$
 144 respectively) (**Figure 2B, C**). In addition, there was no correlation between FEV_1/FVC in
 145 COPD patients and POU5F1 transcript expression at ALI7 and ALI35 ($r^2=0.0291$, $p>0.05$, and
 146 $r^2=0.0420$, $p>0.05$ respectively) (**Supplementary material Figure S1**). Finally, POU5F1
 147 protein levels and localisations in the bronchial epithelia of FFPE lung tissues were
 148 investigated. Interestingly, POU5F1 epithelial localisation was decreased by 36.1% in COPD
 149 patients (3783 ± 797.3 PGMV vs 5912 ± 2233 PGMV, COPD vs non-COPD, $p<0.05$) (**Figure 2D,**
 150 **E**). A low POU5F1 epithelial abundance was correlated with low FEV_1/FVC in COPD patients
 151 ($r^2=0.5342$, $p<0.05$) (**Figure 2F**). Altogether, these findings suggest an association between
 152 POU5F1 levels and the severity of lung function impairment in COPD patients.

153 4. Discussion

154 This original experimental design seeking HH pathway regulators during AEC differentiation
155 highlighted a list of potential key genes partially responsible for epithelial remodelling
156 especially regarding cilia homeostasis. Focusing on the reprogramming factor POU5F1, we
157 demonstrated its alteration in COPD patients.

158 POU5F1 immunoreactivity in bronchial biopsy was already found significantly reduced and
159 involved in lung epithelial cell plasticity in smokers/ex-smokers COPD patients compared to
160 non-smokers non-COPD patients [14]. We confirmed these findings and added the
161 independence regarding smoking history since we matched the clinical features of our cohort.
162 The increase of POU5F1 transcripts in the early steps of AEC differentiation in the presence of
163 AB5E1 suggests that HH pathway activation promotes the switch between proliferation and
164 differentiation in respiratory basal cells partly via POU5F1. This is supported by experimental
165 findings in mouse embryonic stem cells (mESC) where reduced POU5F1 levels stimulated
166 mESC differentiation, while an overactivation of the HH pathway induced proliferation [15].
167 Similarly, POU5F1 transfection decreased HH pathway activation in mESC GLI1 activated
168 [16]. Thereafter, the levels of POU5F1 in COPD AEC are not sufficient to maintain a fully
169 functional epithelium.

170 Despite the robust transcriptomic analysis of human AEC during differentiation, and the
171 validation of an intriguing association between POU5F1 and HH signalling in the respiratory
172 context, our study presents some limitations. Although the deprivation of Shh via AB5E1 is
173 efficient, residual activity of the HH pathway may remain. Even if the *in vitro* modulation of
174 POU5F1 is challenging because of its direct control of the epithelial stemness properties, AEC
175 differentiation should be addressed in future experimental approaches to precise the molecular
176 mechanisms.

177 In conclusion, we demonstrated that interfering with HH signalling during AEC differentiation
178 is insightful to identify essential biological markers such as POU5F1 bridging this multifaceted
179 pathway with epithelial plasticity and remodelling in the context of COPD. Additional
180 investigations are required to fully characterized the complex molecular mechanisms at stake,
181 and explore the other potential candidates.

182 Declarations**183 Ethics approval and consent to participate**

184 Non-COPD and COPD patients were recruited from the Department of Pulmonary Medicine at
185 the University Hospital of Reims (France) and included in the Research and Innovation in
186 Chronic Inflammatory Respiratory Diseases (RINNOPARI, NCT02924818) cohort. The study
187 was approved by the ethics committee (CCP Dijon EST I, N°2016-A00242–49) and was
188 conducted in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. The study
189 included patients who gave their consent to participate.

190

191 Consent for publication

192 Not applicable.

193

194 Availability of data and materials

195 All data generated or analysed during this study are included in this published article and its
196 supplementary information files. The datasets are publically accessible via the data repository
197 Gene Expression Omnibus (GEO): GSE137557 and GSE262404.

198

199 Competing interests

200 Dr Ancel reports grants funds from Amgen France, Fund for Science and Humanity, personal
201 fees from Roche, Pfizer, MSD, Bristol-Myers Squibb, Novartis, AstraZeneca, Takeda, Sanofi,
202 Regeneron and Amgen, and support for attending meeting from Roche, Pfizer, MSD, Sanofi,
203 Regeneron; outside the submitted work. Dr. Deslée reports personal fees from Chiesi, personal
204 fees from Boehringer, personal fees from Sanofi, personal fees from GSK, and personal fees
205 from AstraZeneca; outside the submitted work. Dr. Perotin reports lecture honoraria from
206 AstraZeneca, and support for attending meetings from AstraZeneca and Chiesi; outside the
207 submitted work. Dr. Dormoy reports personal fees from AstraZeneca; outside the submitted
208 work.

209

210 Funding

211 This work was supported by Funding from the University of Reims Champagne-Ardenne
212 (URCA) and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

213

214 **Authors' contributions**

215 GaD, JMP, and VD contributed to the conceptualisation of the research. AB, MP, GaD, JMP,
216 and VD contributed to data curation. LMGP, RB, AB, GaD, JMP, and VD contributed to the
217 formal analysis. MP, GaD, JMP, and VD contributed to funding acquisition and project
218 administration. LMGP, RB, PM, LSC, MAD, SH, JA, JMP, and VD contributed to the
219 investigation. LMG, RB, GoD, AD, MP, GaD, JMP, and VD contributed to methodology,
220 resources, and software. JMP, and VD contributed to the supervision. LMGP, MP, GaD, JMP,
221 and VD contributed to validation and visualisation. LMGP, and VD wrote the original draft of
222 the manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript and approved the final version
223 for submission.

224

225 **Acknowledgments**

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

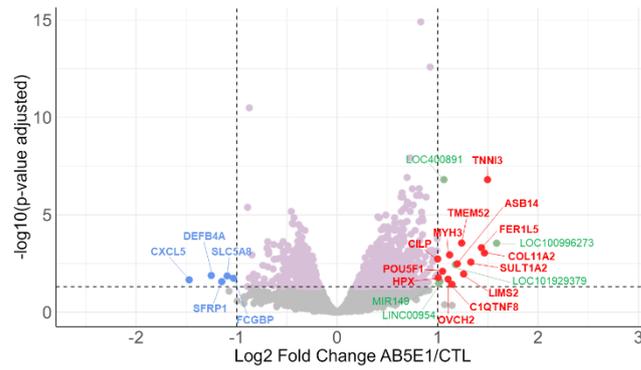
229 **References**

- 230 [1] Raby KL, Michaeloudes C, Tonkin J, Chung KF, Bhavsar PK. Mechanisms of airway
 231 epithelial injury and abnormal repair in asthma and COPD. *Front Immunol* 2023;14.
 232 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1201658>.
- 233 [2] Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, Detry BR, Bouzin C, Gaide Chevronay H, et al.
 234 Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition.
 235 *Eur Respir J* 2015;45:1258–72. <https://doi.org/10.1183/09031936.00135814>.
- 236 [3] Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, et al. Bronchial epithelial cells:
 237 The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?
 238 *Respirology* 2015;20:722–9. <https://doi.org/10.1111/resp.12542>.
- 239 [4] Guo F, Zhang L, Yu Y, Gong L, Tao S, Werder RB, et al. Identification of a distal
 240 enhancer regulating hedgehog interacting protein gene in human lung epithelial cells.
 241 *EBioMedicine* 2024;101:105026. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105026>.
- 242 [5] Zhou X, Baron RM, Hardin M, Cho MH, Zielinski J, Hawrylkiewicz I, et al.
 243 Identification of a chronic obstructive pulmonary disease genetic determinant that regulates
 244 HHIP. *Hum Mol Genet* 2012;21:1325–35. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr569>.
- 245 [6] Hobbs BD, Hersh CP. Integrative genomics of chronic obstructive pulmonary disease.
 246 *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:276–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.086>.
- 247 [7] Belgacemi R, Luczka E, Ancel J, Diabasana Z, Perotin J-M, Germain A, et al. Airway
 248 epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. *EBioMedicine*
 249 2020;51:102572. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.033>.
- 250 [8] Ancel J, Belgacemi R, Perotin J-M, Diabasana Z, Dury S, Dewolf M, et al. Sonic
 251 hedgehog signalling as a potential endobronchial biomarker in COPD. *Respir Res* 2020;21:207.
 252 <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01478-x>.
- 253 [9] Petit LMG, Belgacemi R, Ancel J, Cherif LS, Polette M, Perotin J-M, et al. Airway
 254 ciliated cells in adult lung homeostasis and COPD. *Eur Respir Rev* 2023;32.
 255 <https://doi.org/10.1183/16000617.0106-2023>.
- 256 [10] Belgacemi R, Diabasana Z, Hoarau A, Dubernard X, Mérol J-C, Ruaux C, et al. Primary
 257 ciliogenesis is a crucial step for multiciliated cell determinism in the respiratory epithelium. *J*
 258 *Cell Mol Med* 2021;25:7575–9. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16729>.
- 259 [11] Perotin J-M, Polette M, Deslée G, Dormoy V. CiliOPD: a ciliopathy-associated COPD
 260 endotype. *Respir Res* 2021;22:74. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01665-4>.

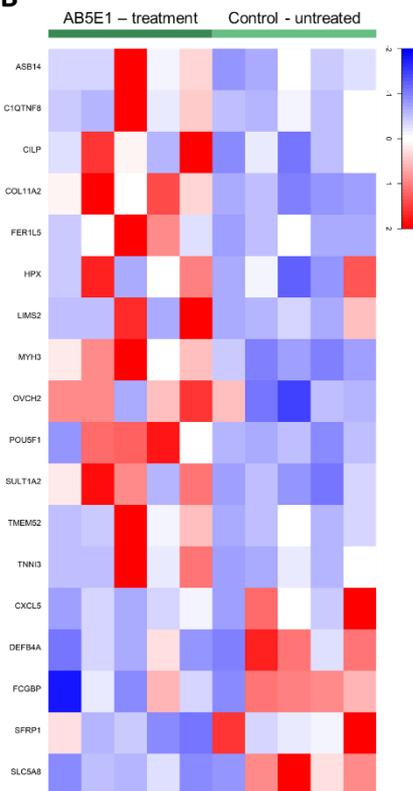
- 261 [12] Belgacemi R, Danopoulos S, Deutsch G, Glass I, Dormoy V, Bellusci S, et al. Hedgehog
262 Signaling Pathway Orchestrates Human Lung Branching Morphogenesis. *Int J Mol Sci*
263 2022;23:5265. <https://doi.org/10.3390/ijms23095265>.
- 264 [13] Saber Cherif L, Diabasana Z, Perotin J-M, Ancel J, Petit LMG, Devilliers MA, et al.
265 The Nicotinic Receptor Polymorphism rs16969968 Is Associated with Airway Remodeling and
266 Inflammatory Dysregulation in COPD Patients. *Cells* 2022;11:2937.
267 <https://doi.org/10.3390/cells11192937>.
- 268 [14] Gagliardo R, Bucchieri F, Montalbano AM, Albano GD, Gras D, Fucarino A, et al.
269 Airway epithelial dysfunction and mesenchymal transition in chronic obstructive pulmonary
270 disease: Role of Oct-4. *Life Sci* 2022;288:120177. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120177>.
- 271 [15] Li Y, Drnevich J, Akraiko T, Band M, Li D, Wang F, et al. Gene expression profiling
272 reveals the heterogeneous transcriptional activity of Oct3/4 and its possible interaction with
273 Gli2 in mouse embryonic stem cells. *Genomics* 2013;102:456–67.
274 <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.09.004>.
- 275 [16] Li Q, Lex RK, Chung H, Giovanetti SM, Ji Z, Ji H, et al. The Pluripotency Factor
276 NANOG Binds to GLI Proteins and Represses Hedgehog-mediated Transcription. *J Biol Chem*
277 2016;291:7171–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.714857>.
- 278 [17] Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madisson E, et al.
279 An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med* 2023;29:1563–77.
280 <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02327-2>.

