

Table des matières

Résumé	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures.....	XI
Liste des abréviations.....	XII
Remerciements	XIV
Avant-propos	XVI
Introduction	1
Chapitre 1 : L'asthme	4
1.1 Définition de l'asthme	4
1.2 Épidémiologie de l'asthme	4
1.3 Étiologie de l'asthme	5
1.3.1 Facteurs de l'hôte	6
1.3.1.1 Atopie.....	6
1.3.1.2 Génétique.....	7
1.3.1.3 Autres facteurs de l'hôte.....	8
1.3.2 Facteurs environnementaux.....	8
1.3.2.1 Expositions aux allergènes inhalés.....	8
1.3.2.2 Infections respiratoires.....	9
1.3.2.3 Agents chimiques.....	9
1.3.2.4 Polluants aériens.....	9
1.3.3 Les différents types d'asthme.....	10
1.3.3.1 Asthme atopique ou allergique.....	10
1.3.3.2 Asthme non atopique ou intrinsèque.....	10
1.3.3.3 Asthme à l'aspirine.....	10
1.3.3.4 Asthme occupationnel.....	11
1.4 Physiopathologie de l'asthme.....	11
1.4.1 Obstruction variable et réversible des voies aériennes	11
1.4.2 Immunologie de l'asthme.....	13
1.4.2.1 Principaux mécanismes immunologiques de l'asthme.....	13
1.4.2.1.1 Phase de sensibilisation	13
1.4.2.1.1 Phase de réactivation.....	14
1.4.2.1.3 Amplification de la mémoire immunitaire	15
1.4.2.1.4 Chronicisation de l'inflammation.....	16
1.4.2.2 Types cellulaires impliqués dans l'immunologie de l'asthme	16
1.4.2.2.1 Mastocytes.....	16
1.4.2.2.2 Cellules dendritiques	17
1.4.2.2.3 Éosinophiles	17
1.4.2.2.4 Lymphocytes T.....	18
1.4.2.2.5 Cellules B.....	18
1.4.2.2.6 Cellules structurelles.....	19
1.4.2.2.7 Autres types cellulaires	19
1.4.3 Remodelage des voies aériennes.....	20

1.4.3.1 Causes du remodelage	20
1.4.3.1.1 Inflammation.....	20
1.4.3.1.2 Bronchoconstriction.....	20
1.4.3.2 Caractéristiques du remodelage	21
1.4.3.2.1 Altération de l'épithélium	22
1.4.3.2.2 Hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus.....	22
1.4.3.2.3 Fibrose sous-épithéliale	23
1.4.3.2.4 Augmentation de l'aire de muscle lisse respiratoire.....	23
1.4.3.2.5 Augmentation de l'aire occupée par les vaisseaux sanguins.....	23
1.4.3.3 Conséquence du remodelage des voies aériennes	24
1.4.3.3.1 Effets protecteurs du remodelage.....	24
1.4.3.3.2 Effets néfastes du remodelage	24
1.4.4 Hyperréactivité bronchique.....	25
1.4.4.1 Causes de l'hyperréactivité bronchique	26
1.4.4.1.1 Inflammation.....	26
1.4.4.1.2 Remodelage des voies aériennes.....	27
1.4.5 Hétérogénéité dans l'asthme	28
1.4.5.1 Hétérogénéité entre les individus.....	28
1.4.5.2 Hétérogénéité à l'intérieur d'un individu	28
1.5 Diagnostic et évaluation clinique de l'asthme	29
1.5.1 Symptomatologie et signes cliniques.....	29
1.5.2 Fonctions pulmonaires	29
1.5.3 Réactivité bronchique	33
1.5.4 Test cutané d'allergie	34
1.5.5 Évaluation de l'inflammation.....	34
1.5.6 Évaluation du remodelage des voies aériennes	35
1.6 Traitement de l'asthme	36
1.6.1 Bronchodilatateurs.....	37
1.6.1.1 β_2 -agonistes.....	37
1.6.1.2 Anticholinergiques	38
1.6.2 Thérapies de contrôle	39
1.6.2.1 Corticostéroïdes inhalés	39
1.6.2.2 Corticostéroïdes systémiques.....	40
1.6.2.3 Thérapies ciblant les leucotriènes.....	40
1.6.2.4 Anticorps monoclonaux.....	40
1.6.3 Autres thérapies.....	41
1.6.3.1 Immunothérapie	41
1.6.3.2 Thermoplastie bronchique	42
1.6.4 Prise en charge de l'asthme.....	42
Chapitre 2 : Le muscle lisse respiratoire	45
2.1 Contraction du muscle lisse des voies aériennes	45
2.1.1 Mécanismes de contraction	45
2.1.1.1 Les liaisons croisées d'actomyosine	45
2.1.1.2 Polymérisation d'actine	47
2.1.2 Régulation de la contractilité.....	47
2.1.2.1 Bronchoconstricteurs	48
2.1.2.2 Bronchodilatateurs.....	49
2.1.2.3 Potentialisateurs de l'effet des bronchoconstricteurs	50
2.2 Implication du muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme	50
2.2.1 Relation entre le muscle lisse des voies aériennes et l'inflammation	51

2.2.1.1 Contribution de l'inflammation dans la contraction du MLVA	51
2.2.1.2 Contribution du MLVA dans l'inflammation	52
2.2.2 Relation entre le muscle lisse des voies aériennes et le remodelage des voies aériennes	53
2.2.2.1 Remodelage du muscle lisse des voies aériennes	53
2.2.2.2 Contribution du muscle lisse des voies aériennes dans le remodelage des voies aériennes	54
2.2.3 Relation entre le muscle lisse des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique	55
2.2.4 Utilisation du muscle lisse des voies aériennes comme cible thérapeutique dans l'asthme.....	56
Chapitre 3: Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function.....	57
3.1 Résumé.....	57
3.2 Introduction.....	59
3.3 Materials and methods.....	60
3.3.1 Animals	60
3.3.2 Kinetics of the induced airway constriction.....	60
3.3.3 Six weeks of treatment with repeated constrictions	61
3.3.4 Respiratory mechanics	62
3.3.5 Whole-lung lavages.....	63
3.3.6 Contractile capacity of airway smooth muscle	64
3.3.7 Histology on lung slices	65
3.3.8 Statistical analyses	66
3.4 Results	66
3.4.1 Constriction triggered by aerosolized methacholine	66
3.4.2 Respiratory mechanics	68
3.4.3 Inflammation	70
3.4.4 Contractile capacity of airway smooth muscle	71
3.4.5 The structural components of the airway wall and the lung.....	71
3.5 Discussion	73
3.6 Conclusion	77
3.7 Disclosure	77
Chapitre 4: Repeated activation of muscarinic receptors <i>in vivo</i> reverses airway hyperresponsiveness to methacholine in a murine model of asthma	78
4.1 Résumé.....	78
4.2 Introduction.....	79
4.3 Materials and methods.....	80
4.3.1 Animals	80
4.3.2 Methacholine treatment and measures of induced airway constriction.....	80
4.3.3 Airway responsiveness	82
4.3.4 Contractile capacity of airway smooth muscle	83
4.3.5 Whole-lung lavages.....	84
4.3.6 Expression of the muscarinic M3 receptor	84
4.3.8 Statistical analyses	85
4.4 Results	86
4.4.1 The magnitude of the repeated constrictions	86
4.4.2 Airway responsiveness	87
4.4.3 Contractile capacity of airway smooth muscle	87
4.4.4 In a murine model of asthma.....	88

4.4.5 Inflammation	91
4.4.6 Expression of the M3R	92
4.5 Discussion.....	93
4.6 Conclusion	97
Conclusion.....	98
Autres publications	102
Bibliographie	105

Liste des figures

- Figure 1.1: Prévalence de l'asthme dans le monde.
Figure 1.2: Génétique de l'asthme
Figure 1.3: Variabilité et réversibilité de l'asthme.
Figure 1.4: Mécanismes de l'obstruction des voies aériennes dans l'asthme.
Figure 1.5: Immunologie de la phase de sensibilisation
Figure 1.6: Phase de réactivation.
Figure 1.7: Remodelage des voies aériennes.
Figure 1.8: Hyperréactivité bronchique
Figure 1.9: La spirométrie.
Figure 1.10: Les volumes et réserves pulmonaires.
Figure 1.11: Paramètres évalués par la technique des oscillations forcées.
Figure 1.12: Le continuum du traitement de l'asthme.
Figure 2.1: Contraction du MLVA par les cycles de ponts croisés entre l'actine et la myosine.
Figure 2.2: La polymérisation d'actine.
Figure 2.3: Mécanismes d'action des bronchoconstricteurs.
Figure 2.4: « It is not the tree but the ants in the tree.
Figure 2.5: Remodelage du muscle lisse des voies aériennes.
Figure 3.1: Experimental design that was used to investigate the effect of repeated airway constrictions on features of experimental asthma.
Figure 3.2: The kinetics of the induced airway constriction
Figure 3.3: The effect of the treatments to saline or methacholine on the airway response over time.
Figure 3.4: The effect of repeated constrictions on the mechanic of the respiratory system at baseline and in response to methacholine.
Figure 3.5: The effect of repeated constrictions on the inflammation.
Figure 3.6: The effect of repeated constrictions on the airway smooth muscle contractility.
Figure 3.7: The effect of repeated constrictions on the structure of the lungs
Figure 4.1: Experimental designs that were used to investigate the effect of repeated activation of muscarinic receptors on features of asthma in 'non-asthmatic' mice (Protocol 1) and in 'asthmatic' mice (Protocol 2).
Figure 4.2: Longitudinal effects of methacholine (MCh) on specific airway resistance (sRaw).
Figure 4.3: The effect of repeated activation of the muscarinic receptors on the responsiveness of the respiratory system to methacholine (MCh).
Figure 4.4: The effect of repeated activation of the muscarinic receptors on the contractility of airway smooth muscle.
Figure 4.5: The effect of repeated activation of the muscarinic receptors in a murine model of asthma.
Figure 4.6: The effects of treatments with HDM and MCh on the inflammation.
Figure 4.7: Protein expression of the M3R.
Figure 4.8: The signaling pathways that are activated downstream of the M3R lead to both contraction and receptor desensitization.

Liste des abréviations

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ASM : « Airway smooth muscle »
ATP : Adénosine triphosphate
ATPase : Adénosine triphosphatase
BACA : β_2 -agonistes à courte durée d'action
BALA : β_2 -agonistes à longue durée d'action
Ca²⁺ : Ions calcium
CCR4 : « CC chemokine receptor 4 »
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CRF : Capacité résiduelle fonctionnelle
CP₂₀: concentration produisant une chute de 20 % du VEMS
CSI : corticostéroïdes inhalés
CSO : corticostéroïdes oraux
CT-Scan : « computed tomography »
CVF : Capacité vitale forcée
CysLTR : récepteur des cystéinyl leucotriènes
DAG : « Diacyl-glycerol »
DCP : « Double-chamber plethysmograph »
DEP: Débit expiratoire de pointe
EBUS : « Endobronchial ultrasonography »
eQTL : expression quantitative trait loci »
Fc ϵ RI : Récepteurs Fc de haute affinité
Fc ϵ RII : Récepteurs Fc de faible affinité
FRC : Functional residual capacity
GINA : Global initiative for Asthma
GPCR : « G protein-coupled receptor »
GWAS : « Genome-wide association study »
IgE : Immunoglobuline E
IFN: Interféron
IL : Interleukine
IP3 : « Inositol triphosphate »
KCl : Chlorure de potassium
K₂HPO₄ : « Potassium dihydrogen phosphate »
M3R : Récepteur muscarinique M3
MCh : Métacholine
MEC : Matrice extracellulaire
MgSO₄ : « Magnesium sulfate »
Min : Minute
MLC : Chaîne légère de myosine
MLCK : Kinase de la chaîne légère de myosine
MLCP : Phosphatase de la chaîne légère de myosine
MLVA : Muscle lisse des voies aériennes
MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique
NaCl : « Sodium chloride »
NaF : « Sodium fluoride »
NaHCO₃ : « Sodium bicarbonate »
PIP2 : « Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate »
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RhoA : « Ras homolog gene family, member A »

ROCK : « Rho-associated, coiled coil-containing kinase »

Rrs : Résistance du système respiratoire

s : Second

SCF : « Stem cell factor »

SNP : Polymorphismes nucléotidiques

TGF : « Transforming growth factor »

Tfh : T auxiliaire folliculaire

Th0 : T auxiliaire naïf

Th1 : T auxiliaire de type 1

Th2 : T auxiliaire de type 2

Th17 : T auxiliaire de type 17

TNF : « Tumor necrosis factor »

TSLP : « thymic stromal lymphopoietin »

VEMS : Volume expiratoire maximal en 1 seconde

VR : Volume résiduel

X_{rs} : Réactance du système respiratoire

Z_{rs} : Impédance du système respiratoire

Rapport-Gratuit.com

Remerciements

Je souhaite remercier mon directeur de recherche Ynuk Bossé pour son encadrement exemplaire tout au long de mon cheminement à la Maîtrise. Il fut pour moi un réel mentor par son leadership, son expertise et son accessibilité. Il m'a permis d'aller au bout de mes ambitions lors de mes études à la Maîtrise. Merci Ynuk, j'ai adoré travailler dans ton laboratoire et ce fut un honneur pour moi d'avoir fait partie de ton équipe de recherche.

Également, j'aimerais remercier les autres membres de l'équipe de recherche du Dr Ynuk Bossé soit Morgan Gazzola, Cyndi Henry et Katherine Lortie. Plus spécifiquement, j'aimerais remercier Morgan Gazzola qui représenta plus qu'un simple collègue, mais bel et bien un ami, voire un frère spirituel. Merci Morgan d'avoir rendu chacune des journées au laboratoire plaisantes peu importe ce que nous réalisions comme expérience. Je te souhaite le meilleur pour la suite et fais attention à toi !

D'autre part, je considère que j'ai été exceptionnellement choyé de faire partie de la grande famille de l'Institut Universitaire et de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ). Les étudiants, les professionnels de recherches et les chercheurs permettaient d'avoir un environnement propice à la collaboration et à l'entraide. Je vous souhaite de pérenniser cette dynamique dans les prochaines années.

De plus, je voudrais profiter de l'occasion pour remercier ceux que j'ai si souvent tendance à oublier, mais qui me permettent d'être qui je suis aujourd'hui soit mes amis de toujours natifs du Lac St-Jean que sont Mathieu Lavoie, Rudy Hamel, Vincent Boivin, Samuel Bilodeau et Pierre-Michel Côté. Au plaisir de vous revoir autour d'une petite bière à St-Méthode sur la terre de mes aïeux lors d'une journée particulièrement ensoleillée d'été. Aussi, je salue tous les autres Jeannois que j'ai côtoyés lors de ma tendre jeunesse dont je m'ennuie atrocement si souvent et qui font, du Lac St-Jean, un petit paradis sur terre.

Je profite également de l'occasion pour remercier mes parents Jean-Luc Larouche et Christine Mailhot pour leur soutien lors de mes études passées ainsi que lors de mes futures études qui risquent de s'étaler encore sur plusieurs années. Je remercie aussi mes sœurs Émilie et Anabelle.

Finalement, je remercie les deux personnes qui croient le plus en mes moyens. Je fais certainement référence au grand révolutionnaire dont j'ai la chance d'avoir comme frère ainsi que notre ami commun, Pier-Olivier Bouchard. Au jeu d'échecs, le cavalier est une pièce mineure placée entre la tour et le fou. Je vous laisse deviner nos titres respectifs.

Avant-propos

Ce mémoire de maîtrise présente des travaux que j'ai réalisés lors de deux années de recherche sur le muscle lisse respiratoire.

Les deux premiers chapitres décrivent l'état actuel des connaissances dans le domaine de recherche abordé lors de ce mémoire afin de contextualiser les travaux de recherche qui y sont présentés. Le chapitre 1 aborde les différents aspects de l'asthme tels que son épidémiologie, son étiologie, sa physiopathologie, son évaluation clinique ainsi que son traitement. Le chapitre 2 traite du muscle lisse respiratoire soit, plus spécifiquement, de ses mécanismes de contraction et de relaxation, de son implication dans l'asthme ainsi que de son potentiel comme cible thérapeutique.

Le chapitre 3 présente un article publié dans le « Journal of Applied Physiology ». Cet article étudie l'implication des bronchoconstrictions sur le remodelage des voies aériennes et sur la mécanique respiratoire. Le titre de l'article est le suivant: « Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function ». J'ai contribué à cet article en conceptualisant et en réalisant les expériences, ainsi qu'en participant à l'écriture de l'article. Louis Deschênes a également participé dans la réalisation des expériences. Morgan Gazzola, Katherine Lortie et Cyndi Henry ont contribué au projet en réalisant l'analyse histologique des poumons. Les Drs. Bindi S. Brooks et Mathieu Morissette ont participé à la rédaction de l'article. Le Dr Ynuk Bossé a contribué de façon importante en supervisant l'ensemble des travaux en lien avec ce projet et en dirigeant la rédaction de l'article.

Le chapitre 4 présente des travaux réalisés dont l'objectif général est de caractériser les effets de l'activation intense du récepteur muscarinique sur la contractilité du muscle lisse respiratoire et sur la réactivité du système respiratoire. J'ai élaboré et réalisé les expériences de concert avec Louis Deschênes, Katherine Lortie et le Dr Ynuk Bossé.

Introduction

L'asthme est un désordre respiratoire qui affecte environ 300 millions d'individus dans le monde dont la prévalence globale ne cesse d'augmenter. Bien que l'asthme soit associé à une faible mortalité, ce désordre respiratoire donne lieu à des répercussions économiques importantes pour le système de santé. De plus, 5 à 10 % des personnes atteintes d'asthme ne répondent pas ou très peu aux traitements actuels démontrant toute la nécessité de la recherche sur cette pathologie afin de mieux comprendre sa physiopathologie et, éventuellement, de développer des nouveaux traitements plus efficaces. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce mémoire.

Le premier chapitre est une description générale de la pathologie. L'asthme est un syndrome respiratoire caractérisé par une obstruction variable et réversible des voies aériennes dont l'étiologie est complexe. Trois grandes composantes sont sous-jacentes à cette obstruction soit la réponse immunitaire, le remodelage des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique. L'évaluation clinique de l'individu atteint d'asthme consiste initialement à identifier les symptômes et les manifestations cliniques et peut se rendre jusqu'à l'évaluation des fonctions pulmonaires, de l'inflammation dans l'arbre bronchique et de la structure de la paroi des voies aériennes. Le traitement de l'asthme consiste essentiellement à utiliser des médicaments qui atténuent les symptômes tels que des bronchodilatateurs et d'autres médicaments qui limitent l'inflammation dans l'arbre bronchique tels que les thérapies de contrôle.

Le deuxième chapitre caractérise le muscle lisse respiratoire qui a un rôle central dans la physiopathologie de l'asthme. Le muscle lisse respiratoire représente donc une cible de choix dans le traitement de l'asthme. En effet, la contraction excessive du muscle lisse respiratoire contribue à l'obstruction des voies aériennes qui est responsable des symptômes associés à l'asthme. L'importance de la contribution du muscle lisse respiratoire est perceptible par le caractère réversible de l'obstruction des voies aériennes et des symptômes de l'asthme par la prise de médicaments

relaxant le muscle lisse respiratoire. De plus, le muscle lisse respiratoire pourrait contribuer au remodelage et à l'inflammation de l'arbre bronchique.

Le troisième chapitre présente un article récemment publié dont le titre est « Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function ». Cet article caractérise les effets de bronchoconstrictions répétées chez des souris *in vivo* sur différents paramètres associés à l'asthme.

Le quatrième chapitre aborde un projet qui consiste à déterminer si l'activation répétée d'un récepteur muscarinique permet d'induire des effets potentiellement bénéfiques dans un contexte d'asthme par un phénomène d'adaptation du récepteur muscarinique.

La conclusion revient sur l'ensemble des projets en réitérant les éléments clés de ceux-ci. Également, certaines perspectives concernant les différents projets y sont présentées.

Hypothèses et objectifs :

Les deux principaux projets abordés lors de ce mémoire évaluent l'effet d'un traitement à la métacholine sur différents paramètres en lien avec l'asthme chez la souris. Il est à noter que la fréquence et l'intensité des traitements diffèrent entre les deux projets étant donné que les hypothèses et objectifs de ces projets sont distincts.

L'hypothèse du projet présenté dans le chapitre 3 stipule que des bronchoconstrictions répétées peuvent déclencher un processus de remodelage de l'arbre bronchique associé à une augmentation de la capacité contractile du muscle lisse respiratoire et à une altération de la mécanique respiratoire. Ainsi, les objectifs sont d'évaluer si des bronchoconstrictions répétées *in vivo* chez des souris, induites par l'inhalation de métacholine, altèrent : 1) la structure des parois de l'arbre bronchique, 2) la capacité contractile du muscle lisse respiratoire ainsi que 3) la

mécanique du système respiratoire de base et durant une bronchoprovocation avec des doses croissantes de métacholine.

En ce qui concerne le projet abordé dans le chapitre 4, l'hypothèse est que la suractivation des récepteurs muscariniques déclenche un phénomène d'adaptation des récepteurs donnant lieu à une diminution de l'effet de la métacholine sur la contractilité du muscle lisse respiratoire et sur la résistance du système respiratoire. Les objectifs consistent donc à caractériser les effets de l'activation répétée du récepteur muscarinique induite par l'inhalation répétée de fortes doses de métacholine chez la souris *in vivo* sur : 1) la réponse contractile du muscle lisse respiratoire à différents spasmogènes et 2) la réactivité du système respiratoire à la métacholine.

Chapitre 1 : L'asthme

1.1 Définition de l'asthme

L'asthme est un syndrome respiratoire caractérisé par une obstruction variable et réversible des voies aériennes impliquant habituellement une inflammation chronique. Cette obstruction des voies aériennes est responsable des symptômes de l'asthme que sont la dyspnée, la toux, l'oppression thoracique, la respiration sifflante ainsi que les expectorations (Reddel et al., 2015).

1.2 Épidémiologie de l'asthme

L'asthme affecte approximativement 300 millions d'individus dans le monde dont la prévalence globale ne cesse d'augmenter (Masoli, Fabian, Holt, & Beasley, 2004). Au Québec, en 2014, on estimait qu'environ 9.1% de la population âgée de plus de 12 ans avait obtenu un diagnostic pour l'asthme (Canada, 2014).

La prévalence de l'asthme est plus élevée dans les pays industrialisés que dans les pays en développement (Figure 1.1) (Organization, 2007; Rosado-Pinto & Morais-Almeida, 2004). De plus, les gens habitant en milieu urbain ont plus de chance de développer l'asthme que ceux provenant des milieux ruraux (Kozyrskyj & Becker, 2004). Il est à noter que les régions à forte prévalence d'asthme sont généralement accompagnées d'une forte prévalence d'atopie (Law, Morris, Wald, Luczynska, & Burney, 2005). Ainsi, il est fort probable que la prévalence d'atopie soit le principal facteur déterminant dans la prévalence de l'asthme (Ronchetti et al., 2009).

L'âge d'apparition des symptômes de l'asthme est variable bien que l'âge moyen soit de 3 ans (Radhakrishnan et al., 2014). Les jeunes garçons ont plus de risques de développer l'asthme dans l'enfance, mais cette tendance s'inverse à partir de l'adolescence, et ce, probablement pour des raisons hormonales (de Marco, Locatelli, Sunyer, & Burney, 2000).

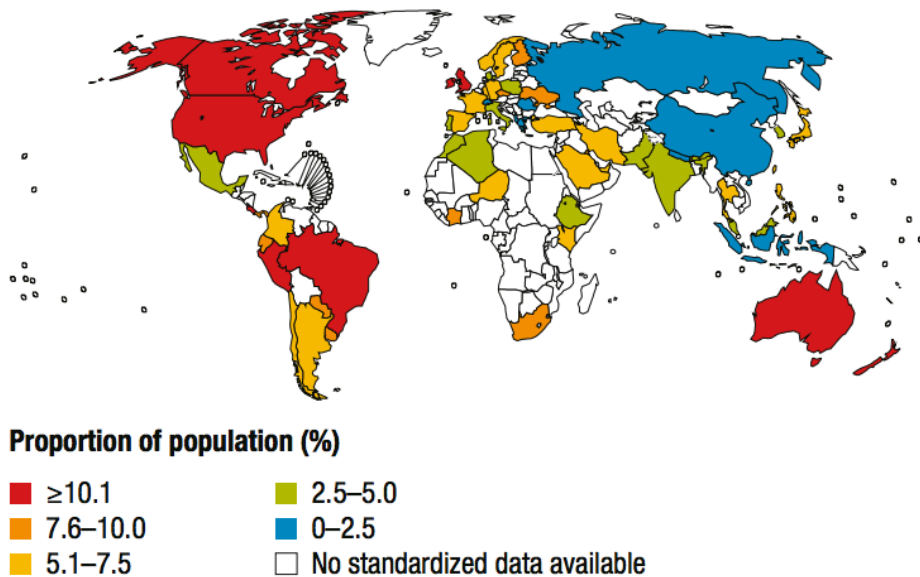


Figure 1.1 : Prévalence de l'asthme dans le monde. L'asthme touche principalement les pays industrialisés. (Organization, 2007)

Quoique l'asthme soit associé à une faible mortalité, ce trouble respiratoire engendre des répercussions importantes sur la qualité de vie des individus affectés ainsi que des coûts considérables pour le système de santé (Masoli et al., 2004; Weiss & Sullivan, 2001). De plus, une proportion des personnes atteintes d'asthme soit environ 5 à 10% sont dites asthmatiques sévères et ne répondent pas bien aux traitements actuels démontrant toute la nécessité d'une meilleure compréhension de ce désordre respiratoire afin d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques (P. Barnes & Woolcock, 1998; Busse, Banks-Schlegel, & Wenzel, 2000; O'Byrne, Naji, & Gauvreau, 2012).