281 **Figures**

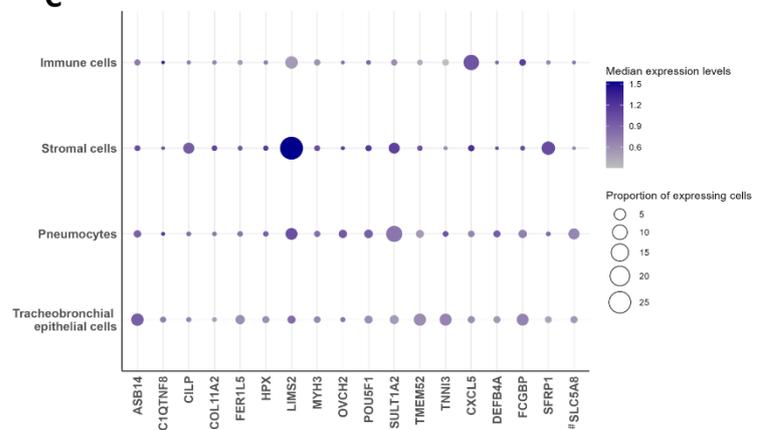
A



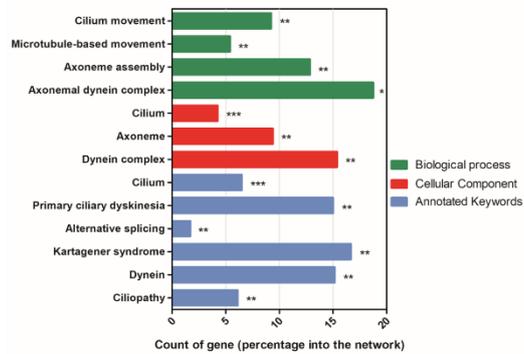
B



C

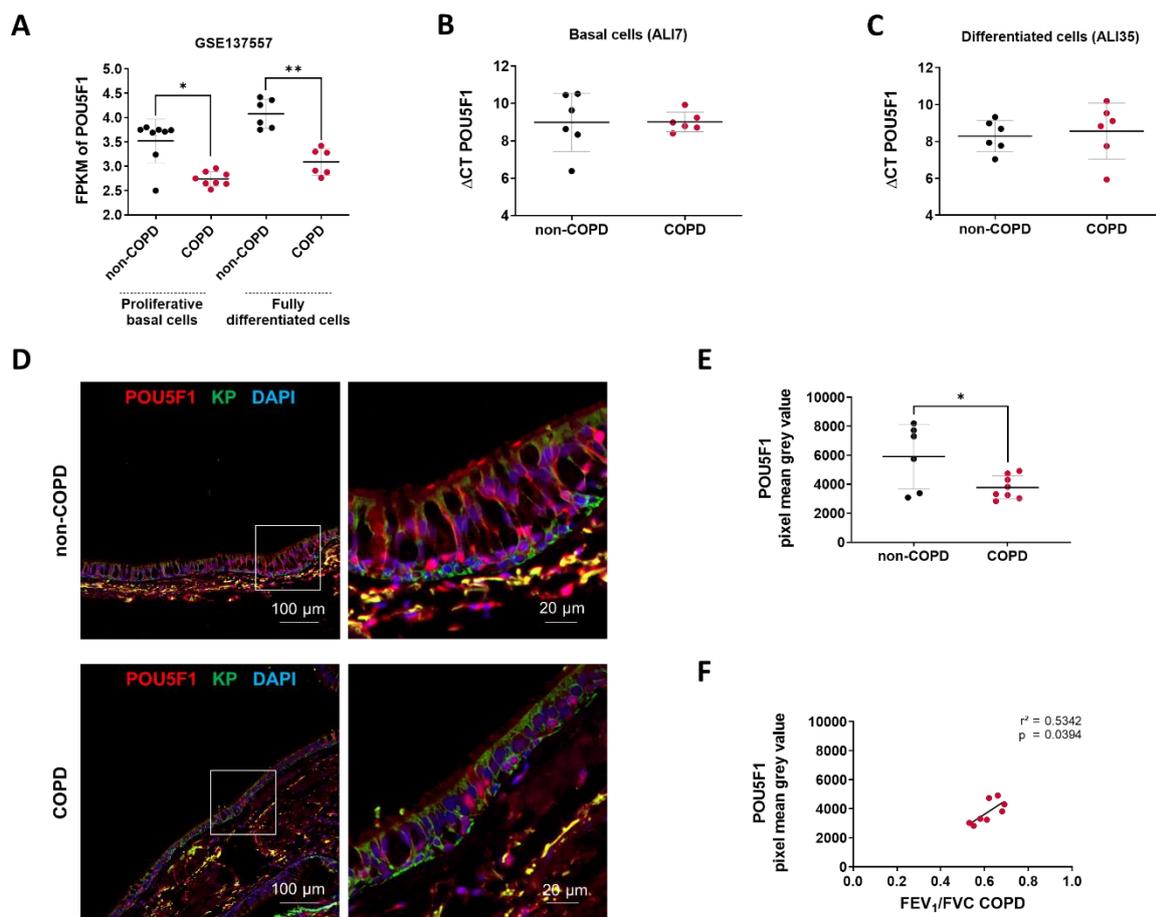


D



282

283 Figure 1: Transcriptomic profiling of AB5E1-treated AEC. (A) Volcano plot showing the gene
284 distribution with the p-value adjusted in the y-axis and log₂ of the fold change between AB5E1-
285 treated and untreated cells in the x-axis. DEG are colour-coded: pink, $\log_2FC = -0.5 < \text{DEG} <$
286 $\log_2FC = 0.5$; blue, downregulated genes with $\log_2FC < -1$; red, upregulated genes with
287 $\log_2FC > 1$; green, DEG corresponding to LOC, LINC, or miRNA with $\log_2FC > 1$. (B) Heatmap
288 of the eighteen most DEG identified in the AB5E1-treated cells transcriptomes. (C) Bubble plot
289 representing cell populations in the y-axis and genes in the y-axis. The size of the dots
290 represents the proportion of expressing cells and the colour intensity represents the median of
291 expression levels. The data were extracted from the full HLCA dataset (except for #, data
292 extracted from the partial HLCA dataset [17]). (D) Histogram representing a count of genes in
293 GO terms (Biological process, cellular component, annotated keywords) for the 371 DEG
294 ($\log_2FC = -0.5 < \text{DEG} < \log_2FC = 0.5$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



295

296 Figure 2: POU5F1 is altered in COPD patients. (A) Dot plot with mean \pm SD showing POU5F1
 297 expression analysis from RNAseq data (GSE137557). The proliferative basal cells (n=8) were
 298 collected for analysis before the air switch and the fully differentiated cells (n=6) were collected
 299 for analysis after 28 days of differentiation. *p<0.05 ; **p<0.01 ; non-COPD vs COPD. FPKM:
 300 Fragments per kilobase million. (B) Dot plot with mean \pm SD showing Δ CT POU5F1 expression
 301 analysis on basal cells and (C) differentiated cells. ALI cultures were performed from isolated
 302 AEC obtained from COPD patients (n=6, red) and non-COPD (n=6, black). ns: non-significant;
 303 non-COPD vs COPD. (D) Representative micrographs showing bronchial epithelia of non-
 304 COPD and COPD patients immunostained for POU5F1 (red), epithelial cytokeratins (KP,
 305 green), and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification corresponding to the selected area is shown.
 306 (E) Dot plot with mean \pm SD representing POU5F1 pixel mean grey values of non-COPD (n=6,
 307 black) and COPD (n=8, red) patients. *p<0.05; non-COPD vs COPD. (F) Linear regression
 308 representing a correlation between POU5F1 pixel mean grey levels and FEV₁/FVC in bronchial
 309 epithelia of COPD patients (n=8).

310 **Supplementary material**311 **Supplementary methods**312 RNA sequencing

313 Total RNA from AEC (**Supplementary Material: Table S2**) was isolated by High Pure RNA
314 isolation kit (Roche Diagnostics). Libraries were prepared with NEBNext Ultra II Directional
315 RNA Library Prep Kit for Illumina protocol according supplier recommendations. Briefly the
316 purification of PolyA containing mRNA molecules was performed with poly-T oligo attached
317 magnetic beads from 1µg total RNA (with the Magnetic mRNA Isolation Kit from NEB), then
318 a fragmentation using divalent cations under elevated temperature was realized to obtain
319 approximately 300bp pieces, double-strand cDNA synthesis, and finally, Illumina adapters
320 ligation and cDNA library amplification were achieved by PCR for sequencing. Sequencing
321 was then carried out on Paired-End 100b reads of Illumina NovaSeq. Image analysis and base
322 calling were performed using Illumina Real Time Analysis (3.4.4) with default parameters.
323 Quality control of raw sequence data was performed using FastQC (version 0.11.5). Head bases
324 were trimmed for adaptor sequences, and low-complexity or low-quality sequences were
325 removed with Trimmomatic (version 0.39). The remaining sequences were mapped to the
326 Homo sapiens hg38 reference genome assembly (hg38.fa) using tophat2 (version 2.1.1) with
327 stringent parameters generating bam format. The quality of alignment was checked using
328 metrics provided by qualimap (version 2.2.1) and low-quality alignments were removed. Raw
329 counts were obtained using htseq-count (version 0.6.1) and normalized using a scaling factor
330 based on median gene expression across the samples and filtered to exclude genes with fewer
331 than 5 counts across the samples. The dataset comprising the 10 BioSamples is deposited in
332 GEO with the accession number GSE262404. Gene expressions of POU5F1 were also collected
333 from datasets publically available online (GEO database: GSE137557). COPD and non-COPD
334 patients were included with the clinical features listed in **Supplementary Material: Table S3**.
335 The analysis was performed on all genes and the differences between the two groups were
336 determined using the Student's t-test and Benjamini-Hochberg FDR correction. The results
337 were shown on a volcano plot with 2-fold upregulated genes in red, and 2-fold downregulated
338 genes in blue. Data were also shown on a heatmap generated by Rstudio.

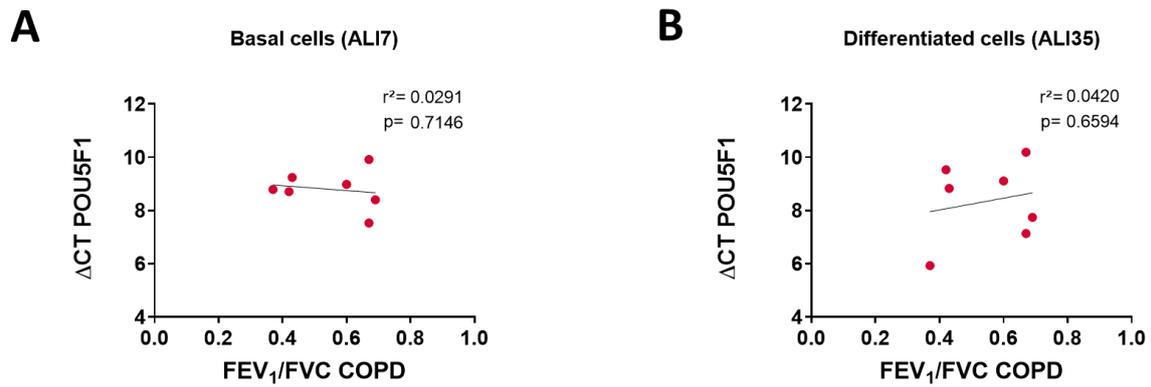
339 RT-qPCR analyses

340 Total RNA from AEC (ALI cultures from bronchial brushings) was isolated by GenElute RNA
341 Plus purification Kit (RDP300, Sigma-Aldrich), and 250 ng were reverse-transcribed into
342 cDNA by Maxima H Minus cDNA Synthesis Master Kit (MAN0016392, Thermo Scientific).
343 Quantitative PCR reactions were performed with Luminaris Probe qPCR Master Kit (K0954,
344 ThermoFisher) and Taqman Gene Expression Assay in a QuantStudio3 instrument (QS3,
345 Thermo Scientific) as recommended by the manufacturer. The primers for POU5F1 were
346 purchased from ThermoFischer Scientific (Hs00999632_g1). The results for POU5F1
347 transcript expressions were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH
348 (Hs02758991_g1) and expressed as Δ CT (COPD vs non-COPD).

349 Single-cell sequencing dataset

350 The published single-cell sequencing (scRNAseq) can be found on the Cellxgene interface with
351 “Sikkema et al.” dataset [17]. Only lung samples (lung and lung parenchyma) from adults (>18
352 years) without respiratory disease (n=181) were considered. Four categories were defined
353 regrouping cell populations as established by the HLCA (Human Lung Cell Atlas) consortium.
354 The categories were identified as: (1) tracheobronchial epithelial cells (40,822 cells): ciliated
355 columnar cell of tracheobronchial tree (25,114 cells), club cell (1,816 cells) and respiratory
356 basal cell (13,892 cells); (2) pneumocytes (123,456 cells): type I pneumocyte (19,418 cells) and
357 type II pneumocyte (104,038 cells); (3) stromal cells (120,988 cells): alveolar type 1 fibroblast
358 cell (21,389 cells), alveolar type 2 fibroblast cell (16,752 cells), bronchus fibroblast of lung
359 (921 cells), capillary endothelial cell (37,538 cells), endothelial cell of lymphatic vessel (8,675
360 cells), lung pericyte (5,157 cells), myofibroblast cell (1,048 cells), pulmonary artery endothelial
361 cell (10,173 cells), tracheobronchial smooth muscle cell (5,222 cells) and vein endothelial cell
362 (14,113 cells); (4) immune cells (408,371 cells): B cell (6,723 cells), CD1c-positive myeloid
363 dendritic cell (10,628 cells), CD4-positive alpha-beta T cell (35,984 cells), CD8-positive alpha-
364 beta T cell (43,839 cells), alveolar macrophage (174,329 cells), classical monocyte (33,862
365 cells), elicited macrophage (39,642 cells), lung macrophage (6,331 cells), mast cell (11,712
366 cells), natural killer cell (30,755 cells) and non-classical monocyte (14,566). The median
367 expression levels and the proportion of expressing cells for HH pathway markers are shown in
368 a bubble plot generated by Rstudio with the ggplot2 package. The UMAP was generated with
369 the CellxGene interface.

370

371 **Supplementary figures**

372

373 Figure S1: POU5F1 transcript level is not correlated with clinical parameters in COPD patients.

374 Linear regressions representing a correlation between POU5F1 transcript levels and FEV₁/FVC

375 in ALI7 (A) and in ALI35 (B) AEC cultures of COPD patients.

376 Table S1: Clinical characteristics of the patients included for FFPE immunostaining and
 377 RTqPCR.

378 Data are expressed as mean±SD, number, or percentage. FEV₁: Forced Expiratory Volume in
 379 1s; FVC: Forced Capacity Capacity. ns: non-significant; **p<0.01; ***p<0.001.

380

	Bronchial brushing		
	Non-COPD	COPD	
Number of subjects	6	6	
Gender F/M	1/5	0/6	ns
Age, years	57.5±14.7	67.5±8.9	ns
Smoking history			ns
Never	0	0	
Former	3	2	
Current	3	4	
Pack-years	30±15.8	59.2±15.5	**
Lung functional parameters			
FEV ₁ % pred	85.3±11.6	49±22.4	**
FEV ₁ /FVC	78.7±4.3	53±14	**
	FFPE tissues		
	Non-COPD	COPD	
Number of subjects	6	8	
Gender F/M	2/4	2/6	ns
Age, years	64.2±5.8	64.3±10.5	ns
Smoking history			ns
Never	1	0	
Former	3	4	
Current	2	4	
Pack-years	45.4±31.4	49.7±19.3	ns
Lung functional parameters			
FEV ₁ % pred	110.3±12.1	70.3±13.8	***
FEV ₁ /FVC	79.3±1.4	61.5±5.9	***

381 Table S2: Clinical characteristics of the patients included for RNAseq analysis upon AB5E1
 382 treatment.

383 Data are expressed as mean±SD, number, or percentage. FEV₁: Forced Expiratory Volume in
 384 1s; FVC: Forced Capacity Capacity

385

	Non-COPD
Number of subjects	5
Gender F/M	3/2
Age, years	57.2±7.16
Smoking history	
Never	1
Former	2
Current	2
Pack-years	20.8±15.45
Lung functional parameters	
FEV ₁ % pred	101.4±21.45
FEV ₁ /FVC	81.4±4.51

386 Table S3: Clinical characteristics of patients from GSE137557.

387 Data are expressed as mean±SD, number, or percentage. FEV₁: Forced Expiratory Volume in
 388 1s; FVC: Forced Capacity Capacity.

389

	GSE137557	
	Non-COPD	COPD
Number of subjects	8	8
Gender F/M	4/4	3/5
Age, years	46.3±15	55.1±7.7
Smoking history		
Never	8	0
Former	0	8
Current	0	0
Pack-years		57.5±39.2
Lung functional parameters		
FEV ₁ % pred	NA	18.6±5.1
FEV ₁ /FVC	NA	NA

390 Table S4: List of significantly deregulated genes in AB5E1-treated AEC.

391 (*Liste tronquée de la table S4 laissant apparaître les 80 premiers gènes les plus dérégulés*)

Genes	BaseMean	Log2FoldChange (AB5E1/CTL)	p-value	Adjusted p-value
CXCL5	2000.546	-1.472	0.0015	0.0220
DEFB4A	73.089	-1.252	0.0007	0.0132
SFRP1	44.402	-1.148	0.0020	0.0270
SLC5A8	404.704	-1.094	0.0007	0.0139
FCGBP	2756.670	-1.031	0.0011	0.0183
CLEC7A	49.198	-0.891	0.0054	0.0483
ABCA12	519.498	-0.891	5.68E-09	4.18E-06
CDH6	731.345	-0.875	0.0011	0.0176
CEACAM5	1314.608	-0.873	7.00E-15	3.27E-11
TMEM178B	176.066	-0.847	1.38E-05	0.0012
ALDH1L2	83.012	-0.831	0.0005	0.0112
MUC21	80.305	-0.830	0.0020	0.0268
PAX8	68.900	-0.824	0.0014	0.0217
ARG2	56.526	-0.795	0.0041	0.0410
RGS7BP	87.079	-0.793	0.0007	0.0137
POMK	54.232	-0.786	0.0036	0.0379
KIAA1211	64.461	-0.764	0.0037	0.0389
NKX3-1	370.072	-0.739	9.54E-05	0.0039
MTNR1A	119.880	-0.726	0.0013	0.0197
ETV5	84.233	-0.724	0.0036	0.0384
GPNMB	732.942	-0.699	3.86E-06	0.0005
C8orf4	645.671	-0.694	3.81E-06	0.0005
ERCC6L2	144.766	-0.691	0.0001	0.0047
KIAA0754	299.748	-0.690	1.33E-06	0.0002
DDI2	184.748	-0.683	1.17E-05	0.0010
CHL1	805.060	-0.679	7.95E-06	0.0008
RASGRP1	83.799	-0.673	0.0035	0.0376
MYEOV	129.610	-0.644	0.0019	0.0261
PCDHAC2	226.713	-0.636	0.0002	0.0061
KMO	154.226	-0.636	0.0047	0.0444
DUSP5	624.312	-0.630	2.08E-06	0.0003
EFCAB4B	550.389	-0.626	3.31E-05	0.0020
CSNK2A3	158.225	-0.605	0.0012	0.0184
LBH	406.220	-0.591	2.92E-05	0.0018
BAALC	176.452	-0.586	0.0010	0.0168
MPV17L	199.960	-0.583	0.0014	0.0210
NLGN4X	231.636	-0.581	0.0008	0.0145
VCAN	903.977	-0.566	2.59E-06	0.0004
ANK1	130.067	-0.565	0.0040	0.0403
C2	319.438	-0.558	2.50E-05	0.0017

LINC00926	79.145	0.848	0.0023	0.0292
MIRLET7BHG	505.684	0.851	4.19E-07	1.05E-04
AGER	423.515	0.855	4.51E-08	2.04E-05
ITGB7	95.082	0.861	6.81E-05	0.0031
LOC100288175	70.844	0.867	0.0007	0.0131
INHA	62.576	0.868	0.0021	0.0278
LOC102723500	122.372	0.878	1.92E-05	0.0014
ASMTL-AS1	602.343	0.880	0.0035	0.0374
TMEM190	522.755	0.886	1.33E-09	1.25E-06
BEST4	191.203	0.897	0.0003	0.0088
LOC101926935	48.170	0.908	0.0023	0.0292
LAT	155.137	0.919	6.46E-06	0.0007
TNFSF14	879.474	0.926	3.78E-17	2.64E-13
DOC2A	1044.181	0.927	0.0002	0.0056
LOC101928055	134.936	0.945	5.43E-06	0.0007
AMH	91.804	0.950	5.31E-05	0.0026
ITIH4	134.773	0.959	2.08E-05	0.0015
LOC101928615	72.169	0.979	0.0009	0.0158
KIAA1875	161.444	0.993	6.15E-06	0.0007
MIR1914	64.259	0.995	0.0007	0.0133
LINC00894	133.783	0.998	8.24E-07	0.0002
LRRC36	54.977	0.999	0.0005	0.0116
CILP	103.814	1.002	3.02E-05	0.0019
HPX	82.798	1.008	0.0010	0.0169
LINC00954	39.490	1.011	0.0029	0.0337
MIR149	46.994	1.023	0.0019	0.0261
POU5F1	89.476	1.049	0.0003	0.0080
LOC400891	407.769	1.064	7.97E-11	1.59E-07
OVCH2	39.207	1.105	0.0013	0.0204
MYH3	69.048	1.120	1.34E-05	0.0012
C1QTNF8	47.197	1.143	0.0035	0.0374
LOC101929379	49.943	1.178	8.50E-05	0.0036
ASB14	53.703	1.196	7.56E-05	0.0033
TMEM52	90.128	1.240	1.63E-06	0.0003
LIMS2	52.830	1.260	0.0005	0.0110
SULT1A2	36.914	1.332	5.57E-05	0.0027
FER1L5	54.604	1.437	3.45E-06	0.0005
COL11A2	37.514	1.467	9.68E-06	0.0009
TNNI3	116.641	1.498	7.11E-11	1.59E-07
LOC100996273	67.920	1.588	1.68E-06	0.0003

DISCUSSION

La BPCO devient la troisième cause de décès dans le monde, ce qui en fait un enjeu de santé publique majeur. Bien que les facteurs de risques soient bien connus et des progrès soient effectués sur le phénotypage/endotypage des patients, leur prise en charge est axée sur les symptômes car il n'existe aucun traitement curatif. L'origine et les mécanismes moléculaires et cellulaires aboutissant à un remodelage bronchique ne sont pas totalement élucidés. Il est donc nécessaire de déchiffrer ces mécanismes afin d'identifier des nouveaux biomarqueurs et des thérapies innovantes. La voie HH semble impliquée dans ce mécanisme. En effet, elle participe à la différenciation des cellules épithéliales et son inhibition entraîne un remodelage épithélial caractérisé par une hyperplasie basale et un défaut de ciliogénèse [207]. Les acteurs principaux de la voie HH sont également dérégulés dans la BPCO, tels que Shh et Gli2 [208]. A ce jour, seul l'impact des éléments principaux de la voie HH sur les cellules épithéliales a été étudié dans le contexte pulmonaire. Toutefois, pour déchiffrer la complexité des mécanismes régulant la signalisation et identifier de nouveaux biomarqueurs, il est nécessaire de prendre en considération l'ensemble des éléments de la voie HH.

L'objectif de la thèse est de mettre en évidence des régulateurs de la voie HH dans le contexte pulmonaire, leur impact sur la signalisation de la voie et leur altération dans la BPCO. Deux approches complémentaires ont été explorées permettant une identification à deux échelles, en amont et en aval de la signalisation.

1. Coréception du ligand et remodelage épithélial : focus sur GPC3

Dans un premier temps, nous avons étudié la signalisation en amont des récepteurs en étudiant le niveau d'expression des éléments principaux (DHH, GLI1, GLI2, GLI3, IHH, PTCH1, SHH et SMO) et des corécepteurs (BOC, CDON, GAS1, GPC1, GPC3, GPC5, GPC6, HHIP et PTCH2) de la voie HH dans les populations cellulaires des voies aériennes par scRNAseq. La faible abondance des éléments principaux dans ces populations a justifié l'intérêt porté aux corécepteurs. Bien que les éléments principaux soient nécessaires pour l'activation de la voie HH, les éléments secondaires sont essentiels pour la sécrétion du ligand et la transmission du signal permettant une régulation fine de la voie [170,225–227].

Parmi les corécepteurs, le GPC3 est le plus exprimé dans les cellules épithéliales trachéobronchiques. Il apparaît donc comme un élément crucial dans l'homéostasie épithéliale pulmonaire, suscitant un intérêt dans le contexte de la BPCO. Une diminution du niveau d'expression du GPC3 est observée chez les patients BPCO et dans les cultures de cellules différenciées provenant de patients BPCO sévères. Nous avons démontré que le niveau de transcrite du GPC3 est corrélé à un déclin de la fonction respiratoire. L'hétérogénéité de la sévérité des patients BPCO peut se dessiner à travers le niveau d'expression des corécepteurs de la voie HH. Au niveau tissulaire, le GPC3 est localisé dans les cellules différenciées avec une diminution chez les patients BPCO.

La voie HH étant exprimée au cours de la différenciation des cellules épithéliales, nous avons modulé la signalisation du GPC3 pendant la différenciation à l'aide d'un anticorps, le Codrituzumab, développé pour le traitement du cancer hépatocellulaire. Il stimule le système immunitaire en créant un pont entre GPC3 et CD16 présents sur les cellules natural killer. Il semble être efficace sur les patients avec un fort taux de GPC3 et de CD16 [228]. Nous avons montré pour la première fois que l'inhibition de la signalisation du GPC3 par le Codrituzumab influence la voie HH en début de différenciation, sans interférer avec la voie Wnt. Le blocage du GPC3 induit un défaut de ciliogénèse et de l'équilibre Muc5ac/Muc5b, caractéristique du remodelage épithélial observé dans la BPCO. La diminution de Muc5b est un élément important dans le dysfonctionnement de la défense de l'épithélium comme le démontre les souris Muc5b^{-/-} plus sensibles aux infections et présentant une clairance mucociliaire altérée [229]. Ces données sont en cohérence avec nos résultats précédents, indiquant que l'altération de la voie HH chez les patients BPCO peut en partie être expliquée par la diminution du corécepteur GPC3, réduisant l'activation de la signalisation médiée par Shh [207,208].

Le GPC3 est un protéoglycane à chaînes héparanes sulfate pouvant se lier à la membrane cellulaire par une ancre GPI. Il peut subir un clivage dans son domaine extracellulaire par une convertase formant deux fragments reliés par des ponts disulfures et accueillant divers substrats [230]. Le GPC3 est impliqué dans divers processus cellulaires, tels que la prolifération et l'apoptose. Il est dérégulé dans de nombreux cancers, notamment les carcinomes hépatocellulaires, le cancer du sein ou du poumon, induisant une transition épithélio-mésenchymateuse [231–233]. Il est un corécepteur membranaire liant Shh et pouvant le libérer dans le milieu extracellulaire ou le présenter à un autre récepteur.

L'impact du GPC3 sur la signalisation de la voie HH semble être dépendant du contexte. Des études menées sur des modèles de souris GPC3^{-/-} ont démontré l'inhibition de la voie HH par la fixation du ligand Shh sur le GPC3, agissant en compétition avec le récepteur Ptch1 et induisant l'endocytose du ligand [185,234]. Nos résultats sont en concordance avec une étude montrant une diminution des facteurs de transcription Gli1 et Gli2 dans le cil primaire de fibroblastes embryonnaires murins GPC3^{-/-}, témoignant de la nécessité de la fixation de Shh sur les chaînes héparanes sulfates du GPC3 [235]. Notre étude est la première à montrer l'impact du GPC3 sur la voie HH dans le contexte pulmonaire et sur des cellules épithéliales humaines.

2. Altération transcriptomique lors de l'inhibition de la voie HH au cours de la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes : focus sur POU5F1

Dans un second temps, nous avons identifié des acteurs moléculaires impactés par l'inhibition de la voie HH en début de différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes. L'analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence une liste de gènes pouvant être partiellement impliqués dans le remodelage épithélial induit par l'inhibition de la voie HH, notamment dans le défaut de ciliogénèse, comme le démontre l'analyse des termes GO. Étant donné l'altération de différenciation impliquant la voie HH, nous avons choisi de concentrer nos recherches sur un gène impliqué dans ce processus, POU5F1, également appelé Oct3/4, faisant partie des 18 gènes les plus dérégulés. Nous avons étudié POU5F1 dans le contexte de la BPCO. Nous avons démontré que le niveau d'expression de POU5F1 ne diffère pas chez les patients BPCO modérés. Toutefois, une diminution est observée chez les patients BPCO très sévères en début et fin de différenciation, témoignant d'une hétérogénéité de transcription de POU5F1 en fonction de la sévérité de la pathologie. Au niveau tissulaire, nous observons une diminution de la localisation de POU5F1, corrélée à un déclin de la fonction respiratoire. Une étude sur des biopsies bronchiques de patients BPCO a montré une diminution de POU5F1 chez les patients BPCO fumeurs et ex-fumeurs en comparaison aux patients BPCO non-fumeurs [236]. Nos résultats confirment l'impact sur la pathologie mais montrent une indépendance sur la composante tabagique.