1.3 Étiologie de l'asthme

L'asthme est un désordre respiratoire hétérogène et complexe (Carr & Bleecker, 2016; Lotvall et al., 2011). L'hétérogénéité de ce désordre respiratoire se manifeste, entre autres, par des variations importantes entre les individus en ce qui concerne son étiologie. L'asthme semble être un terme parapluie pour désigner un syndrome déterminé selon des observations cliniques dont les mécanismes physiopathologiques sous-jacents peuvent varier considérablement entre les individus. La complexité de l'asthme se signale par l'implication dans le

développement du syndrome de plusieurs interactions entre une multitude de facteurs de l'hôte et environnementaux.

1.3.1 Facteurs de l'hôte

1.3.1.1 Atopie

Une forte proportion de la population des pays développés, soit environ 30 % des individus âgés entre 12 et 24 ans, est atopique (Scichilone et al., 2011). Cette atopie est généralement déterminée en clinique par un test cutané d'allergie positif. L'atopie est un facteur de risque important pour développer l'asthme puisque les individus avec un test cutané positif pour au moins 1 allergène ont environ 2.5 fois plus de chances de développer l'asthme que ceux dont le résultat est négatif (Pearce, Pekkanen, & Beasley, 1999). Le développement d'une allergie pourrait être attribué à deux événements importants (C. Ober & Vercelli, 2011). Le premier événement serait l'acquisition d'une prédisposition génétique à la surproduction d'immunoglobuline E (IgE) avant la naissance. Le deuxième événement serait la sensibilisation à un allergène lors d'une période critique de la vie, généralement l'enfance. Néanmoins, l'atopie n'est certainement pas le seul facteur déterminant dans le développement de l'asthme puisque, d'une part, plusieurs personnes atopiques ne développeront jamais l'asthme et, d'autre part, une proportion des individus atteints d'asthme ne sont pas atopiques. Ainsi, environ 35 % des cas d'asthme seraient attribuables à l'atopie (Pearce et al., 1999).

1.3.1.2 Génétique

Selon des études réalisées sur des jumeaux séparés à la naissance, la contribution de la génétique dans le développement de l'asthme serait entre 35 et 70% (Duffy, Martin, Battistutta, Hopper, & Mathews, 1990; Nieminen, Kaprio, & Koskenvuo, 1991). La composante génétique de l'asthme implique un grand nombre de gènes prédisposant au développement du désordre respiratoire. En effet, plus de 100 gènes ont été associés à l'asthme (Bosse & Hudson, 2007). Ces gènes affectent différentes composantes de l'asthme telles que l'inflammation, la bronchoconstriction et le remodelage des voies aériennes (Figure 1.2). Néanmoins, chacun de ces gènes semble avoir une faible influence sur le développement de l'asthme. Ceci se révèle par : 1- un faible rapport des cotes pour les polymorphismes nucléotidiques (SNPs) les plus associés à l'asthme, soit d'environ 1.7; 2- une pénétrance limitée de ces SNPs; et 3- une faible reproductibilité des études génétiques (Hirschhorn, Lohmueller, Byrne, & Hirschhorn, 2002; Schedel et al., 2015). La difficulté des études à discerner l'aspect génétique de l'asthme peut être expliquée par l'hétérogénéité et la complexité du désordre respiratoire (Bosse & Hudson, 2007). Lors des études génétiques, une meilleure catégorisation des sujets atteints d'asthme selon des caractères phénotypiques ou endotypiques pourrait permettre de pallier la problématique d'hétérogénéité de l'asthme (Lavoie-Charland, Berube, Boulet, & Bosse, 2016). De plus, l'augmentation de la puissance des études génétiques par le développement de larges cohortes tel que prôné par la méthode « genome-wide association study » (GWAS) et l'utilisation de méthodes combinatoires telles que le « expression quantitative trait loci » (eQTL) pourraient permettre de surmonter le défi imposé par la complexité de l'asthme (Nieuwenhuis et al., 2016; Carole Ober, 2016) .

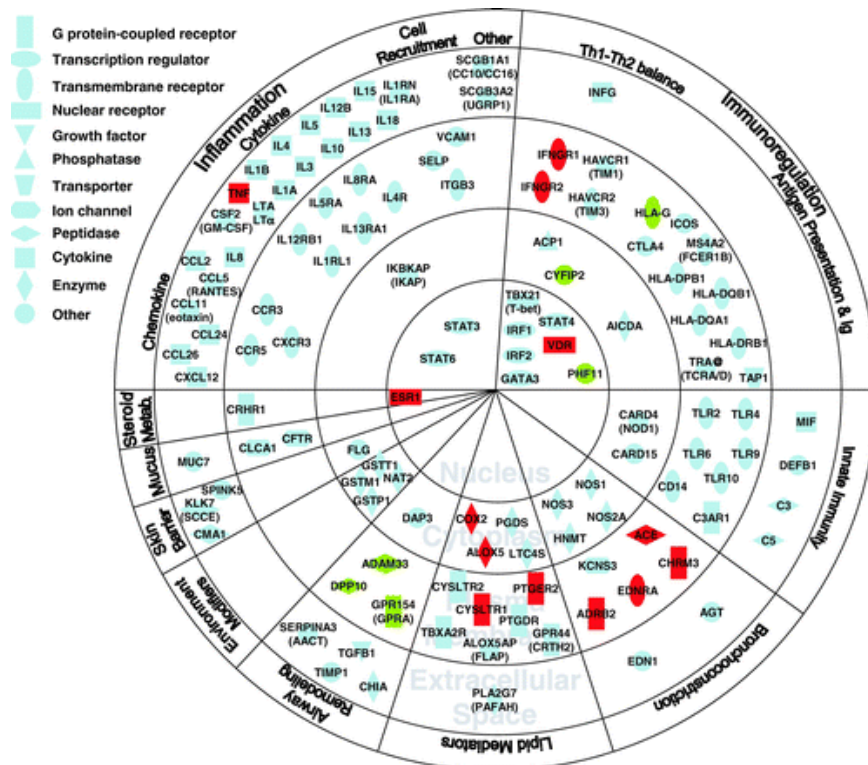


Figure 1.2 : Génétique de l'asthme. Plus de 100 gènes ont été associés au développement de l'asthme. Ces gènes semblent affecter différents aspects de la pathophysiologie de l'asthme en jouant différentes fonctions. Reproduit de : (Bosse & Hudson, 2007).

1.3.1.3 Autres facteurs de l'hôte

D'autres facteurs de l'hôte ont été associés à l'asthme dont l'obésité (Chen, Dales, & Jiang, 2006) et la prématurité (von Mutius, Nicolai, & Martinez, 1993).

1.3.2 Facteurs environnementaux

1.3.2.1 Expositions aux allergènes inhalés

Les expositions aux allergènes inhalés ont un rôle prééminent dans l'asthme (Holt, Macaubas, Stumbles, & Sly, 1999). D'une part, les allergènes sont associés au développement de l'asthme en agissant comme sensibilisateur des voies aériennes. D'autre part, les allergènes sont les principaux stimuli responsables des exacerbations de l'asthme ainsi qu'à son aggravation. Les allergènes les mieux

documentés associés à l'asthme sont produits par les acariens et les animaux domestiques.

1.3.2.2 Infections respiratoires

Plusieurs infections respiratoires d'origine virale peuvent agir comme déclencheurs d'exacerbations de l'asthme (Johnston et al., 2005). Certaines infections respiratoires ont été associées au développement de l'asthme. Les mécanismes physiopathologiques expliquant ces associations ne sont pas clairs (Oliver, Robinson, Peters, & Black, 2014). De façon paradoxale, les infections respiratoires pourraient également avoir un effet protecteur de l'asthme lorsque contractées à l'enfance comme le stipule l'hypothèse de l'hygiène (Strachan, 1989). Cette hypothèse est, entre autres, basée sur l'observation que la prévalence dans les pays développés associés à une meilleure hygiène est plus élevée que celle dans les pays en développement. Le mécanisme expliquant ce phénomène pourrait être que l'exposition à certains agents infectieux lors de l'enfance favoriserait la polarisation de la réponse lymphocyte T vers une réponse T auxiliaire de type 1 (Th1) afin de combattre les agents infectieux au détriment d'une réponse T auxiliaire de type 2 (Th2) généralement associée à l'asthme (Romagnani, 2004).

1.3.2.3 Agents chimiques

Différents agents chimiques présents dans certains milieux de travail sont considérés comme pouvant jouer le rôle de sensibilisateur dans le développement d'un type d'asthme particulier dit occupationnel (Tarlo & Lemiere 2014). Par exemple, le diisocyanate de toluène et l'anhydride trimellitique sont des agents chimiques associés à l'asthme.

1.3.2.4 Polluants aériens

Certains polluants environnementaux peuvent agir à titre de déclencheur des exacerbations d'asthme (Guarnieri & Balmes, 2014). Le dioxyde de soufre, l'ozone et les particules de diesel sont des exemples de composés gazeux qui peuvent déclencher l'apparition des symptômes de l'asthme. De plus, la forte prévalence de

l'asthme parmi les enfants habitant à proximité de routes achalandées par les automobiles comparativement à la prévalence observée parmi les autres enfants suggère que la pollution aérienne pourrait contribuer au développement de l'asthme (Perez et al., 2013).

1.3.3 Les différents types d'asthme

1.3.3.1 Asthme atopique ou allergique

L'asthme médié par une réaction d'hypersensibilité de type I en réponse au contact d'un allergène est le principal type d'asthme. Cette réaction implique une phase de sensibilisation, une réponse immunitaire de type Th2 ainsi que la dégranulation des mastocytes médiée par les IgE (P. J. Barnes, 2001).

1.3.3.2 Asthme non atopique ou intrinsèque

Une proportion des patients atteints d'asthme sont négatifs au test cutané d'allergie et ce type d'asthme est qualifié de non atopique (C. Ober & Vercelli, 2011). Celui-ci se déclenche généralement plus tard que l'asthme atopique (Miranda, Busacker, Balzar, Trudeau, & Wenzel, 2004). Les stimuli responsables des exacerbations chez ces individus ne semblent pas être les mêmes que ceux impliqués dans l'asthme atopique (Pekkanen, Lampi, Genuneit, Hartikainen, & Jarvelin, 2012).

1.3.3.3 Asthme à l'aspirine

L'aspirine (ou d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens) peut déclencher les symptômes de l'asthme chez certains individus (Laidlaw & Boyce, 2016). Le mécanisme expliquant ce phénomène n'est pas complètement compris. L'hypothèse générale serait que la prise d'aspirine par son effet d'inhibiteur des COX favoriserait la production de leucotriènes au détriment des prostaglandines. Ces leucotriènes seraient responsables de l'activation du muscle lisse des voies aériennes (MLVA) et des symptômes associés à l'asthme.

1.3.3.4 Asthme occupationnel

À la suite d'expositions répétées à certains produits chimiques irritants les voies aériennes dans leur milieu de travail, certains individus développent l'asthme occupationnel (Tarlo & Lemiere 2014). Ce type d'asthme serait responsable d'environ 16% des cas d'asthme chez l'adulte (Mazurek & White, 2015). L'asthme occupationnel est cliniquement perceptible par une amélioration des symptômes lorsque l'individu est en congé. De plus, l'asthme occupationnel est généralement réversible par l'arrêt de l'exposition à l'agent irritant.

1.4 Physiopathologie de l'asthme

1.4.1 Obstruction variable et réversible des voies aériennes

L'asthme est caractérisé par une obstruction variable et partiellement réversible des voies aériennes donnant lieu aux symptômes de l'asthme (Hetzel & Clark, 1980). Les symptômes incluent la dyspnée, la toux, l'oppression thoracique et les sifflements (Fanta 2009). L'obstruction des voies aériennes est dite variable puisqu'elle fluctue de façon temporelle et elle est dite partiellement réversible puisque l'administration de bronchodilatateurs permet de la renverser en partie (Figure 1.3). La variabilité et la réversibilité de cette obstruction distinguent l'asthme des maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) (Buist, 2003). En ce qui concerne l'asthme, l'obstruction des voies aériennes peut être expliquée par l'accumulation de mucus et de cellules dans la lumière bronchique, par l'augmentation de l'épaisseur de la paroi aérienne et/ou par la contraction du MLVA (Figure 1.4) (James & Wenzel, 2007). La réponse immunitaire, le remodelage et l'hyperréactivité des voies aériennes forment les trois composantes physiopathologiques responsables des changements associés à l'obstruction des voies aériennes.

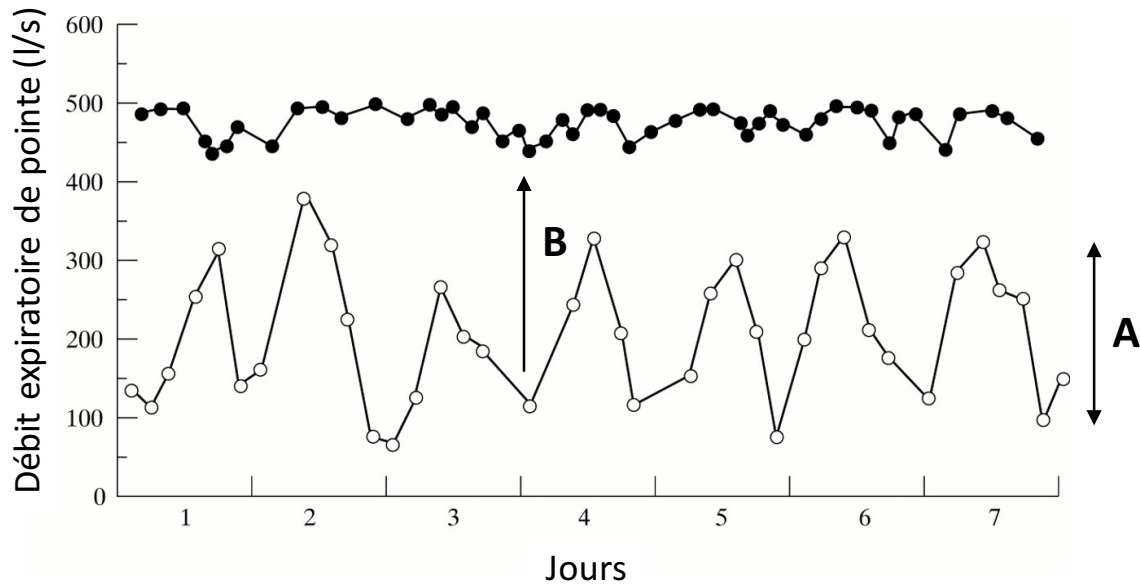


Figure 1.3 : Variabilité et réversibilité de l'asthme. Prise répétée sur 7 jours du débit expiratoire de pointe chez un patient atteint d'asthme avant (○) et après (●) la prise d'un agoniste β_2 adrénergique (terbutaline) sous-cutanée démontrant la variabilité (A) temporelle de l'obstruction des voies aériennes à l'intérieur d'un sujet ainsi que sa réversibilité (B). Reproduit de : (Ayres, Miles, & Barnes, 1998)

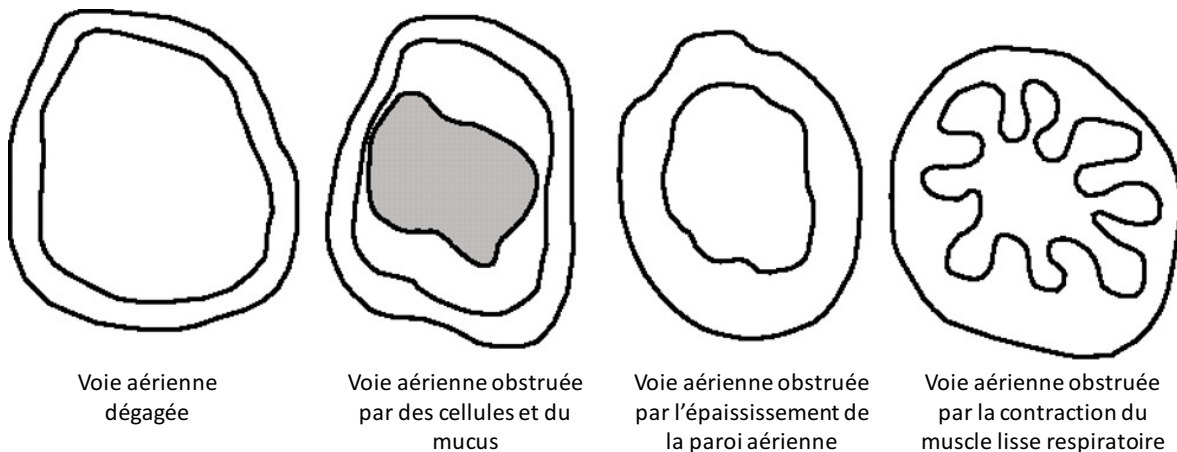


Figure 1.4 : Mécanismes de l'obstruction des voies aériennes dans l'asthme. L'accumulation de mucus et de cellules dans la lumière bronchique, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi aérienne et la contraction du MLVA sont les trois principaux mécanismes contribuant à l'obstruction des voies aériennes dans l'asthme. Ces trois mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et interagissent entre eux pour amplifier l'obstruction des voies aériennes retrouvée dans l'asthme. Reproduit de : (James & Wenzel, 2007)

1.4.2 Immunologie de l'asthme

L'immunologie de l'asthme est généralement associée à une réaction d'hypersensibilité de type I impliquant plusieurs cellules immunitaires et médiateurs inflammatoires (Platts-Mills, 2001). Néanmoins, d'autres types de réactions immunitaires peuvent également être impliqués pour certains sous-groupes d'individus atteints d'asthme étant donné l'hétérogénéité du désordre respiratoire (Wenzel, 2006).

1.4.2.1 Principaux mécanismes immunologiques de l'asthme

La réaction d'hypersensibilité de type I est caractérisée par une phase de sensibilisation lors de la première exposition suivie d'une phase de réactivation lors des expositions subséquentes. En parallèle, des mécanismes d'amplification de la mémoire immunitaire ainsi que d'instauration d'une inflammation chronique surviennent.

1.4.2.1.1 Phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation (Figure 1.5) qui est asymptomatique se déroule généralement dans l'enfance lorsqu'un individu avec une prédisposition génétique est exposé pour la première fois à un allergène. Les cellules dendritiques captent cet allergène par phagocytose et migrent, par la suite, dans un tissu lymphoïde à proximité pour le présenter aux cellules T auxiliaires naïves (Th0) spécifiques à l'allergène (Gaurav & Agrawal, 2013). Dans le cas d'un sujet asthmatique, cette présentation déclenche une forte réponse immunitaire de type Th2 qui culmine en production d'IgE s'associant aux récepteurs Fc de haute affinité (FcεRI) à la surface des mastocytes (Galli & Tsai, 2012; Geha, Jabara, & Brodeur, 2003).

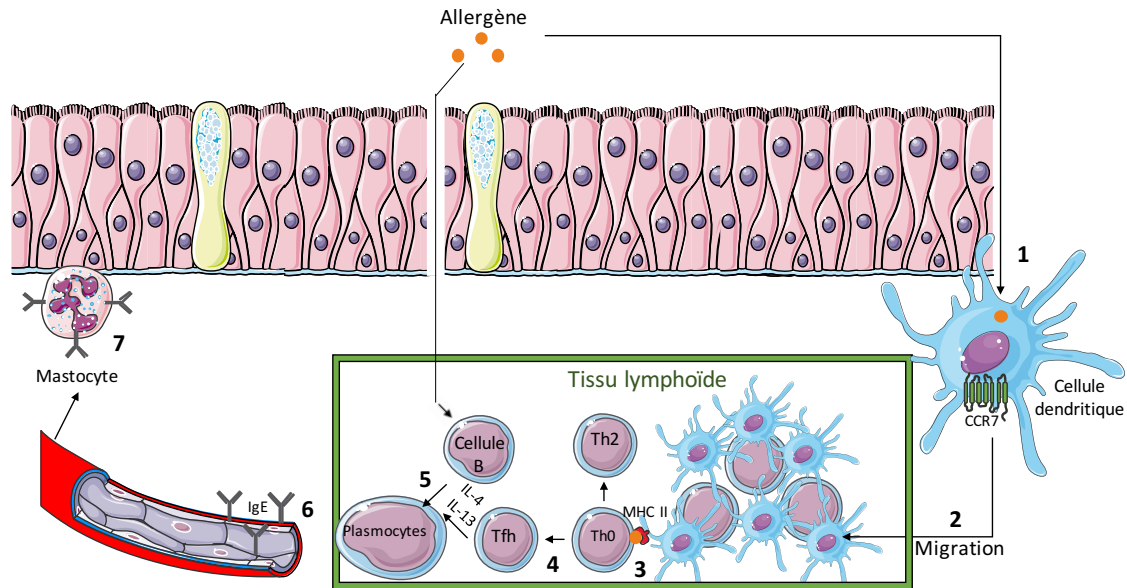


Figure 1.5 : Immunologie de la phase de sensibilisation : 1. L'allergène inhalé est capté et apprêté en courts peptides par des cellules dendritiques qui les présentent par la suite à leur surface à partir du le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII). 2. Les cellules dendritiques activées par la reconnaissance de l'antigène migrent dans le tissu lymphoïde par chimiotactisme. 3. Les cellules dendritiques présentent l'antigène aux lymphocytes Th0 spécifiques pour le peptide présenté. 4. Les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th2 et en lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh) 5. Ces lymphocytes sécrètent différentes cytokines (IL-4 et IL-13) qui vont favoriser la différenciation des cellules B préalablement activées par l'antigène en plasmocytes ainsi que leur commutation isotypique vers un profil producteur d'IgE. 6. Ces plasmocytes sécrètent des IgE dans la circulation sanguine. 7. Les IgE vont se fixer aux récepteurs FcεRI de haute affinité à la surface des mastocytes et les prédisposent ainsi à leur dégranulation lors des expositions subséquentes à l'allergène.

1.4.2.1.1 Phase de réactivation

Lors des expositions subséquentes caractérisant la phase de réactivation (Figure 1.6A), l'allergène se lie directement aux IgE recouvrant les mastocytes et induit l'activation de ceux-ci (Amin, 2012; Galli & Tsai, 2012). Le mastocyte activé libère des médiateurs donnant lieu à une réponse des voies aériennes dite immédiate (10-30 min) et contribuant également à une réponse tardive (3-24 h) qui peuvent être perceptibles en quantifiant l'obstruction des voies aériennes en réponse à l'exposition d'un allergène (L. P. Boulet, Roberts, Dolovich, & Hargreave, 1984) (Figure 1.6B). Lors de la réponse immédiate, les mastocytes libèrent des amines vaso- et bronchoactives préformées dans des granules tels que l'histamine ainsi que des médiateurs lipidiques néosynthétisés tels que la prostaglandine D2 et les leucotriènes C4, D4 et E4 (Amin, 2012). Ces différents médiateurs activent le MLVA

et favorisent ainsi la bronchoconstriction donnant lieu à une obstruction des voies aériennes. La réponse tardive est caractérisée par une réponse inflammatoire généralement éosinophilique. Les mastocytes, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales sont responsables de l'instauration de cette réponse inflammatoire en sécrétant plusieurs médiateurs inflammatoires (Bradding & Holgate, 1999).

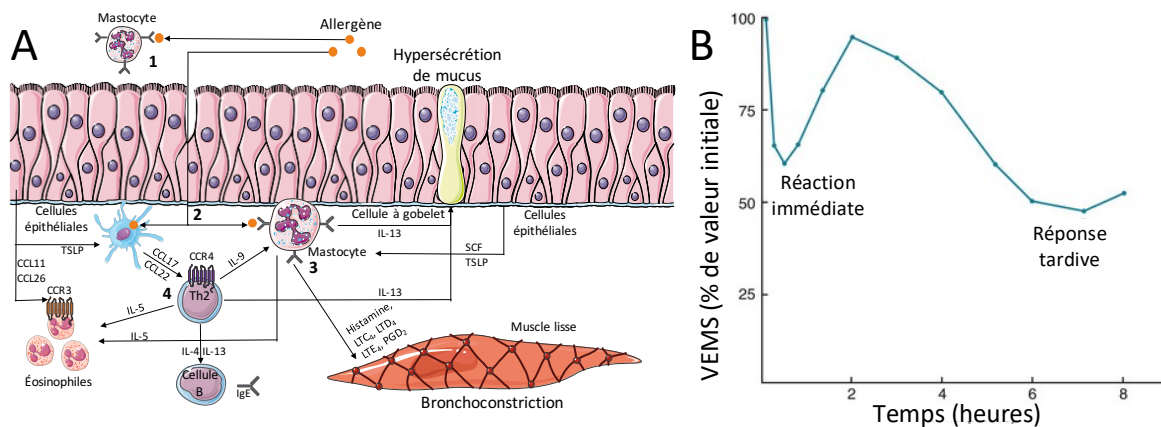


Figure 1.6 : Phase de réactivation. (A) Immunologie de la phase de réactivation : 1. L'allergène inhalé est reconnu par les mastocytes ceux-ci augmentent la perméabilité de l'épithélium en sécrétant des médiateurs chimiques. 2. L'allergène pénètre dans la paroi aérienne dans laquelle il interagit avec les cellules dendritiques et les mastocytes. 3. Les mastocytes sont responsables de la réaction immédiate en libérant plusieurs bronchoconstricteurs et certaines molécules qui favorisent la sécrétion de mucus. 4. L'inflammation persiste puisque les lymphocytes Th2, les éosinophiles et les cellules B sont activés/recrutés par différentes cytokines/chimiokines sécrétées principalement par les mastocytes, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales. **(B) Réponse des voies aériennes lors de la phase de réactivation.** La phase de réactivation donne lieu à 2 périodes d'obstruction accentuée des voies aériennes soit la réaction immédiate et la réaction tardive. Reproduit de : (Weinberger, Cockrill, & Mandel, 2014).

1.4.2.1.3 Amplification de la mémoire immunitaire

En parallèle avec la réponse immunitaire préalablement décrite, les expositions à l'allergène favorisent également le développement d'un nombre supplémentaire de cellules B mémoires (Wu & Zarrin, 2014). Ces cellules B mémoires sont caractérisées par une longue durée de vie et par la robustesse de leur réponse lorsqu'ils sont activés par leur antigène spécifique. Ainsi, ce phénomène d'amplification favorise le développement d'une allergie de plus en plus sévère lors de chacune des expositions subséquentes à l'allergène.