POU5F1 (Oct3/4) est un facteur de transcription exprimé dès les stades précoces embryonnaires et pouvant se lier à un motif octamérique de plus de 1000 promoteurs [237,238]. Il forme un complexe avec Sox2 ou Sox15 et régule de nombreux gènes impliqués dans le développement embryonnaire [239]. Selon les contextes, il a un double rôle dans le maintien de la pluripotence des cellules souches ou dans leur différenciation vers un tissu spécifique en fonction de sa concentration [240]. De plus, il est dérégulé dans de nombreux cancers, tels que le cancer du sein, de la vessie ou du poumon, induisant la transition épithélio-mésenchymateuse [241–243]. L'augmentation des transcrits de POU5F1 lors du traitement AB5E1 en début de différenciation suggère que l'activation de la voie HH régule le passage de la prolifération à la différenciation cellulaire partiellement par POU5F1. En effet, des études menées sur des cellules souches embryonnaires de souris ont montré que l'inhibition de POU5F1 stimule la différenciation des cellules alors que la suractivation de la voie HH induit la prolifération cellulaire [244]. De plus, la transfection de POU5F1 entraîne la diminution de la voie HH témoignant bien d'une corrélation avec la voie de signalisation [245].

Cette approche expérimentale a également permis de mettre en évidence de potentielles cibles transcriptomiques de la voie Shh non décrites jusqu'à présent. CXCL5 et DEFB4A sont diminués lors de l'inhibition de la voie HH alors que CLEC7A est augmenté. Les résultats mettent donc en évidence une modulation du système immunitaire induite par la voie HH. Il a été démontré une augmentation de CXCL5 dans le LBA et dans le sérum de patients BPCO [246]. Il existe également une diminution de DEFB4A dans l'épithélium bronchique de patients fumeurs atteints de BPCO [247].

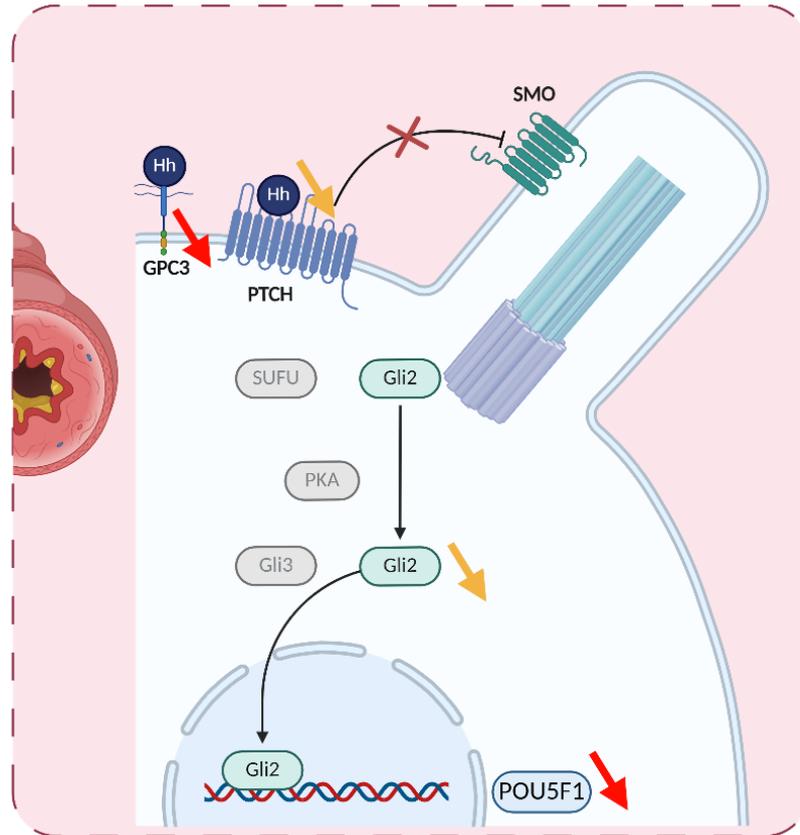


Figure 26 : Schéma bilan de GPC3 et POU5F1 régulant la voie HH dans la BPCO

Glis : Glioma-associated oncogen / GPC3 : Glypican 3 / PKA : Protein Kinase A / Ptch1 : Patched-1 / Shh : Sonic hedgehog / Smo : Smoothened / SuFu : Suppressor of Fused protein

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

1. Perspectives de l'étude

Nos résultats se concentrant sur deux nouveaux régulateurs de la voie HH dans le contexte pulmonaire, nous pouvons élargir ces recherches par différentes perspectives afin d'affiner la compréhension de la mécanistique de la voie HH dans le contexte pulmonaire.

1.1. Investigations complémentaires sur GPC3 et POU5F1

Des investigations complémentaires sur GPC3 et POU5F1 pourraient être réalisées afin de déchiffrer les mécanismes sous-jacents de ces protéines. Les niveaux protéiques de POU5F1 et GPC3 ont été évalués par la localisation des protéines dans l'épithélium bronchique. Toutefois, une étude approfondie des niveaux protéiques pourra être réalisée par Western Blot. Les niveaux transcriptomiques de ces gènes n'étant pas différents chez les patients BPCO et non-BPCO, nous pourrions étudier le niveau d'activité des voies de signalisation en réalisant un test de gène rapporteur avec la luciférase en exploitant les modulateurs pharmacologiques, tels que l'agoniste SAG et les anticorps bloquants (AB5E1, Codrituzumab).

Nous avons montré que le GPC3 régule positivement l'activation de la voie HH. Un rétro-contrôle permettant la régulation du GPC3 par la voie HH peut être étudié. Nous pourrions réaliser une stimulation de la voie HH par le SAG ou une inhibition par l'anticorps AB5E1 et observer l'effet sur le GPC3 par immunomarquages fluorescents en analysant la localisation du GPC3 dans les cellules en cours de différenciation. Des RT-qPCR peuvent également être réalisées pour mesurer le niveau d'expression du GPC3 en contexte d'inhibition ou d'activation de la voie HH.

POU5F1 est exprimé dans les cellules non différenciées et semble réguler la différenciation cellulaire, il peut être important d'étudier la corrélation de son niveau d'expression avec des données de remodelage ou encore de moduler son expression lors de la différenciation des cellules épithéliales *in vitro* pour effectuer différents marquages, notamment Arl13b pour la surface ciliée, p63 pour les cellules basales, ki67 pour étudier la prolifération ou encore Muc5ac/Muc5b pour étudier la différenciation en cellules sécrétrices. Etant donné que POU5F1 régule le renouvellement et la différenciation cellulaire, nous pourrions observer un défaut de ciliogénèse et du nombre de cellules sécrétrices, ainsi qu'une modulation de l'index de prolifération.

Enfin, toutes nos données ont été obtenues par l'analyse de l'épithélium bronchique des patients. Etant donné que la BPCO est une pathologie affectant également les petites voies aériennes et le parenchyme pulmonaire, il sera intéressant d'explorer ces deux régulateurs dans l'épithélium bronchiolaire, dans les alvéoles mais également dans d'autres populations cellulaires telles que les fibroblastes. Nous pourrions cultiver des fibroblastes avec des traitements tels que le Codrituzumab ou l'anticorps AB5E1 afin d'observer leur impact sur le GPC3 et sur la voie HH par immunomarquages fluorescents de Arl13b, Gli2 et des mucines.

1.2. Vers un atlas complet de la voie HH dans le poumon adulte

GPC3 et POU5F1 semblent impliqués dans la régulation de la voie HH et dans le remodelage épithélial caractéristique de la BPCO. Cependant, il s'agit d'une infime partie de la signalisation de la voie HH. Les corécepteurs pouvant agir en synergie, il peut être intéressant d'étudier d'autres protéines de la même famille, comme les GPC5/6 ou d'autres corécepteurs, tels que CDON ou HHIP, étant déjà associés avec le risque de BPCO par SNPs. De plus, la réalisation d'un atlas comprenant la localisation des différents éléments de la voie HH, les éléments principaux et secondaires (BOC, CDON, DISP1, GAS1, GAS8, GPC1, GPC3, GPC5, GPC6, GPR161, HHAT, HHIP, KIF7, PTCH2, SCUBE2 et SUFU), le long des voies aériennes est en cours de réalisation afin de déterminer les populations cellulaires nécessaires à la sécrétion du ligand et/ou à la réception du signal (**Figure 27**). L'atlas pourrait également être réalisé dans le développement pulmonaire humain afin de déterminer l'expression des différents acteurs dans le développement et dans l'homéostasie pulmonaire.

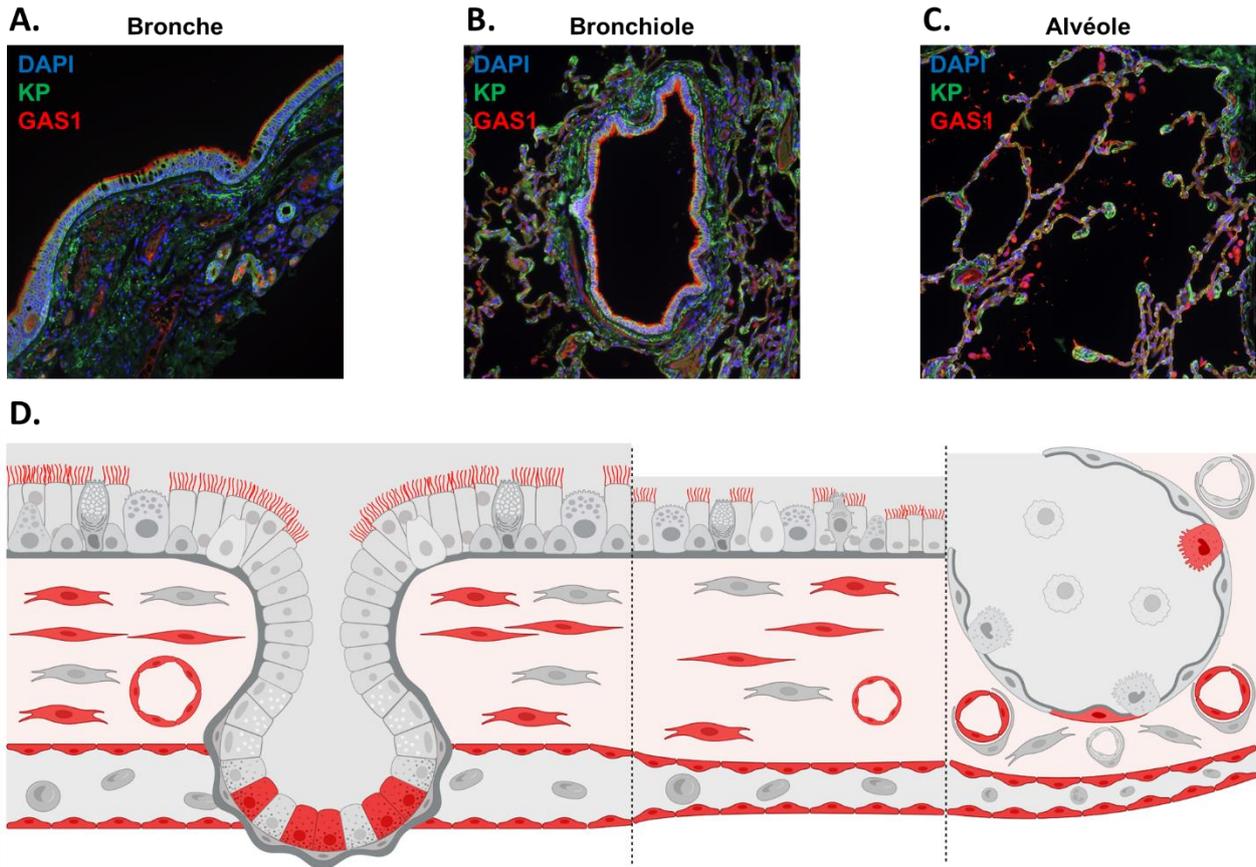


Figure 27 : Exemples de localisation de GAS1, corécepteur de la voie HH

(A, B, C) Exemples d'acquisition microscopique de tissus pulmonaires (bronche, bronchiole, alvéole) de patients non-BPCO montrant GAS1 (rouge), cytokératine (vert) et DAPI (bleu). (D) Schéma de l'arbre respiratoire montrant la localisation de GAS1 dans les populations cellulaires pulmonaires.

1.3. Altération spécifique de la structure/signalisation ciliaire en lien avec la modulation de la voie HH

La voie canonique de la signalisation HH est en lien étroit avec le cil. Nous avons effectué une analyse protéomique comparative centrée sur cet organite entre les cellules traitées ou non avec AB5E1. En effet, un protocole d'isolement des cils est mis au point au laboratoire afin d'isoler les axonèmes des cellules en IAL après 35 jours de différenciation. Des résultats préliminaires obtenus après traitement de 24h en fin de différenciation sur 8 cultures en IAL réalisées à partir de polypes nasaux ne mettent pas en évidence de protéines différenciellement abondantes dans les deux conditions.

En se concentrant sur les protéines présentes dans au moins 5 polypes d'une condition et présentes dans moins de 2 polypes de l'autre condition, nous observons quelques différences. En effet, 20 protéines sont présentes uniquement dans les cellules non traitées (PHLP1, DPM1, CATL1, ODP, SYN1, GSTM2, EAA2, UCRI, AT1A2, GPM6A, CCAR2, F184A, FUBP2, AJUBA, MLXIP, OSTC, SAE1, PCYOX, NPTN, CMTA1) et 27 protéines sont présentes uniquement dans les cellules traitées avec AB5E1 (PIRC2, KRIT1, HPT, VTDB, PPBT, VATC1, RD23B, ABCE1, PLEC, ELOC, STPG1, MARC1, TPGS2, EFC12, CXL17, MUC20, TEX9, B3GN7, GIPC2, COLA1, STRBP, NJMU, IL1AP, BIN3, PLS4, HMGX4, TGRM1) (**Figure 28**). L'augmentation de la durée du traitement pourrait être pertinente pour observer une différence dans l'organite. De plus, certaines protéines, telles que les tubulines, étant régulées par des modifications post-traductionnelles, l'analyse de ces modifications comme l'acétylation, pourrait être un facteur important dans le fonctionnement ciliaire. Enfin, la voie de signalisation HH étant intrinsèquement liée au cil primaire, l'isolement des cils primaires en début de différenciation pourrait montrer des différences protéiques en cas d'inhibition de la voie HH.

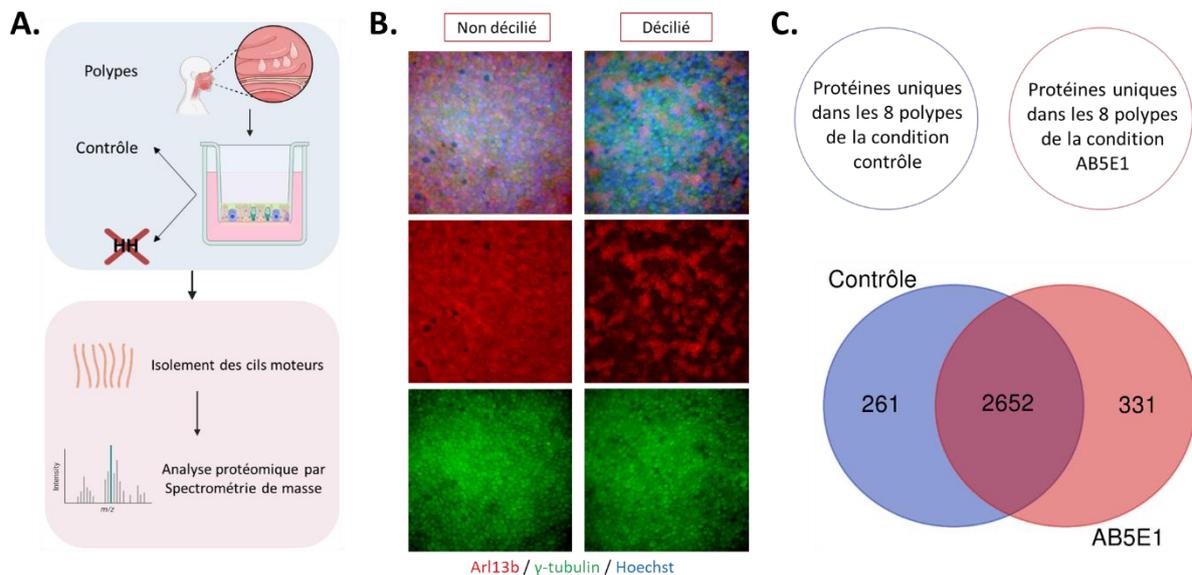


Figure 28 : Analyse protéomique de l'inhibition de la voie HH

(A) Design expérimental de l'analyse protéomique réalisée sur les cils moteurs. (B) Validation de l'isolement des cils moteurs par immunomarquages fluorescents montrant les cils (Arl13b, rouge), les centrioles (γ -tubuline, vert) et les noyaux (DAPI, bleu). (C) Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines uniques présentes uniquement dans la condition contrôle, dans la condition AB5E1 ou dans les deux conditions.

1.4. Etude fonctionnelle de l'implication de la voie HH sur le remodelage

Le bon fonctionnement de la clairance mucociliaire est dépendant des flux ioniques. Etant donné que la fréquence de battement ciliaire est diminuée chez les patients BPCO, il pourrait être intéressant d'explorer un lien entre l'altération de la voie HH et la composition ionique des cils et de l'espace périciliaire. Après un traitement des cellules épithéliales avec AB5E1 en fin de différenciation sur 8 cultures en IAL réalisées à partir de polypes nasaux, nous avons réalisé une cryofixation à haute pression (URCATech PICT, HPF, Leica EM ICE) des cultures cellulaires permettant de conserver la structure et la composition ionique. Une analyse en spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie est en cours de réalisation à l'aide d'un microscope électronique (JEOL 2100F, 200kV) équipé d'un détecteur (JEOL JED 2300) dans différents compartiments cellulaires, tels que le cil, les compartiments périciliaires et subciliaires (**Figure 29**).

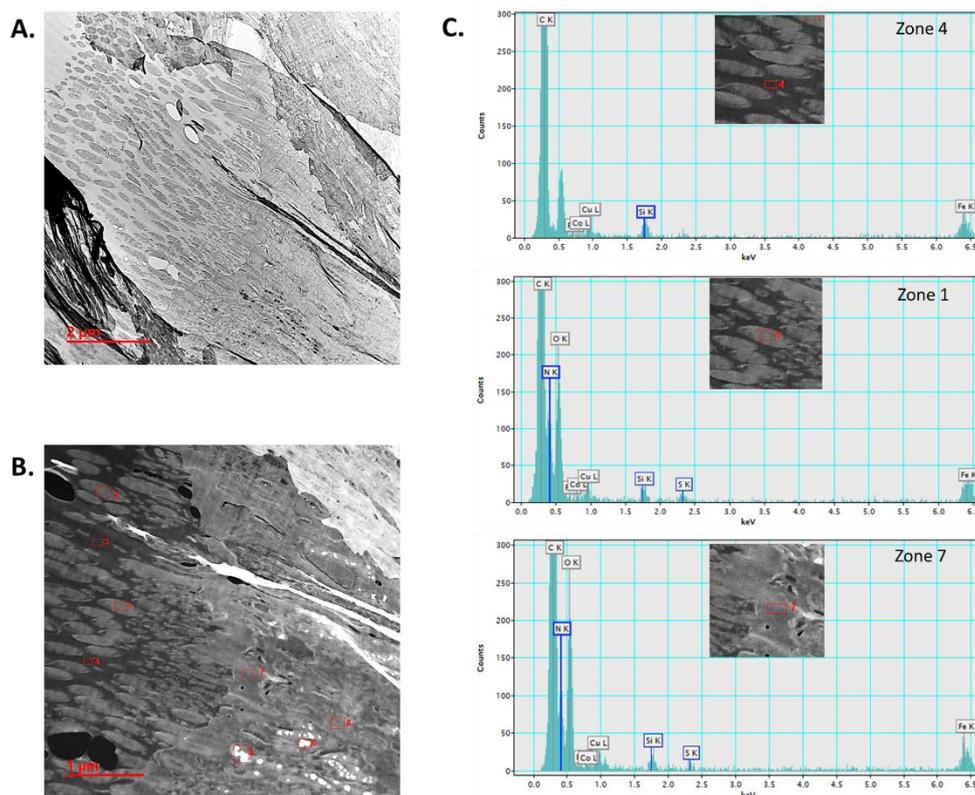


Figure 29 : Analyses structurales et ioniques des cils dans un contexte d'inhibition de la voie HH

(A, B) Exemples d'acquisition au microscope électronique de cultures cellulaires en interface air-liquide après 35 jours de différenciation. (C) Analyses spectrales des différents ions dans les cils, dans le compartiment périciliaire et dans la cellule.

2. Conclusions

Cette étude montre pour la première fois l'importance des éléments secondaires de la voie HH dans le contexte pulmonaire. Les deux stratégies expérimentales complémentaires permettent une meilleure compréhension des mécanismes impliquant la voie HH par l'identification de nouveaux régulateurs altérés dans la BPCO. POU5F1 et GPC3 semblent impliqués dans le remodelage épithélial induit par la voie HH dans la BPCO. Des études complémentaires permettront de déterminer la place de ces deux éléments dans le diagnostic, le pronostic et l'établissement d'une thérapeutique innovante.

BIBLIOGRAPHIE

-
- [1] Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res* 2017;367:427–44. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2545-0>.
- [2] Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 1977;116:705–77. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.705>.
- [3] Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J Clin Invest* 2012;122:2724–30. <https://doi.org/10.1172/JCI60519>.
- [4] Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SFP, Sin DD. The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther Adv Respir Dis* 2011;5:255–73. <https://doi.org/10.1177/1753465810396539>.
- [5] Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madisson E, et al. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med* 2023;29:1563–77. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02327-2>.
- [6] Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 2020;587:619–25. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2922-4>.
- [7] Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:2000–6. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.9707011>.
- [8] Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:12771–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906850106>.
- [9] Warner SMB, Hackett T-L, Shaheen F, Hallstrand TS, Kicic A, Stick SM, et al. Transcription Factor p63 Regulates Key Genes and Wound Repair in Human Airway Epithelial Basal Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:978–88. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0447OC>.
- [10] Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell SH, et al. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C171–181. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00226.2003>.
- [11] Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L643–9. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00155.2003>.

- [12] Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel M-J, et al. Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Dev Camb Engl* 2019;146:dev177428. <https://doi.org/10.1242/dev.177428>.
- [13] Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BL. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2011;8:639–48. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.003>.
- [14] You Y, Huang T, Richer EJ, Schmidt J-EH, Zabner J, Borok Z, et al. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L650-657. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00170.2003>.
- [15] Ishikawa T. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:a028076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028076>.
- [16] Workman AD, Cohen NA. The effect of drugs and other compounds on the ciliary beat frequency of human respiratory epithelium. *Am J Rhinol Allergy* 2014;28:454–64. <https://doi.org/10.2500/ajra.2014.28.4092>.
- [17] Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:a028241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>.
- [18] Groneberg DA, Eynott PR, Oates T, Lim S, Wu R, Carlstedt I, et al. Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med* 2002;96:81–6. <https://doi.org/10.1053/rmed.2001.1221>.
- [19] Rokicki W, Rokicki M, Wojtacha J, Dželjijli A. The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochirurgia Torakochirurgia Pol Pol J Cardio-Thorac Surg* 2016;13:26–30. <https://doi.org/10.5114/kitp.2016.58961>.
- [20] Dierynck I, Bernard A, Roels H, De Ley M. Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein CC16. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:205–10. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.12.2.7865218>.
- [21] Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, et al. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* 2009;4:525–34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.04.002>.
- [22] Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, Stripp BR. Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:9286–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900668106>.

- [23] Wine JJ, Joo NS. Submucosal Glands and Airway Defense. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:47–53. <https://doi.org/10.1513/pats.2306015>.
- [24] Lynch TJ, Anderson PJ, Rotti PG, Tyler SR, Crooke AK, Choi SH, et al. Submucosal Gland Myoepithelial Cells Are Reserve Stem Cells That Can Regenerate Mouse Tracheal Epithelium. *Cell Stem Cell* 2018;22:653. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.017>.
- [25] Tata A, Kobayashi Y, Chow RD-W, Tran J, Desai A, Massri AJ, et al. Myoepithelial cells of submucosal glands can function as reserve stem cells to regenerate airways after injury. *Cell Stem Cell* 2018;22:668–683.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.018>.
- [26] Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket S, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 2018;560:319–24. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0393-7>.
- [27] Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 2018;560:377–81. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0394-6>.
- [28] Boers JE, den Brok JL, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FB. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:758–63. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810616>.
- [29] Noguchi M, Furukawa KT, Morimoto M. Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease. *Dis Model Mech* 2020;13:dmm046920. <https://doi.org/10.1242/dmm.046920>.
- [30] Branchfield K, Nantie L, Verheyden JM, Sui P, Wienhold MD, Sun X. Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science* 2016;351:707–10. <https://doi.org/10.1126/science.aad7969>.
- [31] Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:2568–73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009>.
- [32] Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell Number and Cell Characteristics of the Normal Human Lung. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:332–7. <https://doi.org/10.1164/arrd.1982.126.2.332>.
- [33] Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:426–44. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/136.2.426>.
- [34] Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12:765–74. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR>.

- [35] Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;93:472–83. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(88\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0041-008x(88)90051-8).
- [36] Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G. Transformation of alveolar Type 2 cells to Type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 1975;22:142–50. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(75\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0014-4800(75)90059-3).
- [37] Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annu Rev Physiol* 2013;75:551–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183809>.
- [38] Nawijn MC, Hackett TL, Postma DS, van Oosterhout AJM, Heijink IH. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol* 2011;32:248–55. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.03.004>.
- [39] Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol* 2013;23:537–46. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.004>.
- [40] Koval M. Sharing signals: connecting lung epithelial cells with gap junction channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L875–893. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00078.2002>.
- [41] Adam D, Perotin J-M, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. [Regeneration of airway epithelium]. *Rev Mal Respir* 2014;31:300–11. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.11.001>.
- [42] Erjefält JS, Sundler F, Persson CGA. Epithelial barrier formation by airway basal cells. *Thorax* 1997;52:213–7. <https://doi.org/10.1136/thx.52.3.213>.
- [43] Button B, Cai L-H, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* 2012;337:937–41. <https://doi.org/10.1126/science.1223012>.
- [44] Tarran R. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:42–6. <https://doi.org/10.1513/pats.2306014>.
- [45] Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86:245–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2005>.
- [46] Chilvers M, O’Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 2000;55:314–7. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.4.314>.
- [47] Agustí A, Celli BR, Criner GJ, Halpin D, Anzueto A, Barnes P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD Executive Summary. *Eur Respir J* 2023;61:2300239. <https://doi.org/10.1183/13993003.00239-2023>.