1.4.2.1.4 Chronicisation de l'inflammation

Dans l'asthme, un phénomène de chronicisation de l'inflammation a également lieu faisant en sorte qu'une inflammation persiste même en l'absence d'exposition à un allergène (Murdoch & Lloyd, 2010). Ce phénomène serait important puisqu'il est associé aux changements structurels dans les voies aériennes des individus atteints d'asthme (Homer & Elias, 2000). La chronicisation de l'inflammation serait induite par la réponse immunitaire en réaction tardive qui déclencherait une boucle d'autoamplification de l'inflammation via la sécrétion de plusieurs chimiokines et cytokines. De plus, le mécanisme d'amplification de la mémoire immunitaire pourrait également contribuer à la chronicisation de l'inflammation (Wu & Zarrin, 2014).

1.4.2.2 Types cellulaires impliqués dans l'immunologie de l'asthme

L'immunologie de l'asthme implique plusieurs types cellulaires qui sont activés de différentes manières et agissent en sécrétant diverses cytokines (P. J. Barnes, 2008).

1.4.2.2.1 Mastocytes

Les mastocytes sont principalement localisés dans la muqueuse des voies aériennes (N. G. Carroll, Mutavdzic, & James, 2002). Cette localisation est assurée par l'épithélium qui sécrètent du « Stem cell factor » (SCF), un agent chimioattractant pour les mastocytes (Da Silva, Reber, & Frossard, 2006). Dans la paroi aérienne d'individus atteints d'asthme, les mastocytes peuvent également être localisés dans la couche de MLVA (Brightling et al., 2002). Le mastocyte a un rôle important dans l'asthme puisque, d'une part, son recouvrement par des IgE est la résultante de la phase de sensibilisation et que, d'autre part, son activation est impliquée dans la phase de réactivation, et ce, autant dans la réaction immédiate que tardive (Amin, 2012; Galli & Tsai, 2012). L'activation est généralement causée par la reconnaissance de l'allergène via les IgE associés aux récepteurs FcεRI exprimés à la surface du mastocyte (Matsuda et al., 2008). Lors de la réaction immédiate, le mastocyte libère plusieurs bronchoconstricteurs tels que l'histamine, les

leucotriènes C4, D4 et E4 ainsi que la prostaglandine D2 qui donnent lieu à l'obstruction des voies aériennes. Dans la réaction tardive, les mastocytes sont également impliqués en déclenchant une réponse inflammatoire via la libération de cytokines inflammatoires (Nagai et al., 2000).

1.4.2.2.2 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles localisées dans l'épithélium des voies aériennes (Lambrecht & Hammad, 2009; van Helden & Lambrecht, 2013; van Rijt & Lambrecht, 2005). Ce type cellulaire est autant impliqué dans la phase de sensibilisation que dans la phase de réactivation. Lors de la phase de sensibilisation, les cellules dendritiques captent l'antigène, l'apprêtent et le présentent aux cellules T CD4+ naïves favorisant leur différenciation en cellules Th2. Lors de la phase de réactivation, les cellules dendritiques sont importantes dans la génération d'une inflammation lorsqu'ils sont activés par l'allergène inhalé. En effet, ces cellules dendritiques sous l'influence du « thymic stromal lymphopoietin » (TSLP) sécrété par les mastocytes et les cellules épithéliales vont sécréter des chimiokines qui vont recruter de nouvelles cellules Th2, entre autres, via le récepteur « CC chemokine receptor 4 » (CCR4) (Liu, 2006).

1.4.2.2.3 Éosinophiles

Les éosinophiles sont un marqueur typique de l'inflammation dans les voies aériennes de sujets asthmatiques (Busse & Sedgwick, 1992). Ils sont recrutés et activés dans les voies aériennes lors de la réaction immunitaire par des chimiokines et des cytokines libérées par les cellules épithéliales et les cellules Th2. Par exemple, une surexpression d'IL-5 dans un contexte d'asthme pourrait être responsable de l'instauration d'une inflammation de type éosinophilique, et ce, en régulant la prolifération, la maturation, l'activation, le recrutement et la survie des éosinophiles (Humbert et al., 1997; Lopez et al., 1986). Néanmoins, Le rôle exact des éosinophiles dans l'asthme n'est pas clair. Les éosinophiles semblent impliqués dans l'hyperréactivité bronchique comme le suggèrent de nombreuses études

réalisées sur des modèles murins d'asthme (Kim & Lee, 2009; J. J. Lee et al., 2004; Ohtomo et al., 2010; Shen et al., 2003).

1.4.2.2.4 Lymphocytes T

Les lymphocytes Th2 représentent le principal sous-type de lymphocyte retrouvé dans les voies aériennes des asthmatiques (Robinson et al., 1992). À la suite de l'exposition des voies aériennes à un allergène, les lymphocytes sont recrutés et activés par les cellules dendritiques (Gaurav & Agrawal, 2013; Liu, 2006). Les lymphocytes Th2 vont par la suite sécréter des cytokines inflammatoires importantes (IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13) dans l'établissement et la persistance de l'inflammation dans les voies aériennes (Wills-Karp, 1999). L'IL-4 et L'IL-13 stimulent la production d'IgE, tandis que l'IL-5 et IL-9 sont impliqués dans le recrutement et l'activation des éosinophiles.

Également, les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 ou Th17 ont également été associés à des types plus sévères d'asthme dans certains sous-groupes d'individus atteints d'asthme (Bullens et al., 2006; Chakir et al., 2003; C. M. Lloyd & Hessel, 2010; Shannon et al., 2008; Voraphani et al., 2014). Par ailleurs, les cellules T régulatrices (Treg) sont des régulateurs importants des lymphocytes T CD4⁺ et la dérégulation de certains sous-types de Treg pourraient être impliqués dans le développement de l'asthme (L. P. Boulet, Turcott, Plante, & Chakir, 2012; Clare M. Lloyd & Hawrylowicz, 2009).

1.4.2.2.5 Cellules B

Les cellules B sont particulièrement importantes dans l'asthme par leur production d'IgE sous l'influence de l'IL-4 et de l'IL-13 (P. J. Barnes, 2008; Gould & Sutton, 2008). Les IgE vont s'associer aux récepteurs FcεRI à la surface des mastocytes et permettre leur dégranulation rapide lors des expositions subséquentes, déclenchant ainsi la réponse inflammatoire (Amin, 2012). De plus, les IgE peuvent également contribuer à la présentation d'antigène en favorisant ce processus via les récepteurs FcεRI à la surface des monocytes et des cellules dendritiques (Maurer et al., 1995).

Le rôle des IgE dans l'inflammation peut être démontré par un anticorps monoclonal qui inhibe son effet. En effet, l'omalizumab atténue considérablement la réponse des voies aériennes à un allergène ainsi que l'inflammation dans celles-ci (Avila, 2007).

1.4.2.2.6 Cellules structurelles

Les cellules épithéliales des voies aériennes activées dans un contexte d'asthme sécrètent des médiateurs impliqués dans la réponse Th2, en particulier les alarmines IL-25, IL-33 et TSLP (Mitchell & O'Byrne, 2017; Nagarkar et al., 2012).

Le MLVA et les fibroblastes peuvent également être impliqués dans l'inflammation des voies aériennes en sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires (Damera, Tliba, & Panettieri, 2009; Fries et al., 1994).

1.4.2.2.7 Autres types cellulaires

Les macrophages expriment le récepteur Fc de faible affinité pour les IgE (FcεRII) et peuvent être recrutés dans les voies aériennes dans un contexte d'asthme (Joseph et al., 1983). Néanmoins, le rôle des macrophages dans l'asthme n'est pas clair puisqu'ils peuvent avoir un profil pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire selon le contexte (Balhara & Gounni, 2012).

Certains patients atteints d'asthme présentent une inflammation qui est plutôt neutrophilique au lieu de l'inflammation classique éosinophilique (John V. Fahy, 2009). L'asthme chez ces individus est généralement plus sévère et répond moins bien aux corticostéroïdes inhalés (Moore et al., 2014; Trejo Bittar, Yousem, & Wenzel, 2015).

Récemment, un nouveau type de cellules immunitaires a été caractérisé et associé au développement de l'asthme (Spits et al., 2013). Les « Innate lymphoid cells » (ILCs) sont caractérisées par une origine lymphocytaire, mais n'expriment pas les récepteurs aux antigènes des lymphocytes B et T (Moro et al., 2010; Neill et al., 2010). Ils seraient plutôt activés de façon non spécifique en réponse à des signaux

de danger. Dans un contexte d'asthme, les ILC2s pourraient contribuer à l'inflammation et à l'hyperréactivité bronchique induites par les allergènes en sécrétant des médiateurs inflammatoires de type 2 (Barlow et al., 2012; Gold et al., 2014; Halim, Krauss, Sun, & Takei, 2012; Halim et al., 2014; Klein Wolterink et al., 2012).

1.4.3 Remodelage des voies aériennes

1.4.3.1 Causes du remodelage

Les causes du remodelage font l'objet de plusieurs études. Le remodelage pourrait être causé par l'inflammation chronique et le stress mécanique induit à la paroi aérienne par les bronchoconstrictions répétées dans un contexte d'asthme.

1.4.3.1.1 Inflammation

L'importance de l'inflammation dans le processus de remodelage peut être démontrée par certains effets anti-remodelage de la prise de corticostéroïdes inhalés (Feltis et al., 2007; Lundgren, Soderberg, Horstedt, & Stenling, 1988; Ward et al., 2002). L'hypothèse générale stipule que l'inflammation chronique des voies aériennes cause des dommages tissulaires qui sont suivis par une phase de réparation associée à l'accumulation d'aberrations structurelles. Lors de la phase de réparation, plusieurs types cellulaires sécrètent des facteurs de croissance tels que le « Transforming growth factor beta » (TGF β) qui guident ce processus de remodelage (Halwani, Al-Muhsen, Al-Jahdali, & Hamid, 2011).

1.4.3.1.2 Bronchoconstriction

Dans les dernières années, un nouveau dogme concernant le remodelage a émergé. Celui-ci stipule que les bronchoconstrictions associées aux exacerbations de l'asthme pourraient contribuer dans le remodelage des voies aériennes (R. Gosens & Grainge, 2015). Ce dogme a été suggéré à la suite de l'observation que des tests de provocation à la métacholine (MCh) répétés chez des sujets humains

atteints d'asthme peuvent produire des changements structuraux dans les voies aériennes (Grainge et al., 2011). L'observation des effets anti-remodelages d'anticholinergiques à longue durée d'action chez des modèles animaux d'asthme supportent également ce dogme (Bos et al., 2007; Kang et al., 2012; L. E. Kistemaker et al., 2014). Néanmoins, jusqu'à présent, aucune étude n'a évalué l'effet de bronchoconstrictions en l'absence d'inflammation sur le remodelage des voies aériennes. Le mécanisme sous-jacent à l'effet proremodelage des bronchoconstrictions reste également à étudier. Des études cellulaires suggèrent que les cellules épithéliales et les fibroblastes pourraient modifier leur comportement et produire des facteurs de croissance proremodelage en réponse au stress mécanique induit par les bronchoconstrictions (Ludwig et al., 2004; Park et al., 2015; Tschumperlin & Drazen, 2001; Tschumperlin et al., 2002).

1.4.3.2 Caractéristiques du remodelage

Les études histologiques de tissus excisés des voies aériennes de sujets atteints d'asthme ont permis l'observation de plusieurs altérations d'un point de vue structurel dans ces tissus (Figure 1.7). Ces changements structuraux affectent typiquement l'épithélium, les cellules sécrétrices de mucus, la membrane basale, le MLVA, matrice extracellulaire ainsi que les vaisseaux sanguins (Céline Bergeron, Tulic, & Hamid, 2010; Bosse, Pare, & Seow, 2008; Bosse, Riesenfeld, Pare, & Irvin, 2010; Halwani, Al-Muhsen, & Hamid, 2010; P. K. Jeffery, 2001).

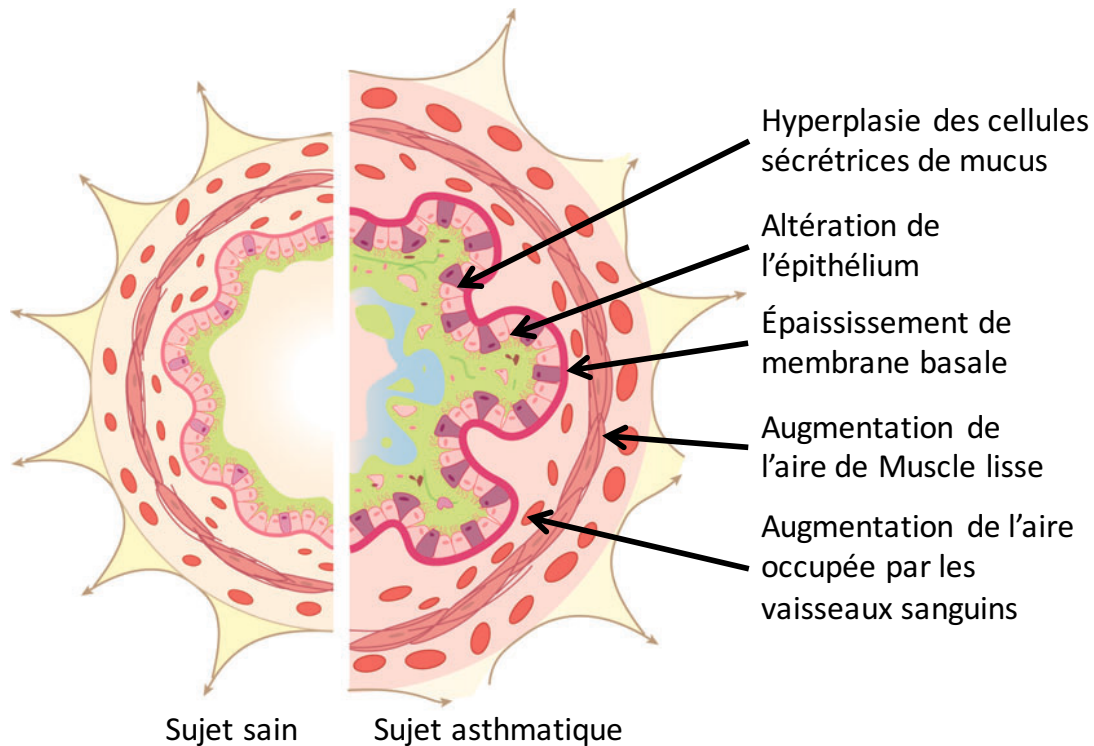


Figure 1.7: Remodelage des voies aériennes. La structure des voies aériennes de sujets atteints d'asthme est caractérisée par plusieurs changements dont l'hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus, l'altération de l'épithélium, l'épaississement de la membrane basale, l'augmentation de l'aire du MLVA ainsi que l'augmentation de l'aire occupée par les vaisseaux sanguins. Reproduit de : (Bosse et al., 2010)

1.4.3.2.1 Altération de l'épithélium

Chez certains individus atteints d'asthme, l'épithélium des voies aériennes semble altéré faisant en sorte que des cellules épithéliales se détachent de la paroi bronchique (Barbato et al., 2006; N. Carroll, Elliot, Morton, & James, 1993). Ces caractéristiques de l'épithélium pourraient être causées par un taux de renouvellement élevé des cellules épithéliales ainsi que par une altération de leurs jonctions serrées (Bucchieri et al., 2002; Trautmann et al., 2005; Wan et al., 2000).

1.4.3.2.2 Hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus

L'obstruction des voies aériennes peut être favorisée par une sécrétion excessive de mucus dans un contexte d'asthme. Cette hypersécrétion peut être occasionnée par une hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus. En effet, l'analyse histologique de tissus bronchique provenant de sujets asthmatiques suggère que

ceux-ci sont caractérisés par une augmentation du nombre de cellules à gobelet et par une hypertrophie des glandes muqueuses (Aikawa, Shimura, Sasaki, Ebina, & Takishima, 1992; Ordonez et al., 2001).

1.4.3.2.3 Fibrose sous-épithéliale

La structure sous-jacente à l'épithélium respiratoire semble également être altérée. Cette altération se manifeste par un épaississement de celle-ci qui semble être causée par un changement dans sa composition (N. Carroll et al., 1993; Payne et al., 2003; Ward et al., 2002). Certaines protéines structurelles sont en plus grande quantité telles que le collagène, la décorine, la laminine et la tenascine tandis que l'élastine semble être en moins grande quantité (Altraja et al., 1996; de Medeiros Matsushita et al., 2005; Huang, Olivenstein, Taha, Hamid, & Ludwig, 1999; Roche, Beasley, Williams, & Holgate, 1989; Westergren-Thorsson, Chakir, Lafreniere-Allard, Boulet, & Tremblay, 2002). Cette composition altérée serait probablement causée par un changement de patron de déposition par les fibroblastes et les myofibroblastes (Brewster et al., 1990; Westergren-Thorsson et al., 2002).

1.4.3.2.4 Augmentation de l'aire de muscle lisse respiratoire

Un changement qui semble particulièrement marquant dans les bronches des sujets atteints d'asthme est l'augmentation de l'aire de MLVA (Ebina, Takahashi, Chiba, & Motomiya, 1993; Ebina, Yaegashi, Takahashi, Motomiya, & Tanemura, 1990; Woodruff et al., 2004). Ce changement structurel peut être le résultat d'une hyperplasie, c.-à-d. une augmentation du nombre de cellules, d'une hypertrophie, c.-à-d. d'une augmentation de la taille des cellules et d'une augmentation de matrice extracellulaire entre les cellules musculaires lisses (James et al., 2012).

1.4.3.2.5 Augmentation de l'aire occupée par les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins provenant de spécimens de bronches prélevés de sujets asthmatiques semblent également occuper une plus grande surface (X. LI & WILSON, 1997; Tanaka et al., 2003). La dilatation et la congestion des vaisseaux sanguins peuvent expliquer cette augmentation de l'espace occupé par les

vaisseaux sanguins (Wagner & Mitzner, 1996). L'angiogenèse, c.-à-d. la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, peut aussi être impliquée dans cet aspect du remodelage. Cette angiogenèse semble être guidée par le « vascular endothelial growth factor » VEGF qui est un facteur proangiogénique très puissant surexprimé dans un contexte d'asthme (Hoshino, Takahashi, & Aoike, 2001).

1.4.3.3 Conséquence du remodelage des voies aériennes

D'une part, le remodelage est un mécanisme dont l'intention initiale est de réparer des dommages tissulaires afin de préserver l'intégrité structurelle des parois aériennes. D'autre part, une mauvaise réparation des dommages tissulaires peut mener à la formation d'altérations importantes associées à une aggravation de l'asthme. Ainsi, les mécanismes du remodelage des voies aériennes peuvent avoir des effets protecteurs et des effets néfastes dans un contexte d'asthme (McParland, Macklem, & Pare, 2003).

1.4.3.3.1 Effets protecteurs du remodelage

Certains changements structuraux des voies aériennes semblent avoir des effets protecteurs dans un contexte d'asthme. Par exemple, le dépôt de protéines structurelles augmente théoriquement la charge opposée au MLVA pouvant diminuer l'effet de la contraction du MLVA sur l'obstruction des voies aériennes (Palman, Kips, & Pauwels, 2000). Également, l'hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus qui favorise l'augmentation de sécrétion de mucus peut avoir un effet protecteur. En effet, le mucus peut jouer son rôle physiologique de barrière physique limitant l'accès des irritants des voies aériennes à l'épithélium et d'ainsi diminuer leurs effets (John V. Fahy & Dickey, 2010).

1.4.3.3.2 Effets néfastes du remodelage

Les conséquences néfastes du remodelage des voies aériennes semblent avoir plus d'importance que celles bénéfiques comme le suggère la corrélation entre certains aspects du remodelage avec la sévérité de l'asthme ainsi qu'avec l'hyperactivité bronchique (Benayoun, Druilhe, Dombret, Aubier, & Pretolani, 2003; L.-P. Boulet et

al., 1997; Chetta et al., 1997; P. K. Jeffery, Wardlaw, Nelson, Collins, & Kay, 1989; Little et al., 2002). En effet, le remodelage donnerait lieu à un asthme dont l'obstruction est de plus en plus persistante et de moins en moins réversible par la prise de bronchodilatateurs. Le remodelage peut favoriser l'obstruction des voies aériennes de différentes manières. L'hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus et celle des cellules épithéliales favorisent respectivement l'accumulation de mucus et de cellules dans la lumière bronchique (James & Wenzel, 2007). L'épaississement de la paroi aérienne peut diminuer le calibre des voies aériennes par un effet géométrique et l'augmentation de sa rigidité peut diminuer l'effet bronchodilatateur du MLVA (Fredberg, 2001). De plus, différentes composantes peuvent favoriser l'hyperréactivité bronchique, et ce, de plusieurs manières.

1.4.4 Hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique est une autre composante impliquée dans l'asthme qui corrèle avec sa sévérité (Fowler, Dempsey, Sims, & Lipworth, 2000). Celle-ci est définie comme une obstruction excessive des voies aériennes en réponse à des stimuli. Lors d'un test de provocation à la métacholine (MCh), l'augmentation de : 1- la sensibilité des voies aériennes; 2- la réactivité des voies aériennes; et 3- la réponse maximale représentent les trois paramètres qui peuvent caractériser l'obstruction des voies aériennes chez les sujets atteints d'asthme en réponse à un allergène ou à un bronchoconstricteur (O'Byrne & Inman, 2003) (Figure 1.8). L'hyperréactivité bronchique n'est pas suffisante pour causer des symptômes respiratoires puisque plusieurs sujets dans la population générale sont caractérisés par une hyperréactivité bronchique des voies aériennes sans avoir de symptômes (L. P. Boulet, 2003).

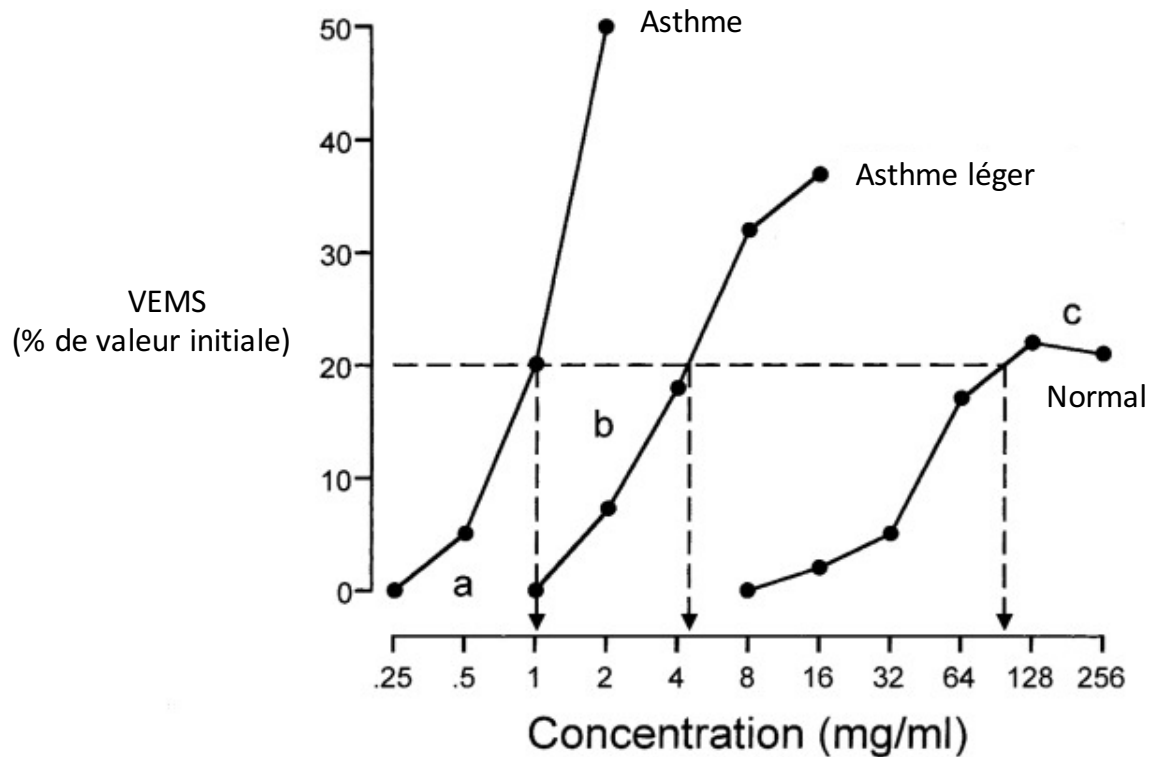


Figure 1.8 : Hyperréactivité bronchique. Lors du test de provocation à la MCh, les voies aériennes des sujets asthmatiques sont hypersensibles, c.-à-d. qu'elles répondent à de plus petites concentrations de MCh et elles sont hyperréactives, c.-à-d. qu'elles répondent plus intensément lorsque les concentrations sont augmentées. La concentration de MCh produisant une chute de 20 % du VEMS (CP₂₀) est la mesure clinique généralement utilisée pour quantifier la réactivité bronchique. Reproduit de : (O'Byrne & Inman, 2003)

1.4.4.1 Causes de l'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique semble être de causes multiples impliquant, d'une part l'inflammation des voies aériennes et, d'autre part, le remodelage des voies aériennes.

1.4.4.1.1 Inflammation

Plusieurs études suggèrent que l'inflammation pourrait être impliquée dans l'hyperréactivité bronchique. En effet, l'hyperréactivité bronchique chez les sujets asthmatiques semble généralement aggravée lors des périodes saisonnières d'exposition au pollen et lorsqu'ils sont préalablement mis en contact avec un allergène (L. P. Boulet et al., 1983; Cockcroft, Ruffin, Dolovich, & Hargreave, 1977). Le nombre de mastocytes infiltrant la couche de MLVA de sujets atteints d'asthme corrèle avec l'hyperréactivité bronchique (Brightling et al., 2002). De plus, la prise

de corticostéroïdes inhalés permet de diminuer la réactivité bronchique des sujets atteints d'asthme (van Grunsven, van Schayck, Molema, Akkermans, & van Weel, 1999). Néanmoins, les mécanismes expliquant l'influence de l'immunité sur l'hyperréactivité bronchique restent à être élucidés et sont actuellement les sujets d'intenses recherches de plusieurs chercheurs. Par exemple, récemment, dans un modèle murin d'asthme, il a été démontré que le CD34 exprimé par plusieurs types cellulaires incluant des cellules immunitaires seraient nécessaire pour le développement de l'hyperréactivité bronchique dans les jours suivant un épisode inflammatoire (Lortie et al., 2018).

L'inflammation chronique libère plusieurs médiateurs de la contractilité qui pourraient être impliqués dans l'hyperréactivité bronchique (Bosse, 2012). Par exemple, l'IL-13 aurait comme effet de potentialiser l'effet des bronchoconstricteurs (Farghaly, Blagbrough, Medina-Tato, & Watson, 2008). De plus, l'ensemble des bronchoconstricteurs libérés par les cellules immunitaires pourraient être impliqués dans le développement de l'hyperréactivité bronchique en favorisant un tonus du MLVA de concert avec l'innervation parasympathique. Ainsi, il a été démontré, in vitro et in vivo, chez des souris que le tonus musculaire favorise la contraction excessive du MLVA et l'augmentation de la réactivité bronchique, et ce, autant chez l'humain que chez la souris (Gazzola et al., 2017; Lee-Gosselin, Gendron, Blanchet, Marsolais, & Bosse, 2015).

1.4.4.1.2 Remodelage des voies aériennes

L'hyperréactivité bronchique peut également être favorisée par une structure des voies aériennes altérée prédisposant à l'obstruction excessive des voies aériennes en réponse à un stimulus. Certains aspects du remodelage des voies aériennes corrént avec l'hyperréactivité bronchique (L.-P. Boulet et al., 1997; P. K. Jeffery et al., 1989). L'augmentation de l'aire de MLVA pourrait donner lieu à une augmentation de sa force et, par conséquent, à une augmentation de l'obstruction des voies aériennes lorsqu'il est activé. Néanmoins, la littérature est ambiguë par rapport à l'augmentation de stress (force par unité de surface transversale) généré

par le MLVA chez les sujets asthmatiques. Certaines études suggèrent que les muscles lisses des voies aériennes de sujets asthmatiques *in vitro* génèreraient un plus grand stress comparativement à ceux de sujets non asthmatiques, tandis que d'autres études n'observent pas cette différence (T. R. Bai, 1991; Bjorck, Gustafsson, & Dahlen, 1992; L. Y. Chin et al., 2012; Goldie, Spina, Henry, Lulich, & Paterson, 1986; Whicker, Armour, & Black, 1988). Récemment, il a été suggéré que ce serait plutôt la vitesse de raccourcissement du MLVA qui serait impliqué dans l'hyperréactivité bronchique des sujets asthmatiques (Bullimore et al., 2011). L'altération de la perméabilité des cellules épithéliales peut théoriquement faciliter l'accès des agents inhalés aux tissus sous-jacent et ainsi augmenter leurs effets (Céline Bergeron, Al-Ramli, & Hamid, 2009).

1.4.5 Hétérogénéité dans l'asthme

Plusieurs prédispositions génétiques interagissant avec plusieurs facteurs environnementaux donnent lieu à une grande hétérogénéité de l'asthme, et ce, autant entre les individus qu'à l'intérieur des individus.

1.4.5.1 Hétérogénéité entre les individus

Plusieurs types d'asthme, dont les exacerbations sont provoquées par différents stimuli, sont associés à différentes réponses aux traitements (Wenzel, 2012). Les mécanismes de réponse immunitaires impliqués dans l'asthme varient également entre les individus. La réponse immunitaire dans la plupart des individus atteints d'asthme est de type Th2 tandis que d'autres individus développeraient une réponse immunitaire différente (J. V. Fahy, 2015). Il y a aussi une hétérogénéité entre les individus en ce qui concerne l'implication et la nature du remodelage des voies aériennes dans la pathologie (Little et al., 2002).

1.4.5.2 Hétérogénéité à l'intérieur d'un individu

À l'intérieur d'un individu atteint d'asthme, il y a une hétérogénéité spatiale dans les zones de l'arbre bronchique, tant en ce qui concerne l'état inflammatoire que l'état structurel. Cette hétérogénéité est amplifiée lors des exacerbations et peut

sérieusement affecter la ventilation (Brown, 2004; Downie et al., 2007; Harris et al., 2006; King, Eberl, Salome, Meikle, & Woolcock, 1997; King, Eberl, Salome, Young, & Woolcock, 1998; Kotaru et al., 2005; Pascoe, Seow, Hackett, Pare, & Donovan, 2017; Tgavalekos et al., 2007; Venegas et al., 2005). Par conséquent, un individu atteint d'asthme est aussi marqué par une hétérogénéité temporelle. Les modifications de l'inflammation et du remodelage dans le temps vont donner lieu soit à l'aggravation ou à l'amélioration de l'asthme (de Lange et al., 2009; Svenningsen et al., 2014).

1.5 Diagnostic et évaluation clinique de l'asthme

Le diagnostic de l'asthme est principalement basé sur l'histoire clinique, l'examen physique et des tests diagnostiques (Tarasidis & Wilson, 2015). D'autres outils cliniques peuvent être utilisés pour évaluer l'impact des différentes composantes de l'asthme.

1.5.1 Symptomatologie et signes cliniques

Les symptômes de l'asthme tels que la dyspnée, la toux, l'oppression thoracique, la respiration sifflante ainsi que les expectorations sont intermittents et peuvent être associés à une histoire d'exposition à un allergène (Tarasidis & Wilson, 2015). À l'auscultation, le clinicien entend généralement des sons sibilants diffus. De plus, le patient peut présenter une hyperinflation pulmonaire et une ventilation augmentée (Lavietes, 1984; Woolcock, Rebuck, Cade, & Read, 1971).

1.5.2 Fonctions pulmonaires

Plusieurs outils cliniques permettent d'évaluer l'obstruction des voies aériennes. Le débit expiratoire de pointe (DEP) peut être mesuré à l'aide d'un débitmètre (J. T. Li, 1995). Cet outil offre l'avantage qu'il est simple d'utilisation pour le patient. Le patient peut réaliser les mesures seul sans l'aide d'un professionnel de la santé à différents moments de la journée faisant en sorte que la variabilité temporelle de l'obstruction

peut être caractérisée. Également, le débitmètre peut être utilisé pour évaluer la maîtrise de l'asthme au quotidien après l'initiation d'un traitement.

La mesure de la fonction pulmonaire par spirométrie consiste à demander au patient de réaliser différentes manœuvres respiratoires dans un appareil (Celli, 2000; Chhabra, 2015). Cet appareil mesure en continu le flux aérien expiré faisant en sorte qu'il peut dériver différents volumes et capacités pulmonaires selon la manœuvre demandée tels que le volume expiratoire maximal en 1s (VEMS) et la capacité vitale forcée (CVF) (Figure 1.9). Le VEMS est un indicateur de l'obstruction des voies aériennes fréquemment utilisé en clinique et le rapport de Tiffeneau qui met en relation le VEMS et la CVF permet de distinguer un cas de syndrome obstructif tel que l'asthme et la MPOC par rapport à un cas de syndrome restrictif tel que la fibrose pulmonaire (D'Urzo, Tamari, Bouchard, Jhirad, & Jugovic, 2011; Johns, Walters, & Walters, 2014). Ainsi, le rapport de Tiffeneau est peu changé dans les cas de fibrose et il est diminué dans les cas d'asthme et de MPOC (<0.7). La réversibilité du VEMS à la suite de la prise d'un bronchodilatateur permet de distinguer l'asthme des MPOC. Néanmoins, la spirométrie a certaines limites. Cette technique nécessite que le patient réalise des manœuvres respiratoires qui peuvent être difficiles à réaliser pour les patients atteints de maladies respiratoires sévères, les personnes âgées et les jeunes enfants (Jat, 2013). De plus, la manœuvre exigée lors de la mesure du VEMS nécessite la prise d'une inspiration profonde par le patient ayant un effet bronchodilatateur sur le MLVA faisant en sorte d'affecter le résultat (Orehek, Nicoli, Delpierre, & Beaupre, 1981). Finalement, la spirométrie ne permet pas d'évaluer les volumes et capacités pulmonaires non mobilisables tels que le volume résiduel (VR) et la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF).

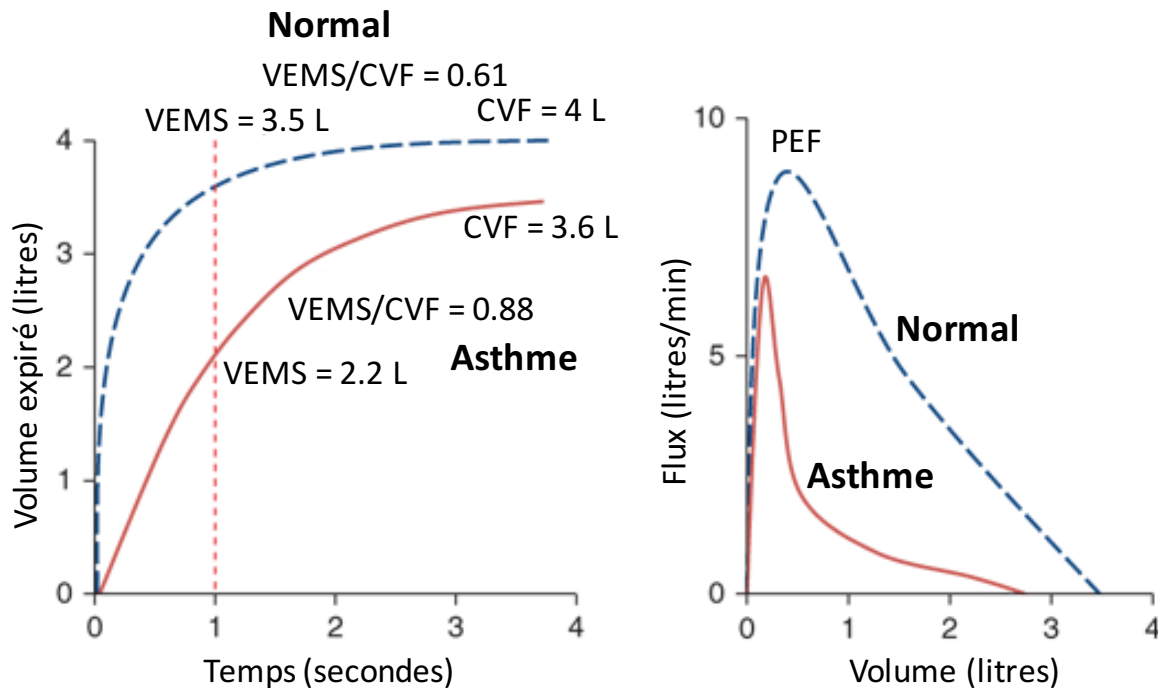


Figure 1.9 : La spirométrie. La spirométrie permet de démontrer la diminution du VEMS et du rapport de Tiffeneau chez les sujets asthmatiques. Également, une diminution du débit expiratoire de pointe peut être observée chez les sujets atteints d’asthme. Reproduit de : (Harrison & Kasper, 2006)

La pléthysmographie à corps entier peut quant à elle mesurer les volumes non mobilisables (Figure 1.10) et la résistance des voies aériennes lors de manœuvres respiratoires précises (DuBois, Botelho, & Comroe, 1956; Stocks, Godfrey, Beardsmore, Bar-Yishay, & Castile, 2001). Une augmentation du volume résiduel (VR) et de la capacité pulmonaire totale (CPT) chez les sujets asthmatiques peut être déterminée en pléthysmographie (Woolcock et al., 1971). Néanmoins, cette technique est rarement utilisée en clinique étant donné la difficulté des manœuvres exigées aux patients, la lourdeur de l’équipement nécessaire pour réaliser ces mesures ainsi que la faible valeur clinique des volumes non mobilisables dans le diagnostic et la prise en charge de l’asthme.

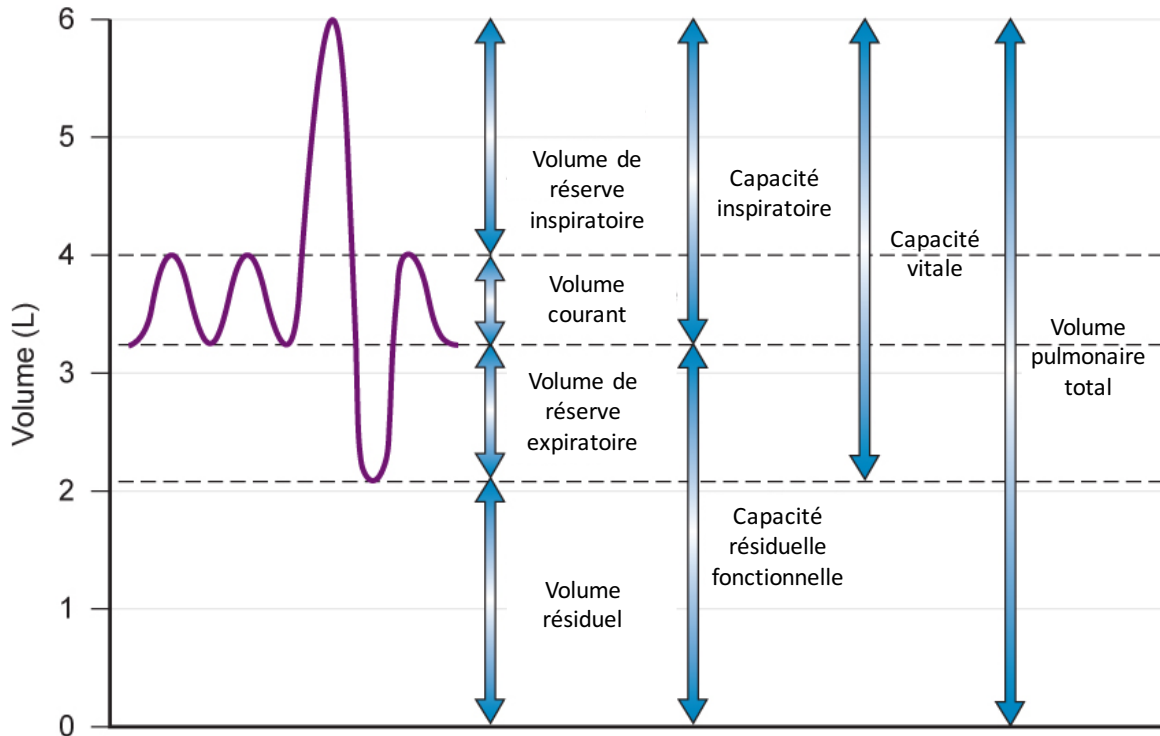


Figure 1.10 : Les volumes et réserves pulmonaires. La pléthysmographie à corps entier permet d'évaluer différents volumes et capacités pulmonaires. Reproduit de : (Carey, 2010)

La technique des oscillations forcées offre l'avantage qu'elle demande très peu de collaboration du patient et qu'elle permet d'aller chercher beaucoup plus d'informations sur la mécanique respiratoire (Bates & Suki, 2008; Goldman, 2001; Goldman, Saadeh, & Ross, 2005; Pride, 1992). Cette technique utilise un appareil qui induit des oscillations forcées dans le système respiratoire par le biais de la bouche. Les oscillations sont constituées d'une onde sinusoïdale à une seule fréquence ou d'un signal pseudoaléatoire composé de plusieurs ondes sinusoïdales à différentes fréquences. L'appareil mesure les changements de flux et de pressions à la bouche (Pride, 1992). À partir de ces mesures, l'appareil peut calculer l'impédance du système respiratoire (Z_{rs}) et déduire deux paramètres importants que sont la résistance (R_{rs}) et la réactance du système respiratoire (X_{rs}) aux différentes fréquences imposées (Figure 1.11). La résistance est un bon indicateur du calibre des voies respiratoires tandis que la réactance reflète à la fois l'inertance et la compliance du système respiratoires. Les différentes fréquences permettent d'évaluer ces paramètres à différentes profondeurs dans l'arbre bronchique et

d'évaluer le niveau d'hétérogénéité de l'obstruction. Néanmoins, cette technique est peu utilisée cliniquement principalement à cause du manque de données déterminant les meilleurs paramètres et seuils pour le diagnostic et le pronostic de l'asthme (Kaminsky, 2012).

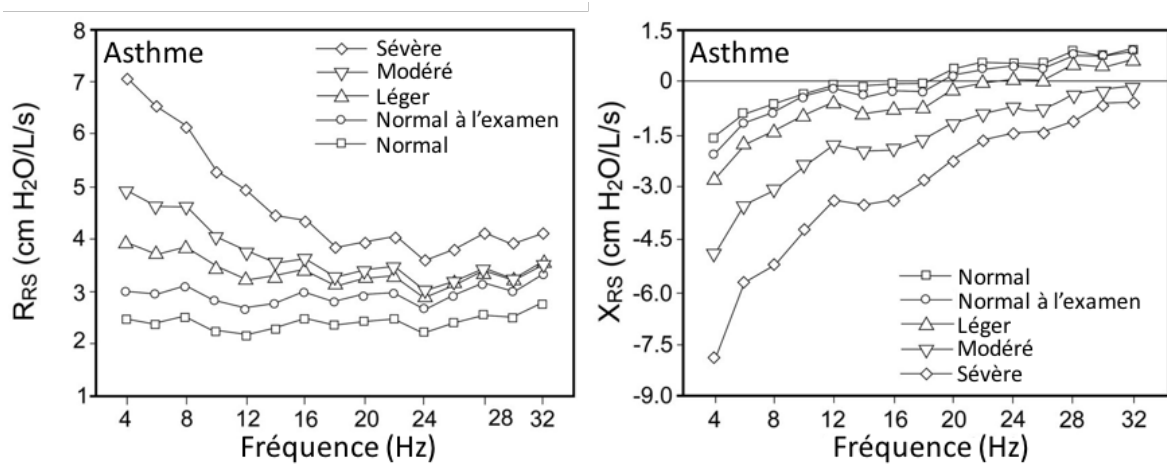


Figure 1.11 : Paramètres évalués par la technique des oscillations forcées. La technique des oscillations forcées permet d'évaluer la résistance (R_{rs}) et la réactance (X_{rs}) du système respiratoire à différentes fréquences afin d'aller chercher plusieurs informations sur la mécanique respiratoire. Les sujets asthmatiques sont caractérisés par une augmentation de la résistance des voies aériennes et par une diminution de la réactance dont l'ampleur dépend de la fréquence des oscillations forcées. Reproduit de : (Kaminsky, 2012)

1.5.3 Réactivité bronchique

Le test de réactivité bronchique a une valeur prédictive négative très élevée, soit d'environ 98%. Le test peut donc être utilisé comme un indice important afin d'exclure le diagnostic de l'asthme (Sistek et al., 2006). Néanmoins, la présence d'hyperréactivité bronchique n'est pas spécifique aux sujets atteints d'asthme. En effet, environ 30% des individus dans la société sont hyperréactifs asymptomatiques (L. P. Boulet, 2003; Jansen, Timens, Kraan, Rijcken, & Postma, 1997). Un test de réactivité bronchique est typiquement réalisé par l'inhalation de doses croissantes d'un bronchoconstricteur ou d'un allergène. Par la suite, l'effet de ces doses sur l'obstruction des voies aériennes est mesuré soit par la spirométrie via le VEMS ou la technique des oscillations forcée via le R_{rs} . Un individu est généralement

considéré hyperréactif lorsqu'il réagit à une concentration de moins de 8 mg/ml (Crapo et al., 2000). En spirométrie, c'est la concentration du produit inhalé donnant lieu à une diminution de 20% du VEMS (CP20) qui est utilisé comme indicateur de réponse des voies aériennes. C'est la concentration donnant lieu à une augmentation de 50% de la R_{rs} qui a été proposée pour la technique des oscillations forcées (Kaminsky, 2012; Ryan et al., 1981). Les études suggèrent que la technique des oscillations forcées serait plus sensible, mais moins spécifique que la technique de spirométrie pour le diagnostic de l'asthme (Kaminsky, 2012).

1.5.4 Test cutané d'allergie

Le test cutané d'allergie consiste à exposer la peau du patient à un allergène et d'observer s'il y a développement d'une réponse inflammatoire (rougeur, œdème) (Heinzerling et al., 2005). Ce test peut être utilisé pour distinguer l'asthme atopique de celui non atopique.

1.5.5 Évaluation de l'inflammation

Lorsqu'activées dans un contexte d'asthme, les cellules éosinophiles sécrètent du monoxyde d'azote (NO). Ainsi, la mesure du NO expiré à l'aide d'un appareil permet de quantifier l'activité des cellules éosinophiles (Dweik et al., 2011). Cette quantification de l'activité des éosinophiles peut être utilisée pour évaluer le type d'inflammation présente dans les voies aériennes d'un sujet pour guider l'approche thérapeutique qui sera priorisée dans un contexte d'asthme sévère. De plus, la mesure de NO expiré peut être utilisée pour évaluer l'efficacité des corticostéroïdes administrés au sujet. Cette technique offre l'avantage d'être peu invasive.

Également, il est possible d'utiliser la technique des expectorations induites pour évaluer l'inflammation présente dans les voies aériennes de sujets asthmatiques (Louis et al., 2003). Cette technique consiste à administrer une solution saline hypertonique dans les voies aériennes du sujet et de lui demander d'expectorer. Il est ensuite possible de faire la quantification absolue et différentielle des cellules immunitaires présentes dans les expectorations en microscopie. Cette technique

offre l'avantage d'évaluer tous les types cellulaires impliqués dans l'inflammation. Néanmoins, il n'est pas clair si le contenu des expectorations est réellement représentatif de l'inflammation à l'intérieur de la lumière bronchique et encore moins de l'inflammation dans la paroi des voies aériennes. De plus, cette méthode est relativement exigeante pour le patient.

1.5.6 Évaluation du remodelage des voies aériennes

Il est inhabituel d'évaluer le remodelage des voies aériennes puisque le traitement de l'asthme est surtout basé sur le contrôle des symptômes et ne prend pas en considération ce paramètre. Les difficultés associées aux différentes techniques de quantification du remodelage sont également responsables de la sous-utilisation clinique de ces techniques. Néanmoins, plusieurs outils pour évaluer le remodelage des voies aériennes sont actuellement utilisés en recherche (C. Bergeron, Tulic, & Hamid, 2007; P. Jeffery, Holgate, & Wenzel, 2003; Pepe et al., 2005; Wilson & Li, 1997).

Il est possible de faire une analyse histologique d'une biopsie bronchique prélevée des voies aériennes d'un sujet pour visualiser et évaluer la composition structurale du tissu (P. Jeffery et al., 2003). Cependant, cette méthode a certains désavantages qui rendent son utilisation clinique difficile à appliquer (Bullone, Chevigny, Allano, Martin, & Lavoie, 2014). Cette technique est relativement invasive, nécessite une expertise et consomme énormément de temps lors de l'analyse. De plus, cette technique est en partie dépendante de la qualité de l'échantillon. Le remodelage des voies aériennes est un phénomène hétérogène dans l'arbre faisant en sorte qu'une seule biopsie prélevée n'est pas nécessairement représentative de l'ensemble de l'arbre bronchique (Pascoe et al., 2017).

Des techniques d'imagerie peuvent également être utilisées pour évaluer le remodelage des voies aériennes soit par l'utilisation de la tomographie assistée par ordinateur (« computed tomography » ou « CT-scan ») ou par l'utilisation de l'ultrasonographie endobronchique (« endobronchial ultrasonography » ou « EBUS ») (Nakano et al.,

2002; Soja et al., 2009). La tomodensitométrie offre l'avantage d'être moins invasive et de consommer moins de temps. Cependant, la tomodensitométrie ne permet pas de distinguer les différents types tissulaires impliqués dans le remodelage. En contrepartie, la technique EBUS de quantifier relativement bien différents tissus selon leur opacité. L'EBUS consiste à insérer une sonde par bronchoscopie dans l'arbre bronchique qui va émettre des ultrasons sur les parois aériennes. Ainsi, cette technique est relativement invasive. Cependant, elle permet aussi d'aller chercher des images à plusieurs endroits dans l'arbre bronchique (Bullone, Beauchamp, Godbout, Martin, & Lavoie, 2015). Bref, la technique des ultrasons est plus sensible que celle utilisant la tomodensitométrie (Gorska et al., 2016).

Dernièrement, des techniques physiologiques ont été utilisées afin d'évaluer le remodelage des voies aériennes. Par exemple, il est possible d'évaluer indirectement le remodelage des voies aériennes à l'aide de la mesure de distensibilité des voies aériennes obtenue par la technique des oscillations forcées (Samuel Mailhot-Larouche et al., 2017). Le principe sous-jacent à cette technique est que la conductance du système respiratoire (Grs) mesurée par la technique des oscillations forcées est un bon indicateur du calibre des voies aériennes. La distensibilité peut donc être estimée en mesurant les changements de Grs lors d'excursions du volume pulmonaire. Étant donné que le remodelage rigidifie les voies aériennes, il est attendu que la distensibilité diminue en fonction de l'intensité du remodelage. Cette technique offre l'avantage d'aller chercher une valeur objective qui, potentiellement, représente l'ensemble du remodelage dans l'arbre bronchique. De plus, cette technique est peu invasive. En revanche, cette technique demande la collaboration du sujet et nécessite des manœuvres respiratoires assez complexes. Un autre désavantage est qu'elle ne permet pas de distinguer les différents types de tissus impliqués dans le remodelage des voies aériennes.

1.6 Traitement de l'asthme

Actuellement, aucun traitement curatif n'existe pour l'asthme. En effet, la stratégie consiste plutôt à tenter de maîtriser l'asthme afin de limiter les symptômes actuels

et les risques futurs d'exacerbations et de complications (L.-P. Boulet, Boutin, Beaudesne, Ducharme, & Ringuette, 2016). En lien avec ces objectifs, deux grandes catégories de thérapie sont prodiguées aux patients atteints d'asthme soit : 1- les bronchodilatateurs qui permettent de limiter les symptômes; et 2- les thérapies de contrôle qui atténuent l'inflammation afin de limiter les risques futurs (Fanta 2009).