- [48] MacNee W. Is Chronic Obstructive Pulmonary Disease an Accelerated Aging Disease? *Ann Am Thorac Soc* 2016;13 Suppl 5:S429–37. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201602-124AW>.
- [49] Ho T, Cusack RP, Chaudhary N, Satia I, Kurmi OP. Under- and over-diagnosis of COPD: a global perspective. *Breathe* 2019;15:24–35. <https://doi.org/10.1183/20734735.0346-2018>.
- [50] Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth* 2015;90:121–7. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.08.017>.
- [51] Borgerding M, Klus H. Analysis of complex mixtures--cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Toxikol Pathol* 2005;57 Suppl 1:43–73. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.010>.
- [52] Murray LA, Dunmore R, Camelo A, Da Silva CA, Gustavsson MJ, Habel DM, et al. Acute cigarette smoke exposure activates apoptotic and inflammatory programs but a second stimulus is required to induce epithelial to mesenchymal transition in COPD epithelium. *Respir Res* 2017;18:82. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0565-2>.
- [53] Bigot P, Chesseron S, Saidi A, Sizaret D, Parent C, Petit-Courty A, et al. Cleavage of Occludin by Cigarette Smoke-Elicited Cathepsin S Increases Permeability of Lung Epithelial Cells. *Antioxid Basel Switz* 2022;12:5. <https://doi.org/10.3390/antiox12010005>.
- [54] Simet SM, Sisson JH, Pavlik JA, Devasure JM, Boyer C, Liu X, et al. Long-term cigarette smoke exposure in a mouse model of ciliated epithelial cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;43:635–40. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0297OC>.
- [55] Brekman A, Walters MS, Tilley AE, Crystal RG. FOXJ1 prevents cilia growth inhibition by cigarette smoke in human airway epithelium in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:688–700. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0363OC>.
- [56] Chun LF, Moazed F, Calfee CS, Matthay MA, Gotts JE. Pulmonary toxicity of e-cigarettes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017;313:L193–206. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00071.2017>.
- [57] Jordan RE, Cheng KK, Miller MR, Adab P. Passive smoking and chronic obstructive pulmonary disease: cross-sectional analysis of data from the Health Survey for England. *BMJ Open* 2011;1:e000153. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2011-000153>.
- [58] Hooper LG, Young MT, Keller JP, Szpiro AA, O'Brien KM, Sandler DP, et al. Ambient air pollution and chronic bronchitis in a cohort of U.S. Women. *Environ Health Perspect* 2018;126. <https://doi.org/10.1289/EHP2199>.

- [59] Doiron D, Bourbeau J, De Hoogh K, Hansell AL. Ambient air pollution exposure and chronic bronchitis in the Lifelines cohort. *Thorax* 2021;76:772–9. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216142>.
- [60] Ristovski ZD, Miljevic B, Surawski NC, Morawska L, Fong KM, Goh F, et al. Respiratory health effects of diesel particulate matter. *Respirology* 2012;17:201–12. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.02109.x>.
- [61] Vaughan A, Stevanovic S, Jafari M, Bowman RV, Fong KM, Ristovski ZD, et al. Primary human bronchial epithelial cell responses to diesel and biodiesel emissions at an air-liquid interface. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 2019;57:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.005>.
- [62] Siddharthan T, Grigsby MR, Goodman D, Chowdhury M, Rubinstein A, Irazola V, et al. Association between household air pollution exposure and chronic obstructive pulmonary disease outcomes in 13 low- and middle-income country settings. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:611–20. <https://doi.org/10.1164/rccm.201709-1861OC>.
- [63] Chan KH, Kurmi OP, Bennett DA, Yang L, Chen Y, Tan Y, et al. Solid fuel use and risks of respiratory diseases: A cohort study of 280,000 Chinese never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:352–61. <https://doi.org/10.1164/rccm.201803-0432OC>.
- [64] Syamlal G, Doney B, Mazurek JM. Chronic obstructive pulmonary disease prevalence among adults who have never smoked, by industry and occupation — United States, 2013–2017. *Morb Mortal Wkly Rep* 2019;68:303–7. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM6813A2>.
- [65] Matteis SD, Jarvis D, Darnton A, Hutchings S, Sadhra S, Fishwick D, et al. The occupations at increased risk of COPD: analysis of lifetime job-histories in the population-based UK Biobank Cohort. *Eur Respir J* 2019;54. <https://doi.org/10.1183/13993003.00186-2019>.
- [66] Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, et al. A Genome-Wide Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two Major Susceptibility Loci. *PLoS Genet* 2009;5:e1000421. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000421>.
- [67] Pillai SG, Kong X, Edwards LD, Cho MH, Anderson WH, Coxson HO, et al. Loci identified by genome-wide association studies influence different disease-related phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1498–505. <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0151OC>.

- [68] Cho MH, Boutaoui N, Klanderman BJ, Sylvia JS, Ziniti JP, Hersh CP, et al. Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Genet* 2010;42:200–2. <https://doi.org/10.1038/ng.535>.
- [69] Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Rennard SI, Crystal RG. Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest* 1981;68:889–98.
- [70] Molloy K, Hersh CP, Morris VB, Carroll TP, O'Connor CA, Lasky-Su JA, et al. Clarification of the risk of chronic obstructive pulmonary disease in α 1-antitrypsin deficiency PiMZ heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:419–27. <https://doi.org/10.1164/rccm.201311-1984OC>.
- [71] Routhier J, Pons S, Freidja ML, Dalstein V, Cutrona J, Jonquet A, et al. An innate contribution of human nicotinic receptor polymorphisms to COPD-like lesions. *Nat Commun* 2021;12:6384. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26637-6>.
- [72] Diabasana Z, Perotin J-M, Belgacemi R, Ancel J, Mulette P, Launois C, et al. Chr15q25 Genetic Variant rs16969968 Alters Cell Differentiation in Respiratory Epithelia. *Int J Mol Sci* 2021;22:6657. <https://doi.org/10.3390/ijms22136657>.
- [73] Saber Cherif L, Diabasana Z, Perotin J-M, Ancel J, Petit LMG, Devilliers MA, et al. The Nicotinic Receptor Polymorphism rs16969968 Is Associated with Airway Remodeling and Inflammatory Dysregulation in COPD Patients. *Cells* 2022;11:2937. <https://doi.org/10.3390/cells11192937>.
- [74] Duan P, Wang Y, Lin R, Zeng Y, Chen C, Yang L, et al. Impact of early life exposures on COPD in adulthood: A systematic review and meta-analysis. *Respirol Carlton Vic* 2021;26:1131–51. <https://doi.org/10.1111/resp.14144>.
- [75] Broström EB, Akre O, Katz-Salamon M, Jaraj D, Kaijser M. Obstructive pulmonary disease in old age among individuals born preterm. *Eur J Epidemiol* 2013;28:79–85. <https://doi.org/10.1007/s10654-013-9761-7>.
- [76] Magnus MC, Henderson J, Tilling K, Howe LD, Fraser A. Independent and combined associations of maternal and own smoking with adult lung function and COPD. *Int J Epidemiol* 2018;47:1855–64. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy221>.
- [77] Frith PA. Detecting COPD using micro-spirometry and/or questionnaire. *Respirol Carlton Vic* 2020;25:126–7. <https://doi.org/10.1111/resp.13636>.
- [78] Tantucci C, Modina D. Lung function decline in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7:95–9. <https://doi.org/10.2147/COPD.S27480>.

- [79] Hoffman EA, Lynch DA, Barr RG, van Beek EJR, Parraga G, IWPFI Investigators. Pulmonary CT and MRI phenotypes that help explain chronic pulmonary obstruction disease pathophysiology and outcomes. *J Magn Reson Imaging JMRI* 2016;43:544–57. <https://doi.org/10.1002/jmri.25010>.
- [80] Ni Y, Yu Y, Dai R, Shi G. Diffusing capacity in chronic obstructive pulmonary disease assessment: A meta-analysis. *Chron Respir Dis* 2021;18:14799731211056340. <https://doi.org/10.1177/14799731211056340>.
- [81] Tashkin DP. Smoking Cessation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36:491–507. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1555610>.
- [82] Stefan MS, Pekow PS, Priya A, ZuWallack R, Spitzer KA, Lagu TC, et al. Association between Initiation of Pulmonary Rehabilitation and Rehospitalizations in Patients Hospitalized with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* n.d.;204:1015–23. <https://doi.org/10.1164/rccm.202012-4389OC>.
- [83] Uronis HE, Ekström MP, Currow DC, McCrory DC, Samsa GP, Abernethy AP. Oxygen for relief of dyspnoea in people with chronic obstructive pulmonary disease who would not qualify for home oxygen: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2015;70:492–4. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205720>.
- [84] Simon S, Joann O, Welte T, Rademacher J. The role of vaccination in COPD: influenza, SARS-CoV-2, pneumococcus, pertussis, RSV and varicella zoster virus. *Eur Respir Rev* 2023;32. <https://doi.org/10.1183/16000617.0034-2023>.
- [85] Oba Y, Keeney E, Ghatehorde N, Dias S. Dual combination therapy versus long-acting bronchodilators alone for chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;12:CD012620. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012620.pub2>.
- [86] Singh D, Papi A, Corradi M, Pavlišová I, Montagna I, Francisco C, et al. Single inhaler triple therapy versus inhaled corticosteroid plus long-acting β 2-agonist therapy for chronic obstructive pulmonary disease (TRILOGY): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2016;388:963–73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31354-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31354-X).
- [87] Yamasaki K, Eeden SF van. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. *Int J Mol Sci* 2018;19:582. <https://doi.org/10.3390/ijms19020582>.

- [88] Hikichi M, Mizumura K, Maruoka S, Gon Y. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke. *J Thorac Dis* 2019;11:S2129–40. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.10.43>.
- [89] King TE Jr, Savici D, Campbell PA. Phagocytosis and Killing of *Listeria monocytogenes* by Alveolar Macrophages: Smokers Versus Nonsmokers. *J Infect Dis* 1988;158:1309–16. <https://doi.org/10.1093/infdis/158.6.1309>.
- [90] Schaberg T, Klein U, Rau M, Eller J, Lode H. Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and nonsmokers: relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1551–8. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735614>.
- [91] Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, et al. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 1997;18:1763–6. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.9.1763>.
- [92] Rahman I, van Schadewijk AAM, Crowther AJL, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:490–5. <https://doi.org/10.1164/rccm.2110101>.
- [93] Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem* 2019;294:19683–708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>.
- [94] Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* 2018;25:101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>.
- [95] Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:796–802. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1605OC>.
- [96] Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, Detry BR, Bouzin C, Chevronay HG, et al. Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition. *Eur Respir J* 2015;45:1258–72. <https://doi.org/10.1183/09031936.00135814>.
- [97] Harju T, Kinnula VL, Pääkkö P, Salmenkivi K, Risteli J, Kaarteenaho R. Variability in the precursor proteins of collagen I and III in different stages of COPD. *Respir Res* 2010;11:165. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-165>.

- [98] Calabrese C, Bocchino V, Vatrella A, Marzo C, Guarino C, Mascitti S, et al. Evidence of angiogenesis in bronchial biopsies of smokers with and without airway obstruction. *Respir Med* 2006;100:1415–22. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.11.009>.
- [99] Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Mooi WJ, Sterk PJ, Alagappan VKT, de Boer WI, et al. Enhanced Bronchial Expression of Extracellular Matrix Proteins in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Clin Pathol* 2006;126:725–35. <https://doi.org/10.1309/JC477FAEL1YKV54W>.
- [100] Yan F, Gao H, Zhao H, Bhatia M, Zeng Y. Roles of airway smooth muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *J Transl Med* 2018;16:262. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1635-z>.
- [101] Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, et al. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:877–92. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0500-x>.
- [102] Heijink IH, Noordhoek JA, Timens W, van Oosterhout AJM, Postma DS. Abnormalities in Airway Epithelial Junction Formation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:1439–42. <https://doi.org/10.1164/rccm.201311-1982LE>.
- [103] Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines. *Mol Biol Cell* 2002;13:3218–34. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-03-0134>.
- [104] Yeo N-K, Jang YJ. Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *The Laryngoscope* 2010;120:346–52. <https://doi.org/10.1002/lary.20764>.
- [105] Soltani A, Muller HK, Sohal SS, Reid DW, Weston S, Wood-Baker R, et al. Distinctive characteristics of bronchial reticular basement membrane and vessel remodelling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and in asthma: they are not the same disease. *Histopathology* 2012;60:964–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04147.x>.
- [106] Crystal RG. Airway Basal Cells. The “Smoking Gun” of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1355–62. <https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1492PP>.
- [107] Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, et al. Goblet Cell Hyperplasia and Epithelial Inflammation in Peripheral Airways of Smokers with Both

- Symptoms of Chronic Bronchitis and Chronic Airflow Limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1016–21. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.3.9907080>.
- [108] Caramori G, Casolari P, Di Gregorio C, Saetta M, Baraldo S, Boschetto P, et al. MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology* 2009;55:321–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2009.03377.x>.
- [109] Radicioni G, Ceppe A, Ford AA, Alexis NE, Barr RG, Bleecker ER, et al. Airway mucin MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort. *Lancet Respir Med* 2021;9:1241–54. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00079-5).
- [110] Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, et al. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. *FASEB J* 2012;26:533–45. <https://doi.org/10.1096/fj.11-192377>.
- [111] Plotnikova OV, Pugacheva EN, Golemis EA. Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol* 2009;94:137–60. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)94007-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94007-3).
- [112] Belgacemi R, Diabasana Z, Hoarau A, Dubernard X, Mérol J-C, Riaux C, et al. Primary ciliogenesis is a crucial step for multiciliated cell determinism in the respiratory epithelium. *J Cell Mol Med* 2021;25:7575–9. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16729>.
- [113] Perotin J-M, Coraux C, Lagonotte E, Birembaut P, Delepine G, Polette M, et al. Alteration of primary cilia in COPD. *Eur Respir J* 2018;52. <https://doi.org/10.1183/13993003.00122-2018>.
- [114] Ancel J, Belgacemi R, Diabasana Z, Perotin J-M, Bonnomet A, Dewolf M, et al. Impaired Ciliary Beat Frequency and Ciliogenesis Alteration during Airway Epithelial Cell Differentiation in COPD. *Diagn Basel Switz* 2021;11:1579. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091579>.
- [115] Perotin J-M, Polette M, Deslée G, Dormoy V. CiliOPD: a ciliopathy-associated COPD endotype. *Respir Res* 2021;22:74. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01665-4>.
- [116] Bangs F, Anderson KV. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:a028175. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028175>.
- [117] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980;287:795–801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>.