1.6.1 Bronchodilatateurs

Les bronchodilatateurs incluent les agonistes β_2 -adrénergiques et les anticholinergiques. Ces traitements agissent directement en relaxant le MLVA, faisant en sorte d'atténuer l'obstruction des voies aériennes et les symptômes associés. Cependant, ces traitements ont très peu d'effet sur l'évolution de la maladie puisque leur action principale n'est pas dans le contrôle de l'inflammation, mais dans le soulagement des symptômes induits par les bronchoconstrictions.

1.6.1.1 β_2 -agonistes

Le récepteur β_2 -adrénergique est un récepteur couplé aux protéines G exprimé à la surface des muscles lisses respiratoires qui représente la cible des médicaments de la famille des agonistes β_2 -adrénergiques (Nials et al., 1993). L'action endogène de ce récepteur est activé par les catécholamines circulantes (Barisione, Baroffio, Crimi, & Brusasco, 2010). L'activation du récepteur β_2 -adrénergique induit la relaxation du MLVA en activant la production d' adénosyl monophosphate cyclique (AMPC) par l'adénylate cyclase (Giembycz & Raeburn, 1991).

Les β_2 -agoniste à courte durée d'action (BACAs) tels que l'albuterol, le levalbuterol et le pirbuterol agissent rapidement soit en moins de 5 minutes, mais la durée d'action de ces médicaments est limitée, soit d'environ 4 à 6h (Nelson 1995). Généralement, ces médicaments sont administrés seulement au besoin comme thérapie de secours étant donné leur potentiel limité dans l'amélioration de

l'évolution de l'asthme. D'ailleurs, la prise de plusieurs doses de BACAs est un indicateur important d'un asthme mal maîtrisé.

Les β_2 -agoniste à longue durée d'action (BALAs) agissent sur le MLVA, soit en étant un agoniste complet du récepteur β_2 -adrénergique tel que le formoterol ou en étant un agoniste partiel tel que le salmétérol (Lötvall, 2001). Ces différents mécanismes d'actions sont associés à différents délais d'actions. En effet, le formoterol agit généralement dans les 5 minutes suivant la prise du traitement tandis que le salmétérol peut prendre de 15 à 20 minutes avant d'agir (Palmqvist et al., 1997). Ces médicaments ont la particularité d'induire un effet bronchodilatateur qui peut durer plus de 12h (Pearlman et al., 1992). La raison de cette durée d'action prolongée reste à être élucidée puisque le temps de dissociation ne semble pas être le facteur déterminant (Sykes & Charlton, 2012). Cliniquement, la prise seule d'un BALA n'est pas recommandée étant donné leur potentiel de camoufler les symptômes sans agir significativement sur l'inflammation sous-jacente. Ainsi, ils doivent toujours être jumelés à un corticostéroïde inhalé à l'intérieur d'un appareil d'inhalation (Nelson, 2001).

1.6.1.2 Anticholinergiques

Dans un contexte d'asthme, une partie de la bronchoconstriction induite par la contraction du MLVA est causée par la présence d'acétylcholine libérée principalement par les nerfs parasympathiques (P. J. Barnes, 1993; Canning & Fischer, 2001). Les anticholinergiques sont des antagonistes des récepteurs muscariniques. Sur le MLVA, les anticholinergiques agissent en bloquant l'activation du récepteur muscarinique M3 (M3R) (Roffel, Elzinga, & Zaagsma, 1990).

Les anticholinergiques à courte durée d'action tels que l'ipratropium sont associés à un délai d'action plus long que les BACAs ainsi qu'à une moins grande efficacité dans l'atténuation des symptômes de l'asthme (Rebuck et al., 1987). Ainsi, ils sont très peu utilisés dans le traitement de l'asthme.

Néanmoins, selon les dernières études cliniques, les anticholinergiques à longue durée d'action qui sont caractérisés par une vitesse de dissociation du récepteur plus lente tels que le bromure de tiotropium semble avoir une efficacité comparable à celle des BALAs (Busse, Dahl, Jenkins, & Cruz, 2016; Casarosa et al., 2009; Disse, Speck, Rominger, Witek, & Hammer, 1999). Ainsi, ces médicaments relancent l'intérêt pour les anticholinergiques dans le traitement de l'asthme (Busse et al., 2016). Actuellement, ces médicaments sont seulement utilisés dans les cas d'asthmes sévères et réfractaires aux BALAs (Rodrigo & Castro-Rodriguez, 2005).

1.6.2 Thérapies de contrôle

Les thérapies de contrôle offrent la possibilité d'assurer au patient une diminution des risques futurs d'exacerbation et de complications en agissant sur l'inflammation des voies aériennes.

1.6.2.1 Corticostéroïdes inhalés

L'arrivée des corticostéroïdes inhalés (CSIs) fut révolutionnaire dans le traitement de l'asthme et diminua de façon importante la mortalité causée par ce désordre respiratoire (Suissa & Ernst, 2001). Ces médicaments agissent principalement en activant l'histone déacétylase via les récepteurs aux glucocorticoïdes ayant comme finalité de réprimer la transcription de plusieurs cytokines inflammatoires (van der Velden, 1998). Étant donné le spectre d'action large de ces médicaments, ceux-ci fonctionnent généralement très bien dans le traitement de l'asthme, et ce, malgré l'hétérogénéité interindividuelle des molécules inflammatoires impliquées dans l'asthme. Ainsi, ils sont très rapidement inclus dans le traitement de l'asthme (Barnes 1995). De plus, ces médicaments ont peu d'effets secondaires étant donné le mode d'administration. Lors de la prise de CSI, la majorité du médicament (80%) se retrouve dans le système digestif et est rapidement métabolisé par le foie (Szeffler, 1991). La proportion du médicament qui se retrouve dans les voies aériennes peut agir localement au site d'inflammation en ayant peu d'effets systémiques.

1.6.2.2 Corticostéroïdes systémiques

Les corticostéroïdes systémiques et inhalés agissent par les mêmes mécanismes, mais divergent par le mode d'administration. Les corticostéroïdes systémiques peuvent être administrés par la voie intraveineuse ou orale faisant en sorte que leur action est plus rapide et efficace, mais ils sont également associés à beaucoup plus d'effets secondaires systémiques (Dahl, 2006). La prise de corticostéroïdes systémiques peut être utilisée pour traiter les exacerbations de l'asthme sévère (Alangari, 2014). L'administration orale peut aussi être utilisée dans une perspective de contrôle de l'asthme très sévère, bien que, généralement, la prise quotidienne de corticostéroïdes oraux (CSO) est à éviter (Israel & Reddel, 2017).

1.6.2.3 Thérapies ciblant les leucotriènes

Les leucotriènes endogènes jouent un double rôle dans l'asthme. D'une part, ils sont impliqués dans la bronchoconstriction en activant le MLVA via le récepteur 1 des cystéinyl leucotriènes (CysLT₁) et, d'autre part, ils peuvent favoriser le développement d'un environnement inflammatoire via le CysLT₁ et le CysLT₂ (Hui et al., 2004; Lynch et al., 1999). Ainsi, l'utilisation d'un antagoniste du CysLTR₁ tel que le Montelukast peut avoir des effets bénéfiques dans le traitement de l'asthme. Cependant, ces médicaments restent peu utilisés étant donné qu'ils sont moins efficaces dans le contrôle de l'asthme que les corticostéroïdes inhalés (LAVIOLETTE et al., 1999).

1.6.2.4 Anticorps monoclonaux

Plusieurs anticorps monoclonaux ont été développés dans les dernières années (Pavord, Hilvering, & Shrimanker, 2016). Ces traitements permettent de cibler spécifiquement des molécules impliquées dans l'immunologie de l'asthme. Ils offrent donc la perspective d'entrer dans une révolution de médecine personnalisée dans laquelle il serait possible de traiter chaque patient différemment selon les molécules inflammatoires importantes dans leur asthme (Fritzsching, 2017). Cependant, plusieurs facteurs font en sorte de limiter l'utilité clinique de ces traitements. Premièrement, ces traitements nécessitent de sélectionner les patients, et même,

lorsqu'ils sont sélectionnés à l'aide de biomarqueurs, les effets bénéfiques des anticorps monoclonaux semblent limités (Chang & Bosse, 2016). L'asthme est un syndrome respiratoire complexe dont l'étiologie sous-jacente varie entre les individus et qui implique une foule de médiateurs inflammatoires. Ainsi, il serait surprenant que de bloquer une seule molécule inflammatoire puisse s'avérer efficace dans le traitement de l'asthme. De plus, les anticorps monoclonaux sont actuellement extrêmement onéreux faisant en sorte que l'analyse coût-bénéfice justifie difficilement leur utilisation (Morishima, Ikai, & Imanaka, 2013). L'omalizumab, un anti-IgE, est actuellement l'anticorps monoclonal qui semble le plus cliniquement utile sur la base des résultats des études cliniques (Strunk & Bloomberg 2006). Celui-ci neutralise les IgE et les empêche de se lier aux récepteurs Fc localisés sur différents types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire. Les résultats des études cliniques suggèrent que ceux-ci peuvent avoir une certaine efficacité dans certains sous-groupes de patients asthmatiques (D'Amato, Salzillo, Piccolo, D'Amato, & Liccardi, 2007). Les bénéfices cliniques des autres anticorps monoclonaux sont très limités même lorsqu'on sélectionne les patients. Les cibles de ces autres anticorps sont : l'IL-5 par le mepolizumab et le reslizumab, le récepteur de l'IL-5 par le benralizumab, l'IL-13 par le lebrikizumab et le trakokinumab et la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-4 par le dupilumab (Pavord et al., 2016).

1.6.3 Autres thérapies

D'autres thérapies peuvent être également utilisées en ayant des mécanismes d'action différents des bronchodilatateurs et des thérapies de contrôle.

1.6.3.1 Immunothérapie

Le principe de l'immunothérapie consiste à exposer le patient à des petites doses croissantes de l'allergène de façon sublinguale ou sous-cutanée afin d'induire un phénomène de tolérance du système immunitaire. L'immunothérapie a une certaine efficacité dans l'asthme atopique lorsqu'un lien clair entre les expositions à un

allergène spécifique et les exacerbations de l'asthme est préalablement établi (Calderon et al., 2007).

1.6.3.2 Thermoplastie bronchique

Le remodelage des voies aériennes est un phénomène particulièrement inquiétant puisqu'une partie des changements structuraux observés dans l'asthme est réfractaire aux traitements actuels. La thermoplastie bronchique offre une opportunité thérapeutique afin de pallier à cette composante de l'asthme. La thermoplastie bronchique est une procédure bronchoscopique, durant laquelle une énergie thermique est transmise sur la paroi aérienne des bronches de 3 à 10 mm de diamètre interne (Duhamel & Hales, 2010). Les effets de cette thérapie sont la diminution de l'aire de MLVA et du dépôt de collagène de type I (Chakir et al., 2015; Pretolani et al., 2014). Ces effets anti-remodelages se répercutent en bénéfices cliniques pour le patient tels qu'une augmentation de la qualité de vie et une diminution des exacerbations (Cox et al., 2007; Wechsler et al., 2013). De plus, la thermoplastie bronchique se compare avantageusement aux autres traitements qui peuvent être utilisés chez les sujets atteints d'asthme modéré à sévère par l'analyse coût-bénéfice (Zafari, Sadatsafavi, Marra, Chen, & FitzGerald, 2016). Le mécanisme expliquant comment l'énergie thermique affecte les parois aériennes reste à être élucidé.

1.6.4 Prise en charge de l'asthme

Le traitement de l'asthme est défini selon les lignes directrices émises par la « Global Initiative for Asthma » (GINA) (Reddel et al., 2015). La prise en charge de l'asthme consiste en un continuum de traitements dans lequel l'emplacement du patient est déterminé selon la sévérité du désordre respiratoire (Figure 1.12). Un avancement dans le continuum est caractérisé par l'ajout d'une nouvelle approche thérapeutique ou par l'augmentation de la posologie administrée.

L'évaluation de la maîtrise de l'asthme est particulièrement importante puisqu'elle permet au clinicien de réévaluer constamment la sévérité de l'asthme pour s'assurer

que l'emplacement du patient dans le continuum est adéquat. La maîtrise de l'asthme est estimée de différentes manières soit, principalement, en évaluant les symptômes de l'asthme et leurs interférences sur les activités courantes, la fréquence des exacerbations et l'obstruction des voies aériennes par la mesure des DEP. Il est aussi recommandé de quantifier l'inflammation chronique par l'analyse des expectorations induites lorsque possible.

Le traitement de base de l'asthme allergique est constitué d'un BACA en traitement de secours auquel s'ajoute rapidement un corticostéroïde inhalé à prise régulière dès que l'asthme s'avère persistant. L'asthme est considéré persistant lorsqu'il nécessite la prise d'un BACA plus de 2 fois par jour. Si cette combinaison de traitement demeure insuffisante pour assurer la maîtrise de l'asthme, un BALA est généralement ajouté au traitement. Lorsque l'asthme s'avère très sévère, plusieurs possibilités thérapeutiques peuvent être utilisées telles que les corticostéroïdes oraux, les anticholinergiques à longue durée d'action, les anticorps monoclonaux, l'immunothérapie et la thermoplastie bronchique.

Il est également important pour le clinicien d'évaluer l'observance thérapeutique, la technique de prise des inhalateurs et le contrôle des facteurs environnementaux. En effet, environ 40 % des patients atteints d'asthme sont caractérisés par une faible compliance aux traitements et environ 80% n'ont pas une bonne technique lors de l'utilisation des inhalateurs (Baddar, Jayakrishnan, & Al-Rawas, 2014). Le contrôle de l'environnement peut permettre d'éviter d'énormes conséquences néfastes sur l'évolution de l'asthme (Dick, Doust, Cowie, Ayres, & Turner, 2014).

2017 Asthma Management Continuum Children (6 years and over), Adolescents and Adults

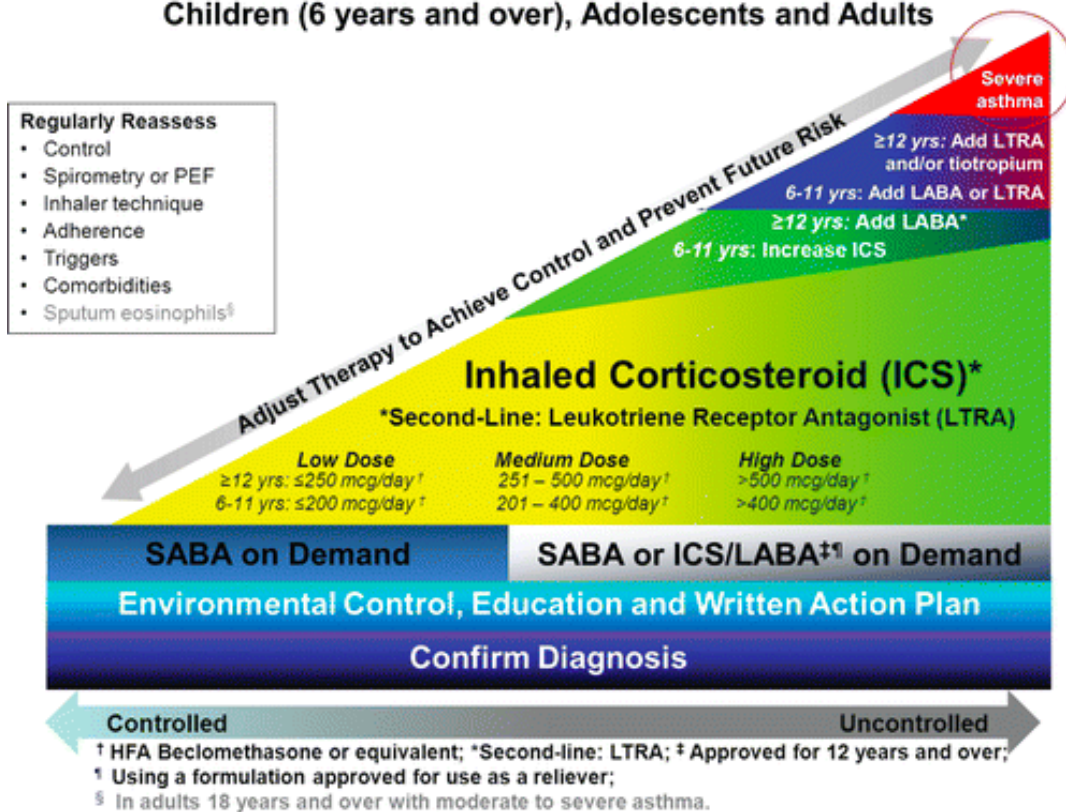


Figure 1.12 : Le continuum du traitement de l'asthme. Le traitement de l'asthme consiste à un continuum de traitements dans lequel la position du patient est déterminée selon la sévérité de son asthme. Source : (FitzGerald et al., 2017)

Chapitre 2 : Le muscle lisse respiratoire

Le rôle physiologique du MLVA est encore aujourd'hui matière à débat. Plusieurs chercheurs ont stipulé des hypothèses quant aux rôles physiologiques. Entre autres, il a été avancé que le MLVA pourrait être impliqué dans la coordination de la ventilation à l'intérieur des voies aériennes (Crawford, Makowska, & Engel, 1987) ou dans la limitation de la distension des voies aériennes lors de l'inflation pulmonaire (Gazzola et al., 2016). D'autres chercheurs considèrent que le MLVA ne serait qu'un tissu vestigial (Mitzner, 2004). Néanmoins, le MLVA joue un rôle néfaste dans l'asthme étant donné qu'il donne lieu aux symptômes et qu'il interagit avec les différentes composantes de l'asthme telles que l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation et le remodelage des voies aériennes (Ozier et al., 2011). Ainsi, celui-ci est une cible de choix dans le traitement de l'asthme et une meilleure compréhension de son fonctionnement pourrait éventuellement permettre de développer de nouvelles thérapies.

2.1 Contraction du muscle lisse des voies aériennes

La contraction du MLVA est fortement impliquée dans l'obstruction des voies aériennes lors des exacerbations de l'asthme comme le témoigne le caractère partiellement réversible de ces obstructions par la prise de bronchodilatateurs qui relaxent le MLVA ("Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007," 2007).

2.1.1 Mécanismes de contraction

Deux grands mécanismes permettent au MLVA de générer une force mécanique lorsqu'il est activé soit les liaisons croisées d'actomyosine et la polymérisation d'actine (Noble et al., 2014).

2.1.1.1 Les liaisons croisées d'actomyosine

De la même manière que dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques, les cycles de liaisons d'actine et de myosine ont un rôle important dans la contraction

du MLVA. Ces cycles sont régulés par la libération de calcium dans le cytoplasme et la formation du complexe Ca^{2+} /Calmoduline (D. Chin & Means, 2000). Ce complexe active la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) qui phosphoryle la chaîne légère de myosine (MLC) permettant d'augmenter l'activité adénosine triphosphatase (ATPase) de la myosine (S. H. Lee et al., 2000). Par la suite, un pivotement successif des têtes de myosine sur les filaments d'actine est entamé. L'énergie nécessaire à leur réalisation est fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) (Kamm & Stull, 1985). Ces cycles de liaisons d'actine et de myosine permettent à la myosine de tirer littéralement sur l'actine et de générer une force. Ces cycles de contraction peuvent être limités activement par la déphosphorylation de la chaîne légère de myosine par la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP). Bien que les liaisons croisées d'actine et de myosine soient impliquées dans la génération de la force contractile, ces liaisons croisées ne sont pas suffisantes pour générer une force contractile importante en l'absence de polymérisation d'actine (Adler, Krill, Alberghini, & Evans, 1983; Mehta & Gunst, 1999).

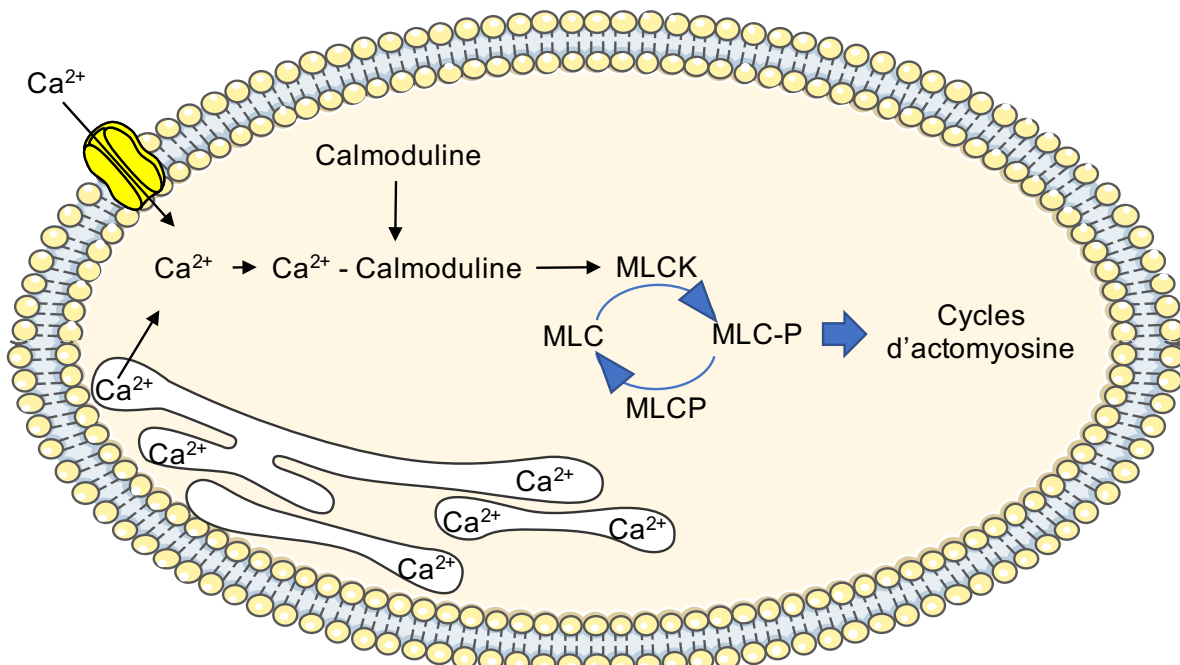


Figure 2.1: Contraction du MLVA par les cycles de ponts croisés entre l'actine et la myosine. La mobilisation de calcium dans le cytoplasme permet la formation du complexe Ca^{2+} -Calmoduline. Ce complexe active la MLCK qui phosphoryle la MLC permettant le pivotement successif des têtes de myosine sur les filaments d'actine.

2.1.1.2 Polymérisation d'actine

La polymérisation d'actine correspond à la transformation de l'actine globulaire (monomérique) vers une forme filamenteuse. Ces filaments d'actines assurent la transduction mécanique et la persistance de la force générée par le MLVA en faisant le pont entre les filaments d'actomyosine et les intégrines liées à la matrice extracellulaire (Figure 2.2) (Gunst & Zhang, 2008).

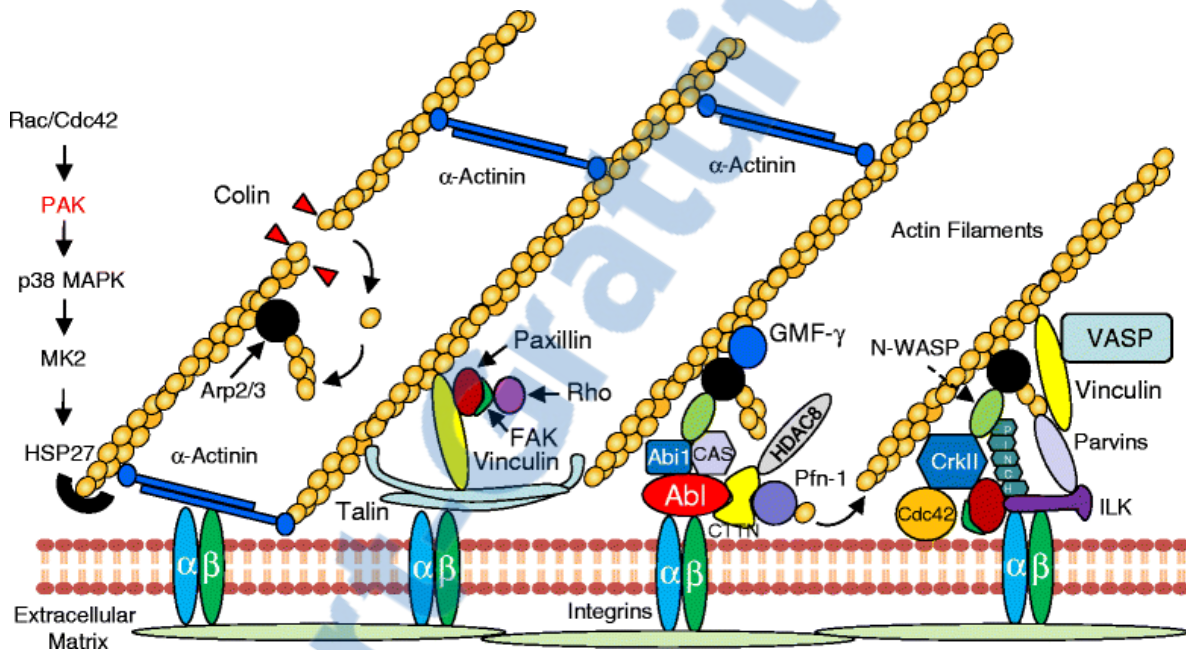


Figure 2.2: La polymérisation d'actine. La polymérisation d'actine assure la mécanotransduction de la force générée par le MLVA en faisant le pont entre la structure d'acto-myosine à l'intérieur de la cellule et les intégrines ancrées dans la membrane plasmique et liée à matrice extracellulaire. Plusieurs protéines régulent ce processus de polymérisation d'actine. (Tang, 2015)

2.1.2 Régulation de la contractilité

L'environnement extracellulaire a une influence majeure sur le comportement du MLVA. Les médiateurs présents dans l'environnement extracellulaire peuvent agir sur le muscle en étant soit des bronchoconstricteurs, des bronchodilatateurs ou des potentialisateurs de l'effet des bronchoconstricteurs.

2.1.2.1 Bronchoconstricteurs

La plupart des bronchoconstricteurs présents dans l'environnement inflammatoire agissent sur la contractilité du MLVA par le biais de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) (Billington & Penn, 2003). Les RCPGs qui favorisent la contraction du MLVA sont principalement couplés à des protéines G_q (Figure 2.3). Lors de la liaison du bronchoconstricteur sur son RCPG, les protéines G_q activent la phospholipase C (PLC). Cette dernière clive ensuite le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). Les IP3 ainsi formés s'associent à leur récepteur sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ceci active la libération des ions calcium (Ca^{2+}) hors du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol et mène à la contraction du MLVA comme préalablement décrit. L'acétylcholine, l'histamine et les leucotriènes sont des exemples de bronchoconstricteurs qui agissent de cette manière (Daykin, Widdop, & Hall, 1993; Roffel, Meurs, Elzinga, & Zaagsma, 1990; Snetkov, Hapgood, McVicker, Lee, & Ward, 2001). Il est à noter que l'activation des RCPGs peut induire d'autres voies de signalisation impliquées dans les liaisons actine-myosine et peut également activer des voies impliquées dans la sensibilité au calcium et la polymérisation d'actine (Bremerich, Warner, Lorenz, Shumway, & Jones, 1997; Zhang, Du, & Gunst, 2010).

Le chlorure de potassium (KCl) est un autre moyen pour activer la contraction du MLVA. Le KCl agit indépendamment des RCPGs soit en induisant une dépolarisation membranaire menant à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant. Ceci permet l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans le cytosol et la contraction comme il a été précédemment décrit (Bolton, 1979; Ganitkevich & Isenberg, 1991).

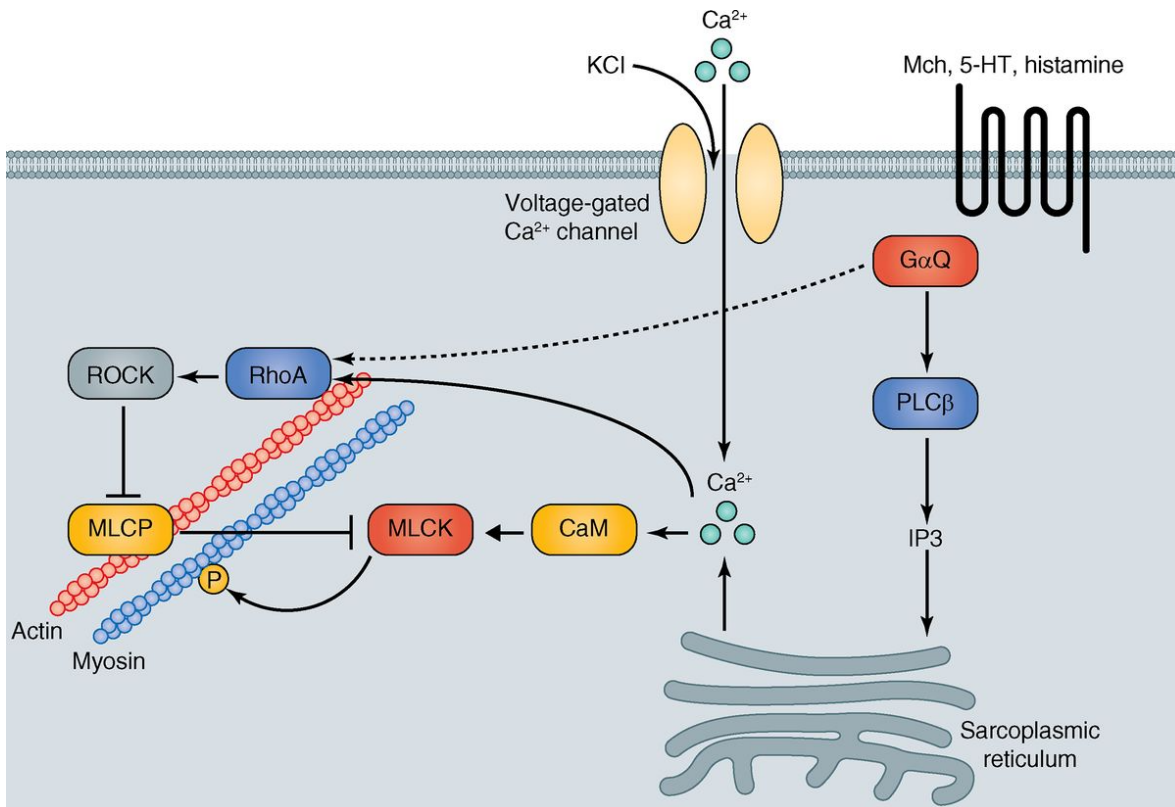


Figure 2.3: Mécanismes d'action des bronchoconstricteurs. Les bronchoconstricteurs qui activent des RCPGs associés aux G_q agissent principalement en activant la PLC. Cette dernière génère de l'IP3 qui à son tour se lie à des récepteurs du réticulum sarcoplasmique pour libérer le Ca^{2+} . Le KCl dépolarise la membrane et active les canaux calciques voltage-dépendant permettant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Une fois localisé dans le cytosol, le Ca^{2+} peut former un complexe Ca^{2+} /Calmoduline. Le complexe active la MLCK et mène à la phosphorylation de la MLC pour activer les têtes de myosine et induire le pivotement successif des têtes de myosine sur les filaments d'actine. Alternativement, le Ca^{2+} dans le cytosol peut activer la voie RhoA/ROCK associée à la sensibilité au calcium via l'inhibition de la MLCP. Reproduit de : (Erle & Sheppard, 2014).

2.1.2.2 Bronchodilatateurs

De façon endogène, plusieurs molécules sont sécrétées afin de relaxer le MLVA telles que l'épinephrine, l'oxide nitrique, la prostaglandine E_2 et la prostacycline (P. J. Barnes, 1998; Bosse, 2014). Étant donné le bénéfique thérapeutique évident de la prise d'une molécule relaxant le MLVA dans un contexte d'asthme, plusieurs médicaments ayant un effet bronchodilatateur ont été développés pour la gestion des symptômes de l'asthme.

Les bronchodilatateurs agissent soit en relaxant le MLVA de façon active ou en étant des antagonistes des récepteurs impliqués dans la contraction du MLVA.

Ceux qui induisent la relaxation de façon active se lient généralement à un RCPG associé à une protéine G_s. Cette dernière stimule l'adénylate cyclase donnant lieu à la formation d'AMPc qui inhibe, en outre, la MLCK (Billington & Penn, 2003). Les agonistes du récepteur β_2 -adrénergique représentent les exemples les plus probants de ce type de bronchodilatateurs (Townley, 1996).

Les anticholinergiques forment une catégorie de bronchodilatateurs qui agissent en étant des antagonistes des récepteurs muscariniques activés par l'acétylcholine (Roffel, Elzinga, et al., 1990).

2.1.2.3 Potentialisateurs de l'effet des bronchoconstricteurs

D'autres molécules n'ont pas d'effet direct sur le MLVA, mais permettent d'augmenter la réponse contractile du MLVA à des bronchoconstricteurs en termes de force maximale ou de sensibilité. Par exemple, l'interleukine 17A (IL-17A), le « tumor necrosis factor alpha » (TNF $_{\alpha}$) et l'interleukine 13 (IL-13) augmentent l'effet de bronchoconstricteurs (Farghaly et al., 2008; Kudo et al., 2012; Nakatani, Nishimura, Nishiura, Maeda, & Yokoyama, 2000). La voie impliquant les protéines « Ras homolog gene family, member A » (RhoA) et « Rho-associated, coiled coil-containing kinase » (ROCK) qui éventuellement mène à l'inhibition de la MLCP pourrait expliquer le phénomène de potentialisation pour certains bronchoconstricteurs (Kureishi et al., 1997).

2.2 Implication du muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme

Dans un contexte d'asthme, le MLVA se contracte de façon excessive. D'une part, le MLVA est suractivé par l'environnement inflammatoire. D'autre part, le MLVA occupe plus d'espace dans la paroi des voies aériennes de sujets atteints d'asthme. Si on assume que ces propriétés contractiles demeurent intactes, un plus gros

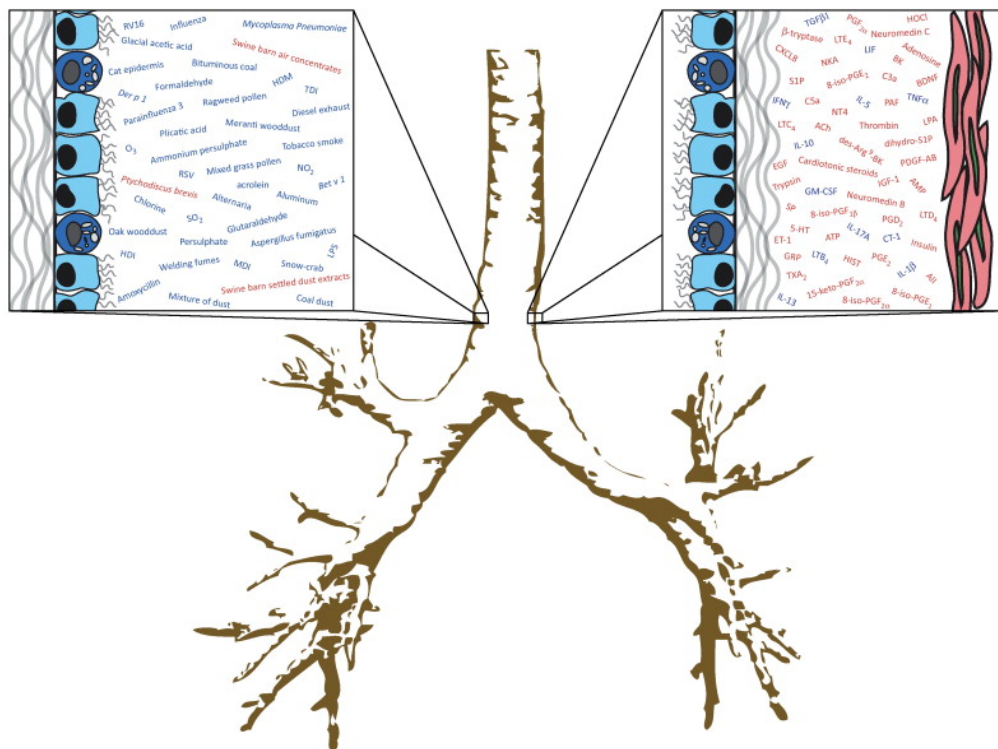
muscle implique nécessairement une plus grande capacité à générer de la force. Peu importe la cause, la contraction excessive du MLVA contribue à l'obstruction des voies aériennes qui est responsable des symptômes de l'asthme. De plus, les cellules musculaires lisses seraient également impliquées dans l'inflammation chronique et dans le processus de remodelage de la paroi des voies aériennes (Ozier et al., 2011).

2.2.1 Relation entre le muscle lisse des voies aériennes et l'inflammation

Le MLVA et l'inflammation des voies aériennes se régulent mutuellement. D'une part, l'inflammation contribue à moduler la contraction du MLVA. D'autre part, le MLVA sécrète des médiateurs inflammatoires qui participent à l'inflammation.

2.2.1.1 Contribution de l'inflammation dans la contraction du MLVA

Dans un contexte d'asthme, une foule de molécules endogènes et exogènes peuvent être présentes dans l'arbre bronchique en petite ou en grande quantité et peuvent réguler le comportement du MLVA (Figure 2.4) (Bosse, 2012). Parmi ces molécules, certaines sont considérées comme des bronchoconstricteurs, tandis que d'autres sont plutôt des potentialisateurs de l'effet des bronchoconstricteurs. Ainsi, il a été stipulé que la contraction excessive du MLVA dans l'asthme n'est probablement pas la résultante d'un muscle hypercontractile, mais bien d'un environnement moléculaire altéré modulant le comportement du MLVA d'où l'adage : « It is not the tree but the ants in the tree. ».



TRENDS in Molecular Medicine

Figure 2.4: « It is not the tree but the ants in the tree. » Une foule de médiateurs endogènes (droite) et exogènes (gauche) peuvent réguler la contractilité du MLVA dans un contexte d’asthme. (Bosse, 2012)

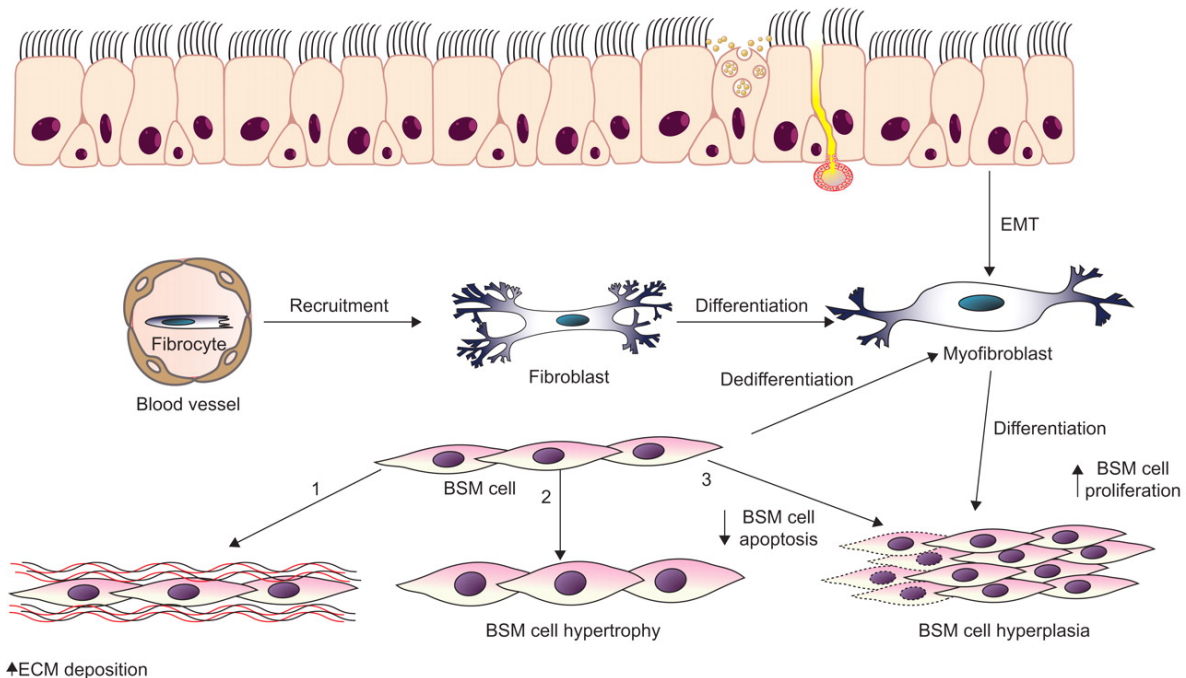
2.2.1.2 Contribution du MLVA dans l’inflammation

Également, le MLVA, lorsqu’il est activé par l’environnement inflammatoire, pourrait contribuer à l’inflammation en libérant plusieurs médiateurs inflammatoires tels que l’IL-6, l’IL-33, le CCL11, le CXCL8 et le CXCL10 créant une sorte de boucle d’autoamplification assurant la persistance de l’inflammation (Damera et al., 2009; Ozier et al., 2011). Par exemple, les cellules musculaires lisses peuvent libérer des chimiokines recrutant les mastocytes qui à leur tour activent les cellules musculaires lisses (Berger et al., 2003; Brightling et al., 2005; El-Shazly et al., 2006).

2.2.2 Relation entre le muscle lisse des voies aériennes et le remodelage des voies aériennes

2.2.2.1 Remodelage du muscle lisse des voies aériennes

L'épaississement de la couche de MLVA est une caractéristique importante dans l'asthme étant donné sa potentielle contribution dans le gain de force du MLVA et dans l'obstruction des voies aériennes. Les études d'analyse morphométriques de la paroi des voies aériennes ont observé différents changements structuraux dans la couche de MLVA qui peuvent donner lieu à son épaississement soit l'augmentation du nombre de cellules musculaires lisses, l'augmentation de leur taille ou l'accumulation de matrice extracellulaire entre les cellules (Ebina et al., 1993; James et al., 2012). Ainsi, plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces changements structuraux. L'hyperplasie peut être expliquée par une prolifération des cellules musculaires lisses, par une diminution de l'apoptose ou par la différenciation de myofibroblastes en cellules musculaires lisses (Figure 2.5) (Bara, Ozier, Tunon de Lara, Marthan, & Berger, 2010). L'hypertrophie pourrait être la résultante de la suractivation des voies de croissance cellulaire (Bentley & Hershenson, 2008).



▲ECM deposition
Figure 2.5: Remodelage du muscle lisse des voies aériennes. Le MLVA de sujets atteints d'asthme occupe un volume plus important dû à l'hyperplasie des cellules MLVA, à l'hypertrophie des cellules MLVA et/ou au dépôt de MEC entre les fibres musculaires. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ces changements de structure du MLVA. Reproduit de : (Bara et al., 2010).

2.2.2.2 Contribution du muscle lisse des voies aériennes dans le remodelage des voies aériennes

Le MLVA peut synthétiser des protéines de la MEC et contribuer ainsi au remodelage de la paroi des voies aériennes. Par exemple, il a été suggéré que le MLVA serait capable de synthétiser des types de collagènes, de la fibronectine et du perlecan (Johnson, Black, Carlin, Ge, & Underwood, 2000).

De plus, dans les dernières années, il a été postulé que la contraction du MLVA *per se* pourrait également être impliquée dans le remodelage des voies aériennes (R. Gosens & Grainge, 2015). Le mécanisme proposé serait que la contraction du MLVA induirait un stress mécanique sur les cellules épithéliales qui modifierait leur comportement et occasionnerait la sécrétion de facteurs de croissance (Tschumperlin et al., 2002). Ce postulat a été fortement renforcé par une étude *in vivo* chez des patients asthmatiques démontrant que des bronchoconstrictions

répétées induites par l'inhalation de métacholine entraînent du remodelage (Grainge et al., 2011). Cependant, aucune étude n'a évalué l'effet *in vivo* de la bronchoconstriction en absence d'inflammation sur le remodelage de la paroi des voies aériennes. L'article présenté dans le chapitre 3 de ce mémoire pallie donc à cette lacune.

2.2.3 Relation entre le muscle lisse des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique est définie comme l'obstruction excessive des voies respiratoires en réponse à l'exposition à un irritant. Le MLVA semble jouer un rôle central dans l'hyperréactivité bronchique retrouvée chez les sujets asthmatiques (Lauzon, 2016).

D'une part, une foule de médiateurs présents dans les voies aériennes peuvent favoriser la contraction excessive du MLVA en induisant directement la contraction du MLVA ou en potentialisant l'effet des bronchoconstricteurs (Bosse, 2012). De plus, récemment, il a été démontré qu'un tonus du MLVA *per se* tel que retrouvé dans l'asthme donne lieu à une augmentation de la capacité contractile du MLVA et à une augmentation de la réactivité bronchique, et ce, autant chez la souris que chez l'humain (Gazzola et al., 2017; Lee-Gosselin et al., 2015). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénomène restent à être élucidés.

D'autre part, le remodelage du MLVA (c.-à-d., augmentation de son volume) peut donner lieu à un gain de force et favoriser ainsi l'obstruction excessive des voies aériennes lorsqu'il est activé.

2.2.4 Utilisation du muscle lisse des voies aériennes comme cible thérapeutique dans l'asthme

Étant donné que le MLVA a un rôle central dans l'asthme, celui-ci est une cible thérapeutique de choix (Dowell, Lavoie, Solway, & Krishnan, 2014). Actuellement, les traitements utilisés cliniquement qui ciblent le MLVA sont très efficaces dans la gestion des symptômes, mais ont peu d'effets sur l'évolution de l'asthme.

Peu de thérapies permettent de limiter, voire renverser, le remodelage du MLVA. Pourtant, un plus gros muscle est vraisemblablement impliqué dans l'aggravation de l'asthme. La thermoplastie bronchique est une exception à la règle puisque celle-ci semble démontrer des effets anti-remodelage du MLVA chez l'humain (Chakir et al., 2015; Pretolani et al., 2014). Une meilleure caractérisation du remodelage du MLVA pourrait éventuellement permettre de mieux saisir l'importance de cet aspect dans la physiopathologie de l'asthme et d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cibler ce phénomène.

Chapitre 3: Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function

Samuel Mailhot-Larouche¹, Louis Deschênes¹, Morgan Gazzola¹, Katherine Lortie¹, Cyndi Henry¹, Bindi S Brook², Mathieu C Morissette¹, Ynuk Bossé¹

¹Quebec Heart and Lung Institute, Université Laval, Quebec, Canada;

²School of Mathematical Sciences, The University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom

Corresponding author:

Ynuk Bossé

Email: ynuk.bosse@criucpq.ulaval.ca

J Appl Physiol (1985). 2018 Feb 22. doi: 10.1152/jappphysiol.01073.2017.

3.1 Résumé

Le stress mécanique induit par des bronchoconstrictions répétées dans un contexte d'asthme pourrait favoriser le remodelage des voies aériennes. Cette étude vise à déterminer si des bronchoconstrictions répétées *in vivo* chez des souris non asthmatiques induisent un remodelage des voies aériennes. Des souris BALB/c étaient soumises à des bronchoconstrictions répétées induites par la nébulisation de métacholine, et ce, à chaque 2 jours lors de 6 semaines consécutives. Quarante-huit heures à la suite de la dernière exposition, différents paramètres ont été évalués. Les fonctions respiratoires des souris traitées à la métacholine n'étaient pas modifiées, et ce, autant au niveau de base qu'en réponse à la métacholine. Également, la contractilité et le remodelage du muscle lisse des voies aériennes ainsi que le dépôt de matrice extracellulaire n'étaient pas altérés. Néanmoins, le nombre de cellules à gobelets dans l'épithélium respiratoire et le nombre de macrophages dans le lavage bronchoalvéolaire étaient augmentés.

It is suggested that the frequent squeezing strain the airways undergo in asthma, due to repeated airway smooth muscle (ASM)-mediated constrictions, contributes to airway wall remodeling. However, the effects of repeated constrictions on airway remodeling, as well as the ensuing impact of this presumptive remodeling on respiratory mechanics, have never been investigated in non-asthmatic subjects. In this study, we set out to determine whether repeated constrictions lead to features that are reminiscent of asthma in non-asthmatic mice. BALB/c mice were subjected to either a 30-minute constriction elicited by aerosolized methacholine or the shammed procedure with aerosolized saline every other day during 6 weeks. Forty-eight hours after the last exposure, the mechanics of the respiratory system was evaluated at baseline and in response to incremental doses of nebulized methacholine with the flexiVent. The whole-lung lavage, the trachea and the lung were also collected to evaluate inflammation, the contractile capacity of ASM and the structural components of the airway wall, respectively. The resistance and the compliance of the respiratory system, as well as the Newtonian resistance and the resistive and elastic properties of the lung tissue, were not altered by repeated constrictions, both at baseline and in response to methacholine. Although the number of goblet cells in the epithelium and the number of macrophages in the whole-lung lavages were increased by repeated constrictions, the other examined features remained intact. This study demonstrates that, despite causing goblet cell hyperplasia and a mild macrophagic inflammation, repeated constrictions with methacholine do not lead to physiological alterations.

Copyright © 2018 American Physiological Society.

3.2 Introduction

Asthma is a common respiratory disorder for which the pathogenesis is highly variable between afflicted patients (Dean & Niven, 2017). The symptoms of asthma, although variable in terms of nature and severity, normally originate from excessive narrowing of the lumen in airways disperse either throughout the lung or in focal regions of the lung (Campana et al., 2009; Tzeng, Lutchen, & Albert, 2009; Venegas et al., 2005). Excessive narrowing of the airways in asthma may obviously stems from multiple causes, but inflammation, airway constriction mediated by airway smooth muscle (ASM) contraction and remodeling of the airway wall are often invoked. In turn, the underlying mechanisms leading to these typical causes of asthma are also several and likely variable between afflicted patients.

An emerging paradigm suggests that the squeezing strain the airway wall undergoes during constriction contributes to some features of asthma, particularly airway wall remodeling. This was first shown in asthmatic volunteers in whom repeated constrictions elicited by three bouts of inhaled methacholine, spaced apart by two days, was shown to thicken the basement membrane and to increase the number of goblet cells in the epithelium (Grainge et al., 2011). Similar findings were also reported in different animal models of allergic asthma (Bos et al., 2007; L. E. Kistemaker et al., 2014; Ohta et al., 2010; Tatler et al., 2011). In the latter, airway remodeling was prevented by interfering with either the muscarinic receptors, which presumably contribute to the natural constriction that occurs post-allergen exposure in those animal models (Bos et al., 2007; L. E. Kistemaker et al., 2014; Ohta et al., 2010), or the integrin $\alpha v \beta 5$, which is required for the constriction induced-activation of TGF β (Tatler et al., 2011). Interestingly, some findings even imply that airway remodeling caused by ASM contraction occurs *in vitro* (L. E. M. Kistemaker et al., 2017; Oenema et al., 2013; Tatler et al., 2011). Combined with the *in vivo* studies, this provides further evidence that airway constriction alone (*i.e.*, in the absence of inflammation) may be one of the common causes of airway remodeling in asthma. However, the effect of repeated constrictions on airway remodeling and other reminiscent features of asthma has never been investigated systematically *in vivo*.

In this study, we set out to determine whether repeated constrictions elicited by methacholine lead to some features of asthma in non-asthmatic mice.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Animals

Fifty-two female BALB/c mice were purchased from Charles River (Saint-Constant, Qc, Canada) at 6-week-old. The mice were provided food and water *ad libitum* and they were housed for at least one week before the investigation. All the protocols were approved by the Committee of Animal Care of *Université Laval* in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

3.3.2 Kinetics of the induced airway constriction

An initial set of experiments was conducted to quantify the magnitude and the duration of the constriction triggered by a 30-minute exposure to methacholine. The mice were acclimated to the double-chamber plethysmograph (SCIREQ, Montreal, Canada) to measure the specific airway resistance (sRaw) on 3 separate days the week prior to the beginning of the exposures. On the days of exposure, sRaw was measured for each mouse at baseline. The mice were then placed into a home-made exposure chamber. The internal volume of the chamber was 3 L. During the exposure, saline or methacholine at 7 mg/ml was aerosolized into the chamber using an up-mist nebulizer (Hospitak, Lindenhurst, NY) running at a constant rate of 120 µl/minute. Fresh air was also provided at all time from a bias flow set at 7.5 L/minute. In this initial set of experiments, the mice were removed one by one at 5-minute intervals for the first 30 minutes of exposure to measure sRaw. The remaining mice were then all removed from the exposure chamber at 30 minutes but tested one by one at 5-minute intervals to measure sRaw until the last mouse was evaluated. This whole experiment was repeated 6 times with saline and 6 times with methacholine in alternating fashion on 12 separate days (not necessarily consecutive) on the same 12 mice.