- [118] Chen Y, Struhl G. Dual Roles for Patched in Sequestering and Transducing Hedgehog. *Cell* 1996;87:553–63. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81374-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81374-4).
- [119] Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW. Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* 1996;10:2003–13. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.2003>.
- [120] Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996;6:298–304. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00480-3).
- [121] Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, et al. Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 1999;23:713–24. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)80030-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)80030-1).
- [122] Sharghi-Namini S, Turmaine M, Meier C, Sahni V, Umehara F, Jessen KR, et al. The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2006;26:6364–76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0157-06.2006>.
- [123] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999;13:2072–86.
- [124] Karp SJ, Schipani E, St-Jacques* B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via Parathyroid Hormone related-Protein-dependent and -independent pathways. *Development* 2000;127:543–8. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.543>.
- [125] Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, Garber EA, Rayhorn P, Bumcrot D, et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev* 2001;106:107–17. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00427-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00427-0).
- [126] Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, et al. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 1995;374:363–6. <https://doi.org/10.1038/374363a0>.
- [127] Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* 1996. <https://doi.org/10.1126/science.274.5285.255>.

- [128] Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, et al. Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog*. *J Biol Chem* 1998;273:14037–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.14037>.
- [129] Buglino JA, Resh MD. Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem* 2008;283:22076–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803901200>.
- [130] Koleva MV, Rothery S, Spitaler M, Neil MAA, Magee AI. Sonic hedgehog multimerization: A self-organizing event driven by post-translational modifications? *Mol Membr Biol* 2015;32:65–74. <https://doi.org/10.3109/09687688.2015.1066895>.
- [131] Peters C, Wolf A, Wagner M, Kuhlmann J, Waldmann H. The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:8531–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308449101>.
- [132] Tian H, Jeong J, Harfe BD, Tabin CJ, McMahon AP. Mouse *Disp1* is required in sonic hedgehog-expressing cells for paracrine activity of the cholesterol-modified ligand. *Development* 2005;132:133–42. <https://doi.org/10.1242/dev.01563>.
- [133] Tukachinsky H, Kuzmickas RP, Jao CY, Liu J, Salic A. Dispatched and Scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Rep* 2012;2:308–20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.010>.
- [134] Zeng X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ, Schreiner CM, Robbins DJ. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 2001;411:716–20. <https://doi.org/10.1038/35079648>.
- [135] Chen M-H, Li Y-J, Kawakami T, Xu S-M, Chuang P-T. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 2004;18:641–59. <https://doi.org/10.1101/gad.1185804>.
- [136] Goetz JA, Singh S, Suber LM, Kull FJ, Robbins DJ. A highly conserved amino-terminal region of sonic hedgehog is required for the formation of its freely diffusible multimeric form. *J Biol Chem* 2006;281:4087–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511427200>.
- [137] Palm W, Swierczynska MM, Kumari V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Eaton S. Secretion and signaling activities of lipoprotein-associated hedgehog and non-sterol-modified hedgehog in flies and mammals. *PLoS Biol* 2013;11:e1001505. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001505>.

- [138] Vyas N, Goswami D, Manonmani A, Sharma P, Ranganath HA, VijayRaghavan K, et al. Nanoscale Organization of Hedgehog Is Essential for Long-Range Signaling. *Cell* 2008;133:1214–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.026>.
- [139] Sanders TA, Llagostera E, Barna M. Specialized filopodia direct long-range transport of Shh during vertebrate tissue patterning. *Nature* 2013;497:628–32. <https://doi.org/10.1038/nature12157>.
- [140] Martínez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, et al. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 2006;108:3012–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-019109>.
- [141] Tsai M-T, Cheng C-J, Lin Y-C, Chen C-C, Wu A-R, Wu M-T, et al. Isolation and characterization of a secreted, cell-surface glycoprotein SCUBE2 from humans. *Biochem J* 2009;422:119–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20090341>.
- [142] Creanga A, Glenn TD, Mann RK, Saunders AM, Talbot WS, Beachy PA. Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form. *Genes Dev* 2012;26:1312–25. <https://doi.org/10.1101/gad.191866.112>.
- [143] Petrov K, Wierbowski BM, Liu J, Salic A. Distinct Cation Gradients Power Cholesterol Transport at Different Key Points in the Hedgehog Signaling Pathway. *Dev Cell* 2020;55:314–327.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.08.002>.
- [144] Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 1996;384:129–34. <https://doi.org/10.1038/384129a0>.
- [145] Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 1996;384:176–9. <https://doi.org/10.1038/384176a0>.
- [146] Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, et al. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13630–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13630>.
- [147] Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J* 2004;378:325–34. <https://doi.org/10.1042/BJ20031200>.
- [148] Alfaro AC, Roberts B, Kwong L, Bijlsma MF, Roelink H. Ptch2 mediates the Shh response in *Ptch1*^{-/-} cells. *Dev Camb Engl* 2014;141:3331–9. <https://doi.org/10.1242/dev.110056>.

- [149] Fleet AJ, Hamel PA. The protein-specific activities of the transmembrane modules of Ptch1 and Ptch2 are determined by their adjacent protein domains. *J Biol Chem* 2018;293:16583–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004478>.
- [150] Nedelcu D, Liu J, Xu Y, Jao C, Salic A. Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* 2013;9:557–64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1290>.
- [151] Nachtergaele S, Whalen DM, Mydock LK, Zhao Z, Malinauskas T, Krishnan K, et al. Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *eLife* 2013;2:e01340. <https://doi.org/10.7554/eLife.01340>.
- [152] Byrne EFX, Sircar R, Miller PS, Hedger G, Luchetti G, Nachtergaele S, et al. Structural basis for Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature* 2016;535:517–22. <https://doi.org/10.1038/nature18934>.
- [153] Huang P, Nedelcu D, Watanabe M, Jao C, Kim Y, Liu J, et al. Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell* 2016;166:1176–1187.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.003>.
- [154] Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 1988;332:371–4. <https://doi.org/10.1038/332371a0>.
- [155] Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* 1990;10:634–42.
- [156] Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 2002;129:4753–61. <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4753>.
- [157] Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science* 2007;317:372–6. <https://doi.org/10.1126/science.1139740>.
- [158] Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 2002;418:892–6. <https://doi.org/10.1038/nature00989>.
- [159] Zhang Y, Bulkley DP, Xin Y, Roberts KJ, Asarnow DE, Sharma A, et al. Structural Basis for Cholesterol Transport-like Activity of the Hedgehog Receptor Patched. *Cell* 2018;175:1352–1364.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.026>.
- [160] Bidet M, Joubert O, Lacombe B, Ciantar M, Nehmé R, Mollat P, et al. The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One* 2011;6:e23834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023834>.

- [161] Luchetti G, Sircar R, Kong JH, Nachtergaele S, Sagner A, Byrne EF, et al. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *eLife* 2016;5:e20304. <https://doi.org/10.7554/eLife.20304>.
- [162] Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, Loktev A, Rangell L, Scales SJ, et al. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell* 2013;152:210–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.026>.
- [163] Liu YC, Couzens AL, Deshwar AR, McBroom-Cerajewski LDB, Zhang X, Puvion-Randall V, et al. The PPF1A1-PP2A protein complex promotes trafficking of Kif7 to the ciliary tip and Hedgehog signaling. *Sci Signal* 2014. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005608>.
- [164] Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev* 2010;24:670–82. <https://doi.org/10.1101/gad.1902910>.
- [165] Tukachinsky H, Lopez LV, Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu–Gli protein complexes. *J Cell Biol* 2010;191:415–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004108>.
- [166] Bhatia N, Thiyagarajan S, Elcheva I, Saleem M, Dlugosz A, Mukhtar H, et al. Gli2 Is Targeted for Ubiquitination and Degradation by β -TrCP Ubiquitin Ligase*. *J Biol Chem* 2006;281:19320–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513203200>.
- [167] Tempé D, Casas M, Karaz S, Blanchet-Tournier M-F, Concordet J-P. Multisite Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase 3 β Phosphorylation Leads to Gli3 Ubiquitination by SCF β TrCP. *Mol Cell Biol* 2006;26:4316–26. <https://doi.org/10.1128/MCB.02183-05>.
- [168] Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev* 2007;21:1244–57. <https://doi.org/10.1101/gad.1543607>.
- [169] Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang J-S, Charron F, et al. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell* 2011;20:775–87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.018>.
- [170] Wierbowski BM, Petrov K, Aravena L, Gu G, Xu Y, Salic A. Hedgehog Pathway Activation Requires Coreceptor-Catalyzed, Lipid-Dependent Relay of the Sonic Hedgehog Ligand. *Dev Cell* 2020;55:450–467.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.017>.

- [171] Capurro M, Izumikawa T, Suarez P, Shi W, Cydzik M, Kaneiwa T, et al. Glypican-6 promotes the growth of developing long bones by stimulating Hedgehog signaling. *J Cell Biol* 2017;216:2911–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605119>.
- [172] Yue S, Tang L-Y, Tang Y, Tang Y, Shen Q-H, Ding J, et al. Requirement of Smurf-mediated endocytosis of Patched1 in sonic hedgehog signal reception. *eLife* 2014;3. <https://doi.org/10.7554/eLife.02555>.
- [173] Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol* 2009;187:365–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907126>.
- [174] Chen Y, Sasai N, Ma G, Yue T, Jia J, Briscoe J, et al. Sonic Hedgehog dependent phosphorylation by CK1 α and GRK2 is required for ciliary accumulation and activation of smoothed. *PLoS Biol* 2011;9:e1001083. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001083>.
- [175] Ma G, Li S, Han Y, Li S, Yue T, Wang B, et al. Regulation of Smoothed Trafficking and Hedgehog Signaling by the SUMO Pathway. *Dev Cell* 2016;39:438–51. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.014>.
- [176] Kovacs JJ, Whalen EJ, Liu R, Xiao K, Kim J, Chen M, et al. β -arrestin mediated localization of Smoothed to the primary cilium. *Science* 2008;320:1777–81. <https://doi.org/10.1126/science.1157983>.
- [177] Evron T, Philipp M, Lu J, Meloni AR, Burkhalter M, Chen W, et al. Growth Arrest Specific 8 (Gas8) and G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) cooperate in the control of Smoothed signaling. *J Biol Chem* 2011;286:27676–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234666>.
- [178] Pal K, Hwang S, Somatilaka B, Badgandi H, Jackson PK, DeFea K, et al. Smoothed determines β -arrestin-mediated removal of the G protein-coupled receptor Gpr161 from the primary cilium. *J Cell Biol* 2016;212:861–75. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506132>.
- [179] Yang C, Chen W, Chen Y, Jiang J. Smoothed transduces Hedgehog signal by forming a complex with Evc/Evc2. *Cell Res* 2012;22:1593–604. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.134>.
- [180] Yue S, Chen Y, Cheng SY. Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 2009;28:492–9. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.403>.

- [181] Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog Promotes G1 Cyclin Expression and Sustained Cell Cycle Progression in Mammalian Neuronal Precursors. *Mol Cell Biol* 2000;20:9055–67.
- [182] Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Dev Camb Engl* 2003;130:15–28. <https://doi.org/10.1242/dev.00182>.
- [183] Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, et al. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res* 2004;64:7724–31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1085>.
- [184] Holtz AM, Griffiths SC, Davis SJ, Bishop B, Siebold C, Allen BL. Secreted HHIP1 interacts with heparan sulfate and regulates Hedgehog ligand localization and function. *J Cell Biol* 2015;209:739–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411024>.
- [185] Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell* 2008;14:700–11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.006>.
- [186] Zhang M, Wang H, Teng H, Shi J, Zhang Y. Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung. *Histochem Cell Biol* 2010;134:327–35. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0738-2>.
- [187] Belgacemi R, Danopoulos S, Deutsch G, Glass I, Dormoy V, Bellusci S, et al. Hedgehog Signaling Pathway Orchestrates Human Lung Branching Morphogenesis. *Int J Mol Sci* 2022;23:5265. <https://doi.org/10.3390/ijms23095265>.
- [188] Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BLM. Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 1997;124:4867–78. <https://doi.org/10.1242/dev.124.23.4867>.
- [189] Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 1998;20:58–61. <https://doi.org/10.1038/1717>.
- [190] Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 1998;20:54–7. <https://doi.org/10.1038/1711>.
- [191] Grindley JC, Bellusci S, Perkins D, Hogan BL. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol* 1997;188:337–48. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8644>.