3.3.3 Six weeks of treatment with repeated constrictions

The next set of experiments was designed to assess the effect of repeated constrictions on respiratory mechanics, airway remodeling and inflammation. Forty mice were used for this set of experiments. The protocol is depicted in Figure 3.1. As described above, the mice were acclimated to the double-chamber plethysmograph the week prior to the beginning of the experiments. The mice were then divided into two groups of twenty to receive either aerosolized saline (shammed procedure) or methacholine at 7 mg/ml for 30 minutes every other day during 6 weeks starting on day 1.

In this set of experiments, all the mice could not be exposed at once. Since we own two double-chamber plethysmographs, sRaw can only be measured for up to 2 mice at a time. The mice went through the procedures 2 by 2 at 5-minute intervals. Hence, the first 2 mice were added in the exposure chamber at time zero and removed at 30 minutes. The next 2 mice were added at 5 minutes and removed at 35 minutes. And so on... In order to easily distinguish the mice within the chamber (as we had to keep track of which ones had been added at 0, 5, 10 or 15 minutes), they were: 1- exposed in smaller groups of only 6 to 8; and 2- labeled with either a square or a circular ear hole punch on either the left or the right ear within the week of acclimation. As we had 20 mice per group, there were 3 rounds of exposure for both the saline and the methacholine groups ($6 + 6 + 8 = 20$) at every tested day. We are aware that the chamber was opened from time to time in order to add or remove mice, which may have affected the concentration of saline/methacholine in the chamber. However, the same procedures took place in the first set of experiments described above, which was the protocol used to characterize the constriction.

sRaw was measured both before and after each exposure to confirm airway constriction on every tested day, as well as to determine whether the effect of methacholine changes along the 6 weeks of treatment. On day 43, 48 hours after the last exposure, the mice from each group were further divided into two sub-groups. One sub-group of 10 mice were used to assess respiratory mechanics at

baseline and in response to incremental doses of methacholine, as well as to collect the whole-lung lavages. The other sub-group of 10 mice were euthanized to collect the trachea and the left lobe of the lungs.

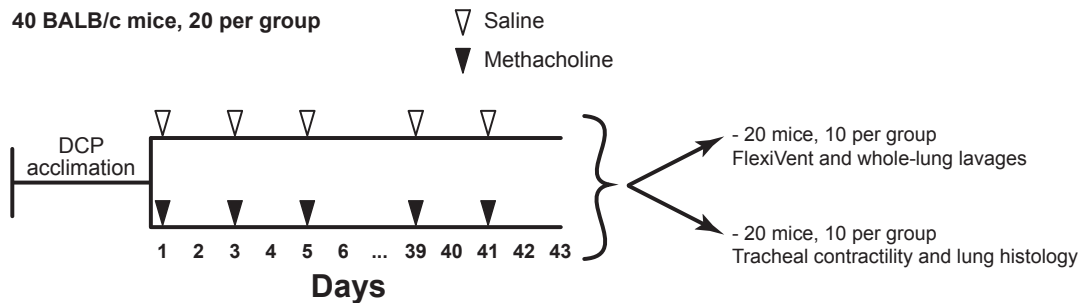


Figure 3.1: Experimental design that was used to investigate the effect of repeated airway constrictions on features of experimental asthma. DCP stands for double-chamber plethysmograph. See methods for a detailed description.

3.3.4 Respiratory mechanics

Baseline respiratory mechanics and airway responsiveness to methacholine was assessed using the flexiVent (SCIREQ, Montreal, Canada) (McGovern, Robichaud, Fereydoonzad, Schuessler, & Martin, 2013). The mice were anesthetized, tracheotomised, mechanically ventilated, paralyzed and kept in a supine position throughout the testing. More specifically, the mice were anesthetized with ketamine and xylazine at 100 and 10 mg/kg, respectively. They were then tracheotomised and connected to the flexiVent. The ventilation was set at a breathing frequency of 150 breaths/minute, a tidal volume of 10 ml/kg and a positive end-expiratory pressure of 3 cmH₂O. Once the ventilation was established, the mice were paralyzed with 0.1 mg/kg of pancuronium bromide injected intramuscularly. Heart rate was monitored continuously by electrocardiography throughout the experiment to ensure proper anesthesia.

Baseline respiratory mechanics was measured 10 seconds after two deep inflations to 25 cmH₂O, which are required for lung recruitment. Two distinct volume-perturbation maneuvers were then used to test the mechanics of the respiratory system, called the SnapShot-150 and the Quick Prime-3. They were both actuated

twice in an alternating fashion, each being intercalated by 8 seconds of tidal breathing to prevent desaturation. The volume perturbation imparted by the SnapShot-150 is a single sine wave oscillation that allows one to infer values for the resistance (R_{rs}) and compliance (C_{rs}) of the respiratory system based on the single-compartment model. The volume perturbation imparted by the Quick Prime-3 is a composite signal constituted of several sine waves, all at different frequencies, amplitudes and phases, that allows one to infer values for Newtonian resistance (R_N), tissue damping (G) and tissue elastance (H) based on the one-phase constant model (Hantos, Daroczy, Suki, Nagy, & Fredberg, 1992).

The degree of airway responsiveness was assessed by monitoring the changes in respiratory mechanics during incremental doses of methacholine. More precisely, the series of doses consisted of saline, 1, 3, 10 and 30 mg/ml of methacholine. Again, respiratory mechanics was assessed by the SnapShot-150 and the Quick Prime-3. Each of these volume-perturbation maneuvers was actuated 10 times in an alternating fashion after each dose, starting 10 seconds after dose delivery. Eight seconds of tidal breathing was intercalated between each volume-perturbation maneuver. A deep inflation was also imposed after the last volume-perturbation maneuver, approximately 2 minutes before the subsequent dose. The peak values for each inferred parameter (R_{rs} , C_{rs} , R_N , G and H) after each dose were used to assess the response.

3.3.5 Whole-lung lavages

The whole-lung lavages were collected in 20 mice, 10 from the saline-exposed group and 10 from the methacholine-exposed group, immediately after the measurements of respiratory mechanics. The mice were first euthanized with ketamine and xylazine at 200 and 10 mg/kg, respectively. The lavages were then performed by 3 consecutive cycles of injection and aspiration of 1.0 ml of sterile phosphate buffered saline (PBS). The total aspirated volume was pooled and centrifuged at 500 x g during 5 minutes. The recovered pellet was then resuspended in 100 μ l of PBS and a small fraction (10 μ l) was used to estimate the total number of cells using an

hemacytometer. The remaining cells were cytospun on a microscopic slide, which was then stained with modified May-Grünwald Giemsa stain (HemaStain Set, Fisher Scientific, Kalamazoo, MI) to assess the percentage by which the macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils accounted for the total cell number.

3.3.6 Contractile capacity of airway smooth muscle

The trachea was collected in 20 mice, 10 from the saline-exposed group and 10 from the methacholine-exposed group. The mice were euthanized with ketamine and xylazine at 200 and 10 mg/kg, respectively. Thoracotomy was performed immediately after death. The entire trachea was excised and immersed into Krebs solution (pH 7.4, 111.9 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.0 mM KH_2PO_4 , 2.1 mM MgSO_4 , 29.8 mM NaHCO_3 , 11.5 mM glucose, and 2.9 mM CaCl_2). The whole trachea was then mounted in a 5-ml organ bath containing Krebs solution maintained at 37°C. The trachea was connected by a surgical thread to a force transducer (Harvard Apparatus, St-Laurent, Canada), which allowed measurements of isometric force deployed by the ASM in response to contractile activation. A distending force of 5 mN (the resting tension) was applied. Prior to any recorded measurement, the trachea was subjected to a period of equilibration, during which time the ASM was stimulated to contract repeatedly for 5 minutes at 10-minute intervals with 10^{-5} M of methacholine until a reproducible force was recorded.

Cumulative concentration-response curves were generated with three distinct spasmogens, namely methacholine, potassium chloride (KCl) and endothelin-1. The order was randomized. Methacholine and endothelin-1 were added in half-log increments at 10-minute intervals from 10^{-8} to 10^{-4} and from 10^{-10} to 10^{-7} M, respectively. The concentration of KCl was incrementally increased by 1.41-fold at 5-minute intervals. The peak force obtained at each concentration was used to generate the concentration-response curves. At least 30 minutes were left between the different spasmogens, over which time the trachea was repeatedly washed with fresh Krebs.

3.3.7 Histology on lung slices

Lung histology was performed on the same mice as the ones used to measure the contractile capacity of the tracheas. Immediately after euthanasia, the left lobe was immersed into formalin during 24 hours for fixation. They were then dehydrated in 50% ethanol until further processed. The lobe was embedded in paraffin, cut transversally in 5 μm -thick sections and stained with either Masson trichrome, hematoxylin and eosin (H & E) or periodic acid shift (PAS). The sections were then imaged with a NanoZoomer Digital scanner (Hamamastu Photonics, Bridgewater, NJ). The sections stained with Masson trichrome were used to quantify both the amount of ASM within the airway wall and the content of collagen within the lung. For the ASM, 6 sections from each mouse were used. All the airways cut transversally were analyzed with the NDP View Software (Hamamastu Photonics, Bridgewater, NJ). An average of 5.9 ± 2.3 airways per mouse were analysed. For each analyzed airway, the total area occupied by the ASM was divided by the square of the basement membrane length. The values obtained for all individual airways were then compiled to obtain an average value per mouse. For the collagen, two sections in each mouse were used. The entire section of the lung was analyzed. The quantification was done using NDP View Software and ImageJ (version 1.50i). The two sections from each mouse were then compiled to obtain an average value per mouse. The sections stained with H & E were used to qualitatively assess tissue infiltration with inflammatory cells. Two sections from each mouse were examined. The sections stained with PAS were used to count the number of goblet cells in the epithelium as well as to quantify the thickness of the epithelium as previously described (A. Bai et al., 1994). Two sections in each mouse were used. All the airways cut transversally were analyzed with the NDP View Software. An average of 4.2 ± 2.5 airways per mouse were analysed. For each analyzed airway, the number of goblet cells was divided by the length of the basement membrane. The values obtained for all individual airways were then compiled to obtain an average value per mouse.

3.3.8 Statistical analyses

Data are shown as means \pm SD. Two-way ANOVAs with Sidak's multiple comparison tests were used to assess the kinetics of the constriction triggered by aerosolized methacholine. The same statistical tests were used to assess the effect of treatment (saline *versus* methacholine) on the changes in Rrs, Crs, R_N, G and H induced by incremental doses of nebulized methacholine, as well as to assess the effect of treatment on the force generated by the tracheas in response to escalating concentrations of methacholine, KCl and endothelin-1. A two-way ANOVA was used to assess the magnitude of the induced constriction over the 6 weeks of treatment. Mann-Whitney tests were performed to assess the effect of treatment on the total cell count and the differential cell counts in the whole-lung lavages, as well as to assess the effect of treatment on the thickness of the epithelium and the content of ASM, collagen and goblet cells in histologic sections. All statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered sufficient to reject the null hypothesis.

3.4 Results

3.4.1 Constriction triggered by aerosolized methacholine

The kinetics of the airway constriction triggered by aerosolized methacholine is depicted in Figure 3.2. In contrast to the lack of effect of saline exposure, sRaw progressively increased following the onset of methacholine exposure. The gain in sRaw was significant after 10 minutes. This gain in sRaw was then maintained throughout the rest of the exposure. At 30 minutes, sRaw amounted to 3.14 ± 1.12 cmH₂O·s after methacholine exposure compared to 1.49 ± 0.26 cmH₂O·s after saline exposure (a difference of 1.65 cmH₂O·s). sRaw then waned after methacholine exposure. However, sRaw in methacholine-exposed mice remained significantly higher than the saline-exposed mice for another 10 minutes.

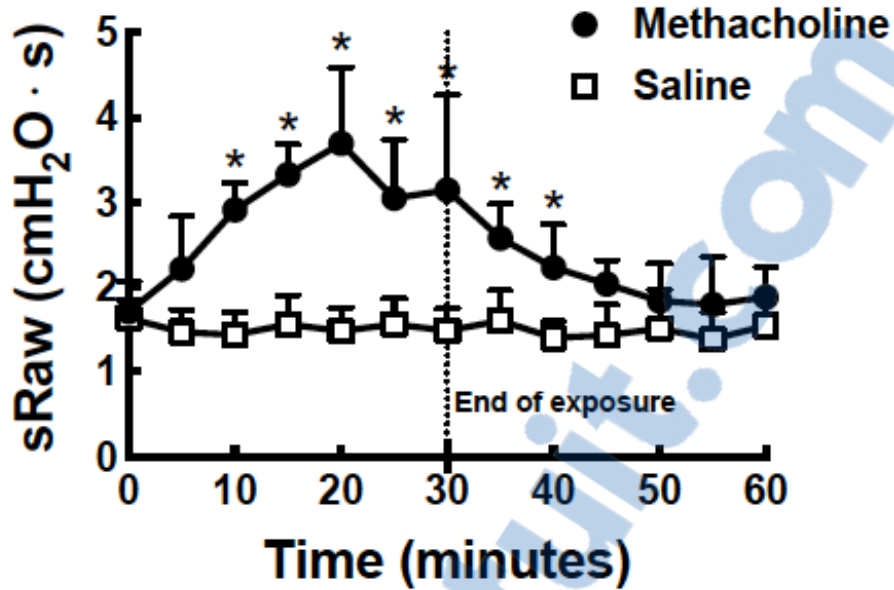


Figure 3.2: The kinetics of the induced airway constriction. Twelve mice were exposed to either aerosolized saline (open squares) or methacholine at 7 mg/ml (solid circle) in an exposure chamber. The mice were removed one by one at 5-minute intervals for the first 30 minutes of exposure to measure specific airway resistance (sRaw) using the double-chamber plethysmograph. The remaining mice were then all removed from the exposure chamber at 30 minutes but tested one by one in the double-chamber plethysmograph at 5-minute intervals to measure sRaw until the last mouse was evaluated. This experiment was repeated 6 times with saline and 6 times with methacholine in alternating fashion on 12 separate days. The results show that the constriction was significant after 10 minutes and remained significant for at least 10 minutes after the end of methacholine exposure. * indicates a statistically significant difference during exposure to aerosolized methacholine compared to the corresponding time-point during the shammed procedure with aerosolized saline.

The magnitude of the repeated constrictions induced by aerosolized methacholine, as well as the effect of shammed procedures with aerosolized saline, on every day of exposure during the entire 6 weeks of treatment are depicted in Figure 3.3. At the end of the 30-minute exposure, sRaw was on average 1.71 ± 0.27 cmH₂O-s higher in mice exposed to methacholine compared to saline-exposed mice ($p < 0.0001$). There was no change in the response to methacholine over time ($p = 0.49$ for the interaction treatment time).

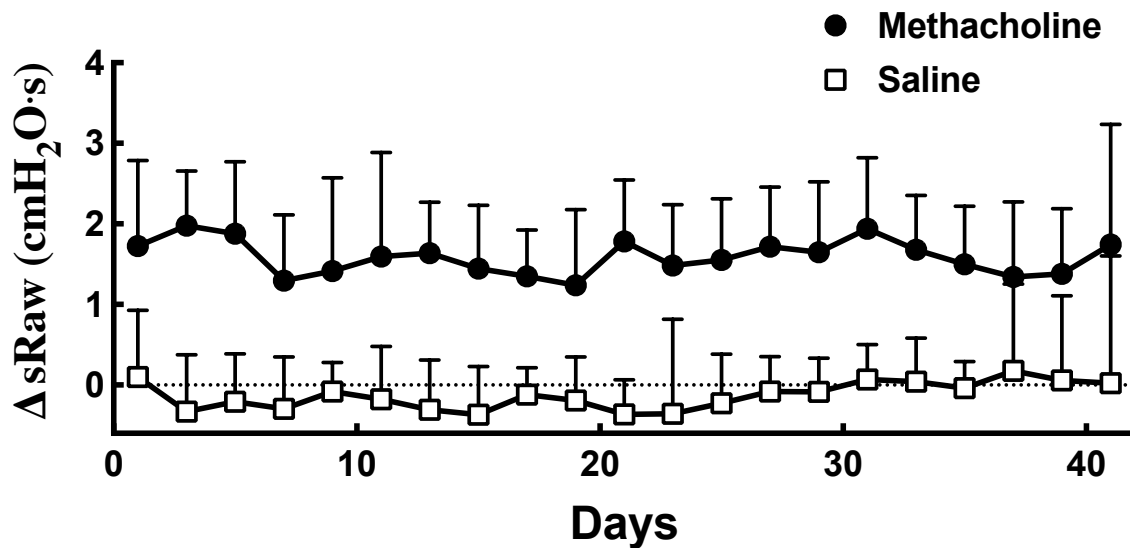


Figure 3.3: The effect of the treatments to Saline or methacholine on the airway response over time. The airway response to either saline (open squares) or methacholine (solid circles) was monitored throughout the 6 weeks of treatment. More specifically, two groups of mice were exposed to either saline or methacholine at 7 mg/ml for 30 minutes every other day. Specific airway resistance (sRaw) for each mouse was measured using the double-chamber plethysmograph both before and after each exposure. The average difference in sRaw (Δ sRaw) pre-exposure versus post-exposure at every tested day is displayed. The results demonstrate that while saline did not affect sRaw, methacholine consistently increased sRaw by an average of 1.71 ± 0.27 cmH₂O*s. n = 20 per group.

3.4.2 Respiratory mechanics

The values of R_{rs} , C_{rs} , R_N , G and H after the nebulization of saline and in response to incremental doses of nebulized methacholine in mice subjected to either repeated constrictions or shammed procedures during 6 weeks are depicted in Figure 3.4. Although each of these parameters changed significantly in response to incremental doses of methacholine, no differences were observed in the mice subjected to repeated constrictions compared to the mice subjected to shammed procedures.

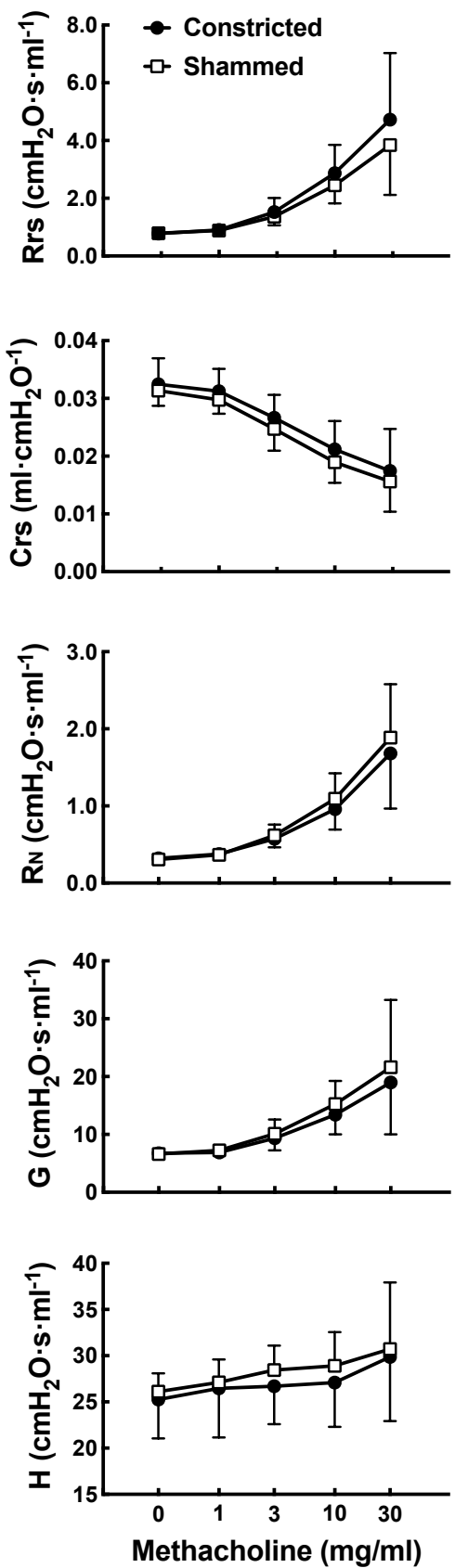


Figure 3.4: The effect of repeated constrictions on the mechanic of the respiratory system at baseline and in response to methacholine. In vivo responsiveness to methacholine after 6 weeks of treatment with either a 30-minute constriction (solid circles) or the shammed procedure (open squares) every other day. Respiratory system resistance (Rrs), respiratory system compliance (Crs), Newtonian resistance (RN), tissue damping (G) and tissue elastance (H) were measured after saline nebulization and in response to incremental doses of nebulized methacholine. Note that the y-axis for H does not start at zero.

3.4.3 Inflammation

The inflammatory cells collected in the whole-lung lavages after 6 weeks of treatment are depicted in Figure 3.5. The total number of cells was significantly higher ($p = 0.02$) in the mice subjected to repeated constrictions compared to the mice subjected to shammed procedures. This was entirely due to an increased number ($p = 0.01$) and percentage ($p = 0.002$) of macrophages. The number of lymphocytes, neutrophils and eosinophils were not affected by repeated constrictions. Examination of the airway wall and the parenchyma by histology in lung sections stained with H & E revealed no difference in tissue inflammation in mice subjected to repeated constrictions compared to mice subjected to shammed procedures (data not shown).

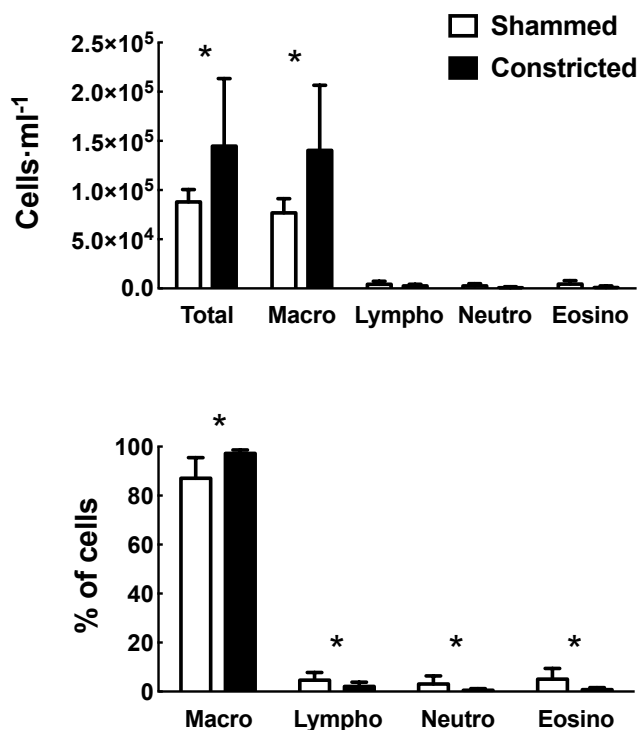


Figure 3.5: The effect of repeated constrictions on the Inflammation. Inflammatory cells within the luminal compartments of the lungs after 6 weeks of treatment with either a 30-minute constriction (solid bars) or the shammed procedure (open bars) every other day. The total number of inflammatory cells per milliliter of whole-lung lavages is displayed in the upper panel. The percentage of the total cells that is constituted by macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils is displayed in the lower panel. The number of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils in the upper panel was estimated based on the total number of cells and the computed proportions made up by each cell type. * indicates a statistically significant difference in mice subjected to repeated constrictions versus mice subjected to shammed procedures.

3.4.4 Contractile capacity of airway smooth muscle

The *ex vivo* contractile capacity of the isolated tracheas after 6 weeks of treatment is depicted in Figure 3.6. Although the force generated by the tracheas increased significantly in response to escalating concentrations of methacholine, KCl and endothelin-1, no differences were observed in the tracheas derived from mice subjected to repeated constrictions compared to the tracheas derived from mice subjected to shammed procedures.

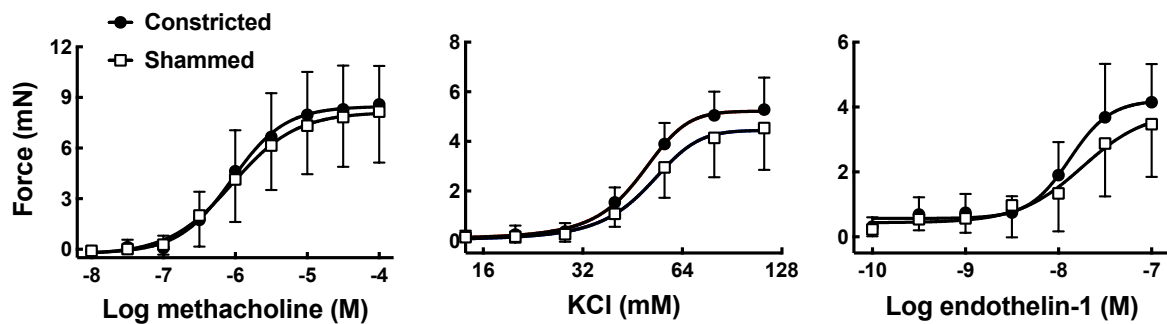


Figure 3.6: The effect of repeated constrictions on the airway smooth muscle contractility. The contractile capacity of airway smooth muscle after 6 weeks of treatment with either a 30-minute constriction (solid circles) or the shammed procedure (open squares) every other day. The excised tracheas were mounted in an organ bath and the isometric force generated in response to escalating concentrations of either methacholine (left panel), KCl (middle panel) or endothelin-1 (right panel) was measured. $n = 10$ per group

3.4.5 The structural components of the airway wall and the lung

The amount of ASM within the airway wall, the content of collagen throughout the lung, the number of goblet cells in the epithelium and the thickness of the epithelium after 6 weeks of treatment are depicted in Figure 3.7. The amount of ASM, the content of collagens and the thickness of the epithelium were not affected by repeated constrictions. However, the number of goblet cells increased by 591% ($p = 0.002$) in the mice subjected to repeated constrictions compared to mice subjected to shammed procedures.