- [192] Wang C, Mochel NSR de, Christenson SA, Cassandras M, Moon R, Brumwell AN, et al. Expansion of hedgehog disrupts mesenchymal identity and induces emphysema phenotype. *J Clin Invest* 2018;128:4343–58. <https://doi.org/10.1172/JCI99435>.
- [193] Peng T, Frank DB, Kadzik RS, Morley MP, Rathi KS, Wang T, et al. Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature* 2015;526:578–82. <https://doi.org/10.1038/nature14984>.
- [194] Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996;85:841–51. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81268-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81268-4).
- [195] Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996;272:1668–71. <https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1668>.
- [196] Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui C, Mainprize TG, Zhang X, et al. Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31:306–10. <https://doi.org/10.1038/ng916>.
- [197] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003;422:313–7. <https://doi.org/10.1038/nature01493>.
- [198] Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng H-HK, Jin JQ, et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res CR* 2014;33:34. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-34>.
- [199] Szczepny A, Rogers S, Jayasekara WSN, Park K, McCloy RA, Cochrane CR, et al. The role of canonical and non-canonical Hedgehog signaling in tumor progression in a mouse model of small cell lung cancer. *Oncogene* 2017;36:5544–50. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.173>.
- [200] Xu C, Zou C, Hussain M, Shi W, Shao Y, Jiang Z, et al. High expression of sonic hedgehog in allergic airway epithelia contributes to goblet cell metaplasia. *Mucosal Immunol* 2018;11:1306–15. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0033-4>.
- [201] Yáñez DC, Lau C-I, Chawda MM, Ross S, Furmanski AL, Crompton T. Hedgehog signaling promotes TH2 differentiation in naive human CD4 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:1419-1423.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.011>.

- [202] Furmanski AL, Saldana JI, Ono M, Sahni H, Paschalidis N, D'Acquisto F, et al. Tissue-Derived Hedgehog Proteins Modulate Th Differentiation and Disease. *J Immunol* 2013;190:2641–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202541>.
- [203] Tam A, Osei ET, Cheung CY, Hughes M, Yang CX, McNagny KM, et al. Hedgehog Signaling as a Therapeutic Target for Airway Remodeling and Inflammation in Allergic Asthma. *Cells* 2022;11:3016. <https://doi.org/10.3390/cells11193016>.
- [204] Wilk JB, Chen T-H, Gottlieb DJ, Walter RE, Nagle MW, Brandler BJ, et al. A genome-wide association study of pulmonary function measures in the Framingham Heart Study. *PLoS Genet* 2009;5:e1000429. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000429>.
- [205] Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marciante KD, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet* 2010;42:45–52. <https://doi.org/10.1038/ng.500>.
- [206] Lahmar Z, Bergougnoux A, Bourdin A. The HHIP gene: from a candidate to an established participant in COPD susceptibility. *eBioMedicine* 2024;102:105059. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105059>.
- [207] Belgacemi R, Luczka E, Ancel J, Diabasana Z, Perotin J-M, Germain A, et al. Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. *EBioMedicine* 2019;51:102572. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.033>.
- [208] Ancel J, Belgacemi R, Perotin J-M, Diabasana Z, Dury S, Dewolf M, et al. Sonic hedgehog signalling as a potential endobronchial biomarker in COPD. *Respir Res* 2020;21:207. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01478-x>.
- [209] Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-Mediated Inhibition of Target Tissue Response to Shh Signaling. *Science* 1998;280:1603–7. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1603>.
- [210] Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Dev Camb Engl* 1998;125:3553–62. <https://doi.org/10.1242/dev.125.18.3553>.
- [211] Peluso MO, Campbell VT, Harari JA, Tibbitts TT, Proctor JL, Whitebread N, et al. Impact of the Smoothed inhibitor, IPI-926, on smoothed ciliary localization and Hedgehog pathway activity. *PloS One* 2014;9:e90534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090534>.
- [212] Lee MJ, Hatton BA, Villavicencio EH, Khanna PC, Friedman SD, Ditzler S, et al. Hedgehog pathway inhibitor saridegib (IPI-926) increases lifespan in a mouse

- medulloblastoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7859–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114718109>.
- [213] Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* 2010;17:388–99. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.02.027>.
- [214] Azaro A, Massard C, Tap WD, Cassier PA, Merchan J, Italiano A, et al. A phase 1b study of the Notch inhibitor crenigacestat (LY3039478) in combination with other anticancer target agents (taladegib, LY3023414, or abemaciclib) in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Invest New Drugs* 2021;39:1089–98. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01094-6>.
- [215] Bendell J, Andre V, Ho A, Kudchadkar R, Migden M, Infante J, et al. Phase I Study of LY2940680, a Smo Antagonist, in Patients with Advanced Cancer Including Treatment-Naïve and Previously Treated Basal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2018;24:2082–91. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0723>.
- [216] Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012;366:2171–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113713>.
- [217] Sekulic A, Migden MR, Basset-Seguín N, Garbe C, Gesierich A, Lao CD, et al. Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC Cancer* 2017;17:332. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3286-5>.
- [218] Migden MR, Guminski A, Gutzmer R, Dirix L, Lewis KD, Combemale P, et al. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:716–28. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70100-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70100-2).
- [219] Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, Fiedler W, Smith BD, Robak T, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2019;33:379–89. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0312-9>.
- [220] Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8455–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609699104>.
- [221] Kim J, Aftab BT, Tang JY, Kim D, Lee AH, Rezaee M, et al. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired

- resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell* 2013;23:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.017>.
- [222] Maun HR, Wen X, Lingel A, de Sauvage FJ, Lazarus RA, Scales SJ, et al. Hedgehog Pathway Antagonist 5E1 Binds Hedgehog at the Pseudo-active Site. *J Biol Chem* 2010;285:26570–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112284>.
- [223] Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Herlihy KM, et al. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 2009;5:154–6. <https://doi.org/10.1038/nchembio.142>.
- [224] Nakano K, Orita T, Nezu J, Yoshino T, Ohizumi I, Sugimoto M, et al. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:279–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.033>.
- [225] Petrov K, Wierbowski BM, Salic A. Sending and Receiving Hedgehog Signals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2017;33:145–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060847>.
- [226] Svärd J, Henricson KH, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström Å, et al. Genetic Elimination of Suppressor of Fused Reveals an Essential Repressor Function in the Mammalian Hedgehog Signaling Pathway. *Dev Cell* 2006;10:187–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.013>.
- [227] Petrova E, Rios-Esteves J, Ouerfelli O, Glickman JF, Resh MD. Inhibitors of Hedgehog acyltransferase block Sonic Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* 2013;9:247–9. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1184>.
- [228] Chen G, Chen Y-C, Reis B, Belousov A, Jukofsky L, Rossin C, et al. Combining expression of GPC3 in tumors and CD16 on NK cells from peripheral blood to identify patients responding to codrituzumab. *Oncotarget* 2018;9:10436–44. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23830>.
- [229] Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014;505:412–6. <https://doi.org/10.1038/nature12807>.
- [230] De Cat B, Muyldermans S-Y, Coomans C, Degeest G, Vanderschueren B, Creemers J, et al. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *J Cell Biol* 2003;163:625–35. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302152>.

- [231] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89–97. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00689-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00689-9).
- [232] Alshammari FO, Satari AO, Aljabali AS, Al-mahdy YS, Alabdallat YJ, Al-sarayra YM, et al. Glypican-3 Differentiates Intraductal Carcinoma and Paget’s Disease from Other Types of Breast Cancer. *Medicina (Mex)* 2023;59:86. <https://doi.org/10.3390/medicina59010086>.
- [233] Ning J, Jiang S, Li X, Wang Y, Deng X, Zhang Z, et al. GPC3 affects the prognosis of lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. *BMC Pulm Med* 2021;21:199. <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01549-9>.
- [234] Capurro M, Shi W, Izumikawa T, Kitagawa H, Filmus J. Processing by Convertases Is Required for Glypican-3-induced Inhibition of Hedgehog Signaling*. *J Biol Chem* 2015;290:7576–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612705>.
- [235] Liu YC, Wierbowski BM, Salic A. Hedgehog pathway modulation by glypican 3-conjugated heparan sulfate. *J Cell Sci* 2022;135:jcs259297. <https://doi.org/10.1242/jcs.259297>.
- [236] Gagliardo R, Bucchieri F, Montalbano AM, Albano GD, Gras D, Fucarino A, et al. Airway epithelial dysfunction and mesenchymal transition in chronic obstructive pulmonary disease: Role of Oct-4. *Life Sci* 2022;288:120177. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120177>.
- [237] Jin VX, O’Geen H, Iyengar S, Green R, Farnham PJ. Identification of an OCT4 and SRY regulatory module using integrated computational and experimental genomics approaches. *Genome Res* 2007;17:807–17. <https://doi.org/10.1101/gr.6006107>.
- [238] Mathur D, Danford TW, Boyer LA, Young RA, Gifford DK, Jaenisch R. Analysis of the mouse embryonic stem cell regulatory networks obtained by ChIP-chip and ChIP-PET. *Genome Biol* 2008;9:R126. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r126>.
- [239] Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95:379–91. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81769-9).
- [240] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372–6. <https://doi.org/10.1038/74199>.

- [241] Zhao F-Q, Misra Y, Li D-B, Wadsworth MP, Krag D, Weaver D, et al. Differential expression of Oct3/4 in human breast cancer and normal tissues. *Int J Oncol* 2018;52:2069–78. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4341>.
- [242] Chang C-C, Shieh G-S, Wu P, Lin C-C, Shiau A-L, Wu C-L. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:6281–91. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0094>.
- [243] Karoubi G, Gugger M, Schmid R, Dutly A. OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;8:393–7. <https://doi.org/10.1510/icvts.2008.193995>.
- [244] Li Y, Drnevich J, Akraiko T, Band M, Li D, Wang F, et al. Gene expression profiling reveals the heterogeneous transcriptional activity of Oct3/4 and its possible interaction with Gli2 in mouse embryonic stem cells. *Genomics* 2013;102:456–67. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.09.004>.
- [245] Li Q, Lex RK, Chung H, Giovanetti SM, Ji Z, Ji H, et al. The Pluripotency Factor NANOG Binds to GLI Proteins and Represses Hedgehog-mediated Transcription. *J Biol Chem* 2016;291:7171–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.714857>.
- [246] Chen J, Dai L, Wang T, He J, Wang Y, Wen F. The elevated CXCL5 levels in circulation are associated with lung function decline in COPD patients and cigarette smoking-induced mouse model of COPD. *Ann Med* n.d.;51:314–29. <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1639809>.
- [247] Pace E, Ferraro M, Minervini MI, Vitulo P, Pipitone L, Chiappara G, et al. Beta Defensin-2 Is Reduced in Central but Not in Distal Airways of Smoker COPD Patients. *PLoS ONE* 2012;7:e33601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033601>.

**SERMENT
DOCTORAL
D'INTÉGRITÉ
SCIENTIFIQUE**

« En présence de mes pairs.

Parvenue à l'issue de mon doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »

Identification et caractérisation de nouveaux régulateurs de la voie Hedgehog dans l'homéostasie pulmonaire et la BPCO

La voie Hedgehog (HH) est impliquée dans le développement et le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Elle est altérée dans de nombreuses pathologies respiratoires, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les éléments principaux de la voie HH, Gli2, Shh et Smo, sont diminués chez les patients BPCO. Son inhibition entraîne un remodelage épithélial caractéristique de la BPCO. Etant donné que seuls les éléments principaux ont été étudiés dans le contexte pulmonaire, nous avons exploré des éléments secondaires pouvant être impliqués dans le remodelage épithélial.

Deux stratégies expérimentales complémentaires ont identifié deux éléments altérés dans la BPCO. D'une part, l'étude des corécepteurs de la voie HH a démontré que le niveau d'expression du Glypican 3 (GPC3) est corrélé au déclin de la fonction respiratoire chez les patients BPCO. La localisation du GPC3 est diminuée chez les patients BPCO. *In vitro*, l'inhibition du GPC3 entraîne une diminution de l'activation de la voie HH et un remodelage de l'épithélium, caractérisé par un défaut de ciliogénèse et de production de mucines. D'autre part, l'étude transcriptomique de l'inhibition de la voie HH au cours de la différenciation a mis en évidence POU5F1 comme un acteur moléculaire corrélé à la voie HH. Sa localisation est diminuée chez les patients BPCO, en association avec un déclin de la fonction respiratoire.

Cette étude montre pour la première fois l'importance des éléments secondaires de la voie HH dans le contexte pulmonaire. L'identification de ces nouveaux éléments altérés dans la BPCO permet une meilleure compréhension des mécanismes impliquant la voie HH dans cette pathologie.

Mots clés : BPCO, voie Hedgehog, cellules épithéliales des voies aériennes, GPC3, POU5F1

Identification and characterisation of novel Hedgehog pathway regulators in pulmonary homeostasis and COPD

Hedgehog (HH) pathway is involved in the development and maintenance of pulmonary homeostasis. It is altered in many respiratory diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The core elements of the HH pathway, Gli2, Shh, and Smo are decreased in COPD patients. HH pathway inhibition leads to epithelial remodelling, a hallmark of COPD. Since only the core elements were studied in the pulmonary context, we explored the secondary elements that may be involved in airway epithelial remodelling.

Two complementary experimental strategies identified two altered elements in the COPD context. On the one hand, the study of HH co-receptors showed that the expression level of Glypican-3 (GPC3) is correlated with the decline of respiratory function in COPD patients. The localisation of GPC3 is decreased in COPD patients. *In vitro*, GPC3 inhibition induced a decrease of the HH pathway activation and epithelial remodelling, characterised by a defect of ciliogenesis and mucin production. On the other hand, a transcriptomic study of HH pathway inhibition during airway epithelial cell differentiation unveiled POU5F1 as a molecular actor intertwined with the HH pathway. Its localisation was decreased in COPD patients, and associated with a decrease in pulmonary function.

This study demonstrates for the first time the importance of HH secondary elements in the pulmonary context. The identification of these novel altered elements in COPD patients allows deciphering additional mechanisms involving the HH pathway in this disease.

Keywords: COPD, Hedgehog pathway, airway epithelial cells, GPC3, POU5F1

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 Cognac-Jay, CHU maison Blanche,
51092 Reims CEDEX