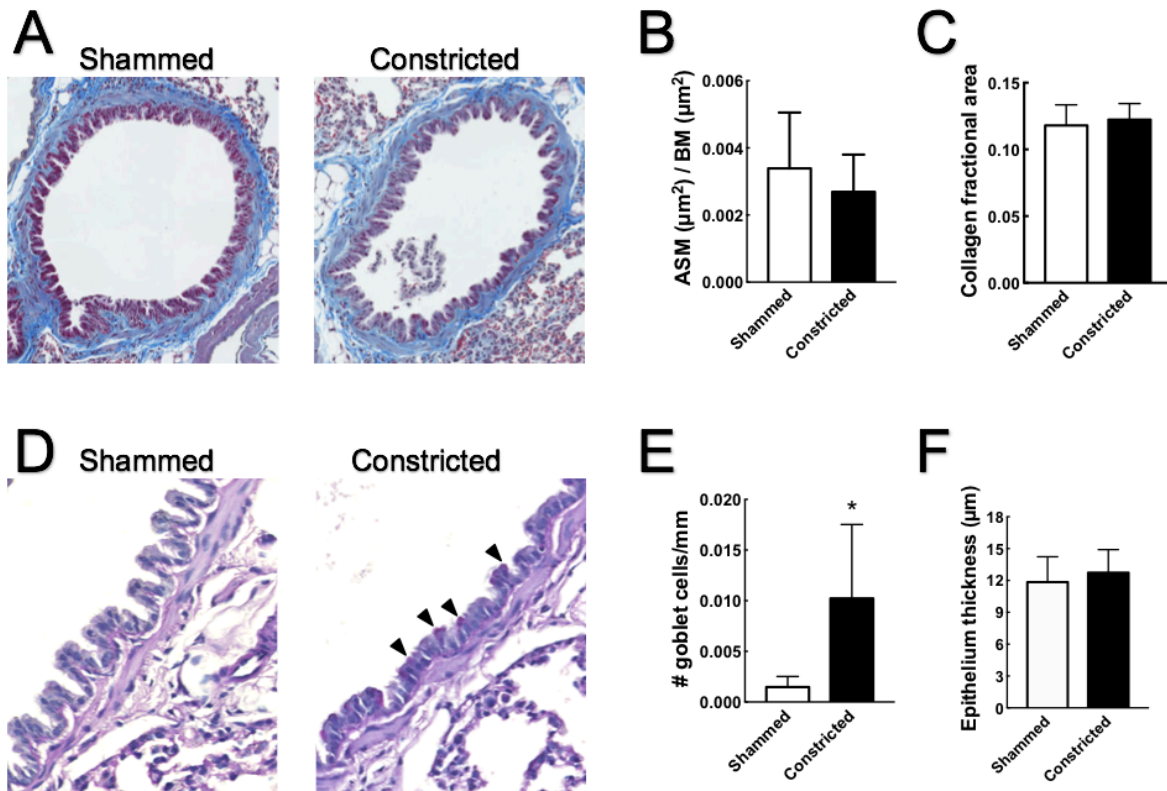


Figure 3.7: The effect of repeated constrictions on the structure of the lungs. Structural components of the airway wall and the lung after 6 weeks of treatment with either the shammed procedure or a 30-minute constriction every other day. **A.** Representative lung sections derived from mice subjected to either shammed procedures (left panel) or repeated constrictions (right panel) stained with trichrome. **B.** The average area of airway smooth muscle per square length of basement membrane (BM) is displayed for mice subjected to shammed procedures (empty bar) and repeated constrictions (solid bar). $n = 10$ per group. **C.** The average of collagen content throughout the lung in fraction of the total tissue area is displayed for mice subjected to shammed procedures (empty bar) and repeated constrictions (solid bar). $n = 10$ per group. **D.** Representative lung sections derived from mice subjected to either shammed procedures (left panel) or repeated constriction (right panel) stained with periodic acid shift. Arrow heads point toward goblet cells. **E.** The average number of goblet cell per mm of basement membrane is displayed for mice subjected to shammed procedures (open bar) and repeated constrictions (solid bar). **F.** The average thickness of the airway epithelium is displayed for mice subjected to shammed procedures (open bar) and repeated constrictions (solid bar). $n = 10$ per group.

3.5 Discussion

This study demonstrates that although repeated constrictions of the airways led to goblet cell hyperplasia and a mild macrophagic inflammation, these alterations were not sufficient to cause physiological alterations. This was shown by the lack of differences in Rrs, Crs, R_N, G and H at baseline and in response to incremental doses of nebulized methacholine in mice subjected to a constriction every other day during 6 weeks compared to mice subjected to shammed procedures. This was further supported by the lack of differences in the *ex vivo* contractile capacity of the tracheas excised from these two groups of mice. The fact that the magnitude of the constriction elicited by aerosolized methacholine was stable throughout the 6 weeks of treatment also supports the lack of progressive deterioration of lung function over time. Other typical features of asthma, such as ASM enlargement and enhanced collagen deposition within the lung, were also not observed following repeated constrictions.

The kinetics of the induced constriction in our study was clearly characterized. Aerosolized methacholine at 7 mg/ml in our exposure chamber triggered a significant constriction that lasted for at least 30 minutes. The constriction was also monitored throughout the entire 6 weeks of treatment. Together, these results confirm that a measurable airway constriction lasting at least 30 minutes took place every other day as intended.

The regimented pattern of constrictions that we have opted for may resemble to some real-life situations in human, such as elite endurance athletes with asthma who are subjected to repetitive airway constrictions due to the epithelial damage associated with their frequent bouts of intense exercise (Anderson & Kippelen, 2008). One can still argue that the type of constriction inflicted by acute exposure to aerosolized methacholine does not realistically emulate the kinetics and the nature of the constrictions that occur naturally in asthma. However, the results of a study conducted on human volunteers with mild atopic asthma demonstrated that only three bouts of acute airway constriction elicited by inhaled methacholine were

conducive to airway wall remodeling (Grainge et al., 2011). We were thus surprised to notice very little signs of airway wall remodeling in mice, apart from goblet cell hyperplasia, after 21 bouts of methacholine-induced constriction.

Uncontestably, the strain imparted by constriction is an important mechanical signal that may drive airway remodeling (Swartz, Tschumperlin, Kamm, & Drazen, 2001; Tschumperlin & Drazen, 2001; Tschumperlin et al., 2002). In fact, the ability to respond to mechanical strain is allegedly required for the adaptation of the organ's stress-bearing elements. In turn, this may be required to preserve the integrity and function of the organ in the face of changing dynamic environment in which it resides and operates. By extending this reasoning, some have proposed that the more frequent and pronounce constrictions that characterize asthma may promote the structural changes of the airway wall that are so typical of this lung disorder. The remodeling induced by repeated constrictions reported by Grainge and coworkers (Grainge et al., 2011) were thus not very surprising to some.

The putative role played by constrictions in airway wall remodeling has been mainly examined is further substantiated by studies conducted with animals (Bos et al., 2007; L. E. Kistemaker et al., 2014; Ohta et al., 2010; Tatler et al., 2011). It is important to mention though that, for both the human and the animal studies, the effect of constriction on airway remodeling was heretofore tested only in the presence of allergic inflammation (in patients with atopic asthma or in mice and guinea pigs with experimental allergic asthma). This is in contrast to our study, in which the effect of repeated constrictions was tested in non-asthmatic mice. One can thus postulate that a permissive interaction is required, where the presence of allergic inflammation is needed for the constriction to elicit remodeling. More recently, it was demonstrated that repeated *in vivo* constrictions elicited by nebulized methacholine increases the *in vitro* contractility of small airways in isolated lung slices of young, but not adult, non-asthmatic mice (Patel, Bai, Trieu, Barrios, & Ai, 2017). However, the results of *in vitro* studies also imply that airway remodeling is induced by ASM contraction (L. E. M. Kistemaker et al., 2017; Oenema et al., 2013;

Tatler et al., 2011). This suggests that constriction alone (*i.e.*, in the absence of airway inflammation) leads to airway remodeling. We were thus surprised to notice no sign of fibrosis, no enlargement of the ASM, no increase in the contractile capacity of the ASM and no airway hyperresponsiveness in mice subjected to repeated constrictions.

Notwithstanding the aforementioned discrepancies, our findings is consistent with the longstanding conviction that bronchoprovocative challenges with methacholine are innocuous. A recent report actually demonstrated that patients who underwent repeated methacholine challenges over the course of a few years did not exhibit an accelerated decline in lung function over time (Janssen, Gauvreau, Killian, & O'Byrne, 2015). This report truly offered somewhat of a relief, as methacholine testing is now common practice in clinical settings because of its usefulness in casting aside the diagnosis of asthma (Cockcroft, 2010). The remodeling induced by three bouts of constrictions reported by Grainge and coworkers (Grainge et al., 2011) were thus very surprising to some.

The conclusions drawn from Grainge and coworkers (Grainge et al., 2011) and Janssen and coworkers (Janssen et al., 2015) appear to conflict diametrically. We argue that the disagreement is merely semantic. The results of our study are perfectly in line with the findings (but not the interpretations) of each study, as repeated constrictions in our mice led to an increase number of goblet cells (Grainge et al., 2011) without impacting lung function, such as observed in Janssen and coworkers' study (Janssen et al., 2015). Therefore, repeated constrictions may well increase the number of goblet cells and transiently affect the expression of genes that are reputed to be involved in airway wall remodeling, such as TGF β (Grainge et al., 2011). However, such acute constrictions do not seem sufficient to alter lung function (Janssen et al., 2015).

The lack of airway hyperresponsiveness in the presence of goblet cell hyperplasia may also seem counterintuitive. Goblet cell hyperplasia is associated with mucus

hypersecretion (Aikawa et al., 1992). In turn, excessive production of mucus is expected to increase the propensity of airway closure and thereby increase the degree of airway responsiveness (Wagers, Lundblad, Ekman, Irvin, & Bates, 2004). In fact, mucus obstruction accounted for approximately 50% of the methacholine-induced fall in specific airway conductance in mouse (Agrawal et al., 2007). One is thus justified to anticipate a tight association between goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness. Our study was not design to address this question. Therefore, we do not have a definitive explanation for this lack of association. Speculatively, there may be different endotypes of goblet cell hyperplasia. That is to say that the etiologic factors leading to this final outcome may vary, and the molecular origin from which it stems may define its functional purpose. The caveat is that the readout used to quantify the number of goblet cells (+ staining with PAS) may not discriminate between the endotypes. Yet, different types of goblet cells may exist, some seemingly inoffensive and others supposedly detrimental for airway responsiveness. Alternatively, the increased number of goblet cells observed in constricted mice may be a sign of impaired secretion rather than hyperplasia of mucus-producing cells. Another possibility is that the increased number of macrophages that we observed may have been protective. These additional macrophages may have been recruited into the airways to clear the excess of mucus, which could had concomitantly preserve the normal functioning of the respiratory system. In support to this last conjecture, alterations of macrophages have been reported in experimental asthma (Careau et al., 2006; Lauzon-Joset, Marsolais, Langlois, & Bissonnette, 2014). Plus, normal macrophages transferred into sensitized mice were shown to greatly attenuate airway hyperresponsiveness (Careau & Bissonnette, 2004; Careau, Turmel, Lauzon-Joset, & Bissonnette, 2010). The dysfunction of macrophages induced by allergic inflammation may thus be a prerequisite that enable the excess of mucus due to goblet cell hyperplasia to cause airway hyperresponsiveness. Further studies that are specifically designed to address these questions are required.

Goblet cell hyperplasia and macrophagic inflammation may have also arisen as a result of repetitive exposures to methacholine independently of airway constriction. Airway epithelial cells (Cortijo et al., 2011; L. E. Kistemaker et al., 2015) and macrophages (Koarai et al., 2012) expressed the muscarinic receptors and likely respond to inhaled methacholine. In fact, stimulation of human bronchial tissue and differentiated epithelial cells with the muscarinic agonist carbachol was shown to rapidly increase the number of goblet cells by acting through the M₃ receptor (Cortijo et al., 2011). A direct pharmacologic effect of methacholine rather than an indirect effect mediated through airway constriction is thus very likely. In human, however, the constriction seems to be required (Grainge et al., 2011). More studies are warranted.

3.6 Conclusion

This study provides clear evidence that repeated constrictions of the airways in the absence of allergic inflammation do not lead to physiological alterations. Insofar as the mouse relates to humans, our results suggest that it is safe to expose non-asthmatics volunteers to repeated bouts of inhaled methacholine, even though some transient lung features that are reminiscent of asthma, such as goblet cell hyperplasia, are to be expected.

3.7 Disclosure

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors(s)

Chapitre 4: Repeated activation of muscarinic receptors *in vivo* reverses airway hyperresponsiveness to methacholine in a murine model of asthma

4.1 Résumé

L'asthme est un désordre respiratoire caractérisé par l'obstruction des voies aériennes dans lequel la contraction excessive du muscle lisse des voies aériennes joue un rôle central. Cette contraction implique le récepteur muscarinique tel que démontré par les effets bénéfiques des anticholinergiques dans le traitement de l'asthme. Des études précédentes suggèrent que le récepteur muscarinique peut être découplé et internalisé lorsque suractivé *in vitro*. Dans ce projet, la possibilité d'induire ces phénomènes d'adaptation du récepteur muscarinique chez des souris *in vivo* a été évaluée. Ainsi, des souris BALB/c non 'asthmatiques' et 'asthmatiques' ont été traitées soit à la métacholine (14 mg/ml) ou au véhicule pendant 45 minutes, et ce, 2 fois par jour durant 4.5 jours. Le traitement à la métacholine des souris non-'asthmatiques' a diminué la réactivité bronchique et la contractilité des trachées à la métacholine. Remarquablement, le traitement à la métacholine a renversé complètement l'hyperréactivité bronchique chez les souris 'asthmatiques'.

Asthma is a respiratory disorder characterized by airway obstruction, for which the excessive contraction of airway smooth muscle plays a central role. The contraction mediated by the binding of acetylcholine on its muscarinic receptors is involved in asthma, as shown by the efficacy of anticholinergics in the treatment of asthma. Previous *in vitro* studies have demonstrated that the muscarinic receptor can be uncoupled or become internalized when over activated. In this project, we evaluated whether it is possible to trigger these adaptive phenomena *in vivo* in mice. Non-'asthmatic' and 'asthmatic' BALB/c mice were treated with methacholine (14 mg/ml) or the vehicle during 45 min twice a day for 4.5 days. The methacholine treatment in non-'asthmatic' mice decreased airway responsiveness *in vivo*, as well as the contractile response of isolated tracheas to methacholine. Interestingly, the methacholine treatment completely reversed airway hyperresponsiveness in 'asthmatics' mice. The molecular mechanisms underlying this adaptive phenomenon remains to be elucidated.

4.2 Introduction

Asthma is an inflammatory disorder of the airways characterized by variable airflow limitation. This limitation involves the release of acetylcholine from the vagal nerves, which mediates airway smooth muscle (ASM) contraction (Canning, 2006; Colebatch & Halmagyi, 1963). The improvements of symptoms and lung function in asthmatic subjects treated with anticholinergics such as tiotropium suggest an important role of cholinergic signaling in asthma (Busse et al., 2016) .

The contraction of ASM induced by acetylcholine is mainly mediated by the receptor M3 (M3R), a member of the super family of GPCRs (Caulfield & Birdsall, 1998; Roffel, Elzinga, Van Amsterdam, De Zeeuw, & Zaagsma, 1988). GPCRs display common characteristics over their seven-transmembrane domains (Ghosh, Kumari, Jaiman, & Shukla, 2015; Rosenbaum, Rasmussen, & Kobilka, 2009). Generally, in a situation of over-activation, a lot of GPCRs have the ability to downregulate their activity by different ways, such as uncoupling from G protein, internalizing and/or decreasing their expression. *In vitro* studies suggested that M3R is not an exception to these rules (Detjen, Yang, & Logsdon, 1995; Luo, Busillo, & Benovic, 2008; Shockley et al., 1999; Willets, Challiss, & Nahorski, 2002; Yang, Logsdon, Johansen, & Williams, 1993). Following the activation of the M3R, the receptor becomes rapidly phosphorylated, which activates signaling pathways leading to G-protein uncoupling and receptor internalization.

In this project, we postulated that repeated activations of the muscarinic receptors with methacholine (MCh) *in vivo* in mice trigger a favorable adaptation of the M3R. We suggest that the process may be therapeutically relevant in the context of asthma as it has the potential to decrease the response of airway smooth muscle to acetylcholine, as well as to other spasmogens acting through the cholinergic system.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Animals

One hundred thirty-three female BALB/c mice were purchased from Charles River (Saint-Constant, Qc, Canada) of 6 weeks of age. The mice were provided food and water *ad libitum* and they were housed for at least one week before investigation. All the protocols were approved by the Committee of Animal Care of *Université Laval* in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

4.3.2 Methacholine treatment and measures of induced airway constriction

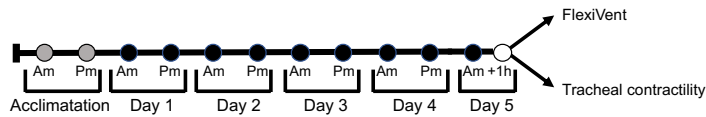
Sixty-one mice were used for the first protocol and seventy-two mice for the second protocol. The protocols are depicted in Figure 4.1. In both protocols, the mice were acclimated to the DCP twice, the day prior to the beginning of treatment.

In the first protocol, the mice were divided into two groups to receive either aerosolized vehicle (PBS) or MCh at 14 mg/ml for 45 minutes twice a day during 4 days starting on day 1. On each treatment, specific airway resistance (sRaw) was measured for each mouse at baseline with the double-chamber plethysmograph (DCP) (SCIREQ, Montreal, Canada). The mice were then placed into a custom-made exposure chamber. The internal volume of the chamber was 3 L. During the treatment, phosphate buffered saline (PBS) or MCh at 14 mg/ml was aerosolized into the chamber using an up-mist nebulizer (Hospitak, Lindenhurst, NY) running at a constant rate of 120 μ l/minute. Fresh air was also provided at all time from a bias flow set at 7.5 L/minute. After 45 minutes of treatment, the mice were then removed from the chamber and sRaw was measured again. sRaw was measured before and after each treatment in order to confirm airway constriction on every tested day, as well as to determine whether the effect of methacholine changes along the days of treatment. On day 5, the mice were treated one last time to their respective treatment and, 1 hour after the last treatment, the mice from each group were further divided into two sub-groups. One sub-group of mice were used to assess airway responsiveness in response to incremental doses of methacholine. The other sub-

group of mice were euthanized to collect the tracheas and assess their contractile capacity.

In the second protocol, the mice were subjected to the same protocol than the first one, but also exposed to house dust mite (HDM) to develop allergic airway inflammation as model of asthma. The protocol of HDM consisted of a daily intranasal instillation of 50 μ L of saline or HDM 1mg/ml (Greer) for 10 days. The mice were divided into three groups. The first group, thereafter called non- 'asthmatic', was exposed to saline daily for 10 days and treated b.i.d. with aerosolized PBS for 45 minutes for the last 4.5 days. The second group, thereafter called 'asthmatic', was exposed to HDM 1mg/mL daily for 10 days and treated b.i.d. with aerosolized PBS for 45 minutes for the last 4.5 days. The last group, thereafter called 'asthmatic' treated with MCh, was exposed to HDM 1 mg/mL daily for 10 days and treated b.i.d. with aerosolized MCh 14mg/ml for 45 minutes for the last 4.5 days. On day 5 of the protocol with MCh, which is day 11 for the protocol of HDM, the mice were treated one last time with their respective treatment (vehicle or MCh). One hour after the last treatment, the mice from each group were further divided into two sub-groups. One sub-group of mice were used to assess respiratory mechanics at baseline and in response to incremental doses of methacholine, as well as to collect the whole-lung lavages. The other sub-group of mice were euthanized to collect the tracheas and the right lobes of the lungs.

Protocol 1



Protocol 2

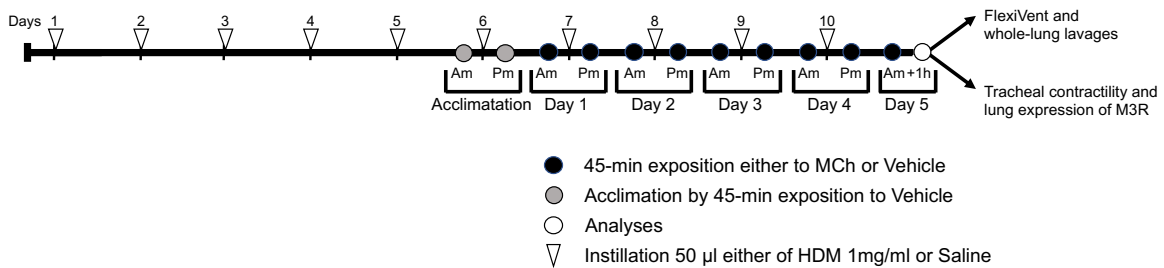


Figure 4.1: Experimental designs that were used to investigate the effect of repeated activation of muscarinic receptors on features of asthma in ‘non-asthmatic’ mice (Protocol 1) and in ‘asthmatic’ mice (Protocol 2). See methods for a detailed description.

4.3.3 Airway responsiveness

Airway responsiveness to methacholine was assessed using the FlexiVent (SCIREQ, Montreal, Canada) (McGovern et al., 2013). The mice were anesthetized, tracheotomised, mechanically ventilated, paralyzed and kept in a supine position throughout the testing. More specifically, the mice were anesthetized with ketamine and xylazine at 100 and 10 mg/kg, respectively. They were then tracheotomised and connected to the flexiVent. The ventilation was set at a breathing frequency of 150 breaths/minute, a tidal volume of 10 ml/kg and a positive end-expiratory pressure of 3 cmH₂O. Once the ventilation was established, the mice were paralyzed with 0.1 mg/kg of pancuronium bromide injected intramuscularly.

Two distinct volume-perturbation maneuvers were used to test the mechanics of the respiratory system, called the SnapShot-150 and the Quick Prime-3. They were both actuated twice in an alternating fashion, each being intercalated by 8 seconds of tidal breathing to prevent desaturation. The volume perturbation imparted by the SnapShot-150 is a single sine wave oscillation that allows one to infer values for the resistance of the respiratory system (Rrs) based on the single-compartment model

and the volume perturbation imparted by the Quick Prime-3 is a composite signal constituted of several sine waves, all at different frequencies, amplitudes and phases, that allows one to infer values for Newtonian resistance (R_N) based on the one-phase constant model (Hantos et al., 1992).

Baseline respiratory mechanics were measured 10 seconds after two deep inflations to 25 cmH₂O, which are required for lung recruitment. The degree of airway responsiveness was assessed by monitoring the changes in respiratory obstruction during incremental doses of methacholine. More precisely, the series of doses consisted of saline, 1, 3, 10 and 30 mg/ml of methacholine. Each of the volume-perturbation maneuvers described above was actuated 10 times in an alternating fashion after each dose, starting 10 seconds after dose delivery. Eight seconds of tidal breathing was intercalated between each volume-perturbation maneuver. A deep inflation was also imposed after the last volume-perturbation maneuver, approximately 2 minutes before the subsequent dose. The peak values for each inferred parameter (R_{rs} and R_N) after each dose were used to assess the response.

4.3.4 Contractile capacity of airway smooth muscle

The trachea was collected in mice from the two protocols. The mice were euthanized with ketamine and xylazine at 200 and 10 mg/kg. Thoracotomy was performed immediately after death. The entire trachea was excised and immersed into Krebs solution (pH 7.4, 111.9 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.0 mM KH₂PO₄, 2.1 mM MgSO₄, 29.8 mM NaHCO₃, 11.5 mM glucose, and 2.9 mM CaCl₂). The trachea was then mounted in a 5-ml organ bath containing Krebs solution maintained at 37°C. The trachea was connected by a surgical thread to a force transducer (Harvard Apparatus, St-Laurent, Canada), which allowed measurements of isometric force deployed by the ASM in response to contractile activation. A distending force of 5 mN (the resting tension) was applied. Prior to any recorded measurement, the trachea was subjected to a period of calibration, during which time the ASM was stimulated to contract repeatedly for 5 minutes at 10-minute intervals with 160 mM of KCl until a reproducible force was recorded.

Cumulative concentration-response curves were generated with two distinct spasmogens, namely methacholine (MCh) and, in the presence of atropine, potassium chloride (KCl). The order was randomized. Methacholine were added in half-log increments at 5-minute intervals from 10^{-8} to 10^{-4} . The concentration of KCl was incrementally increased by 1.41-fold. The peak force obtained at each concentration was used to generate the concentration-response curves. At least 30 minutes were left between the different spasmogens, over which time the trachea was repeatedly washed with fresh Krebs.

4.3.5 Whole-lung lavages

The whole-lung lavages were collected in mice from the first protocol, immediately after the measurements of respiratory mechanics. The mice were first euthanized with ketamine and xylazine at 200 and 10 mg/kg, respectively. The lavages were then performed by 3 consecutive cycles of injection and aspiration of 1.0 mL of sterile PBS. The total aspirated volume was pooled and centrifuged at 500 x g during 5 minutes. The recovered pellet was then resuspended in 100 μ l of PBS and a small fraction (10 μ l) was used to estimate the total number of cells using a hemacytometer. The remaining cells were cytospun on a microscopic slide, which was then stained with modified May-Grünwald Giemsa stain (HemaStain Set, Fisher Scientific, Kalamazoo, MI) to assess the percentage by which the macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils accounted for the total cell number.

4.3.6 Expression of the muscarinic M3 receptor

The snap-frozen right lobes of the lungs were homogenized using a mechanical homogenizer and lysed for 2h at 4°C in a radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) (Sigma Aldrich) containing a cocktail of proteases inhibitors (Roche). Protein concentrations were measured using a bicinchoninic acid assay (BCA) procedure following the manufacturer's protocol (Thermo Fisher). Proteins (45 ug) from the homogenate were separated by SDS gel electrophoresis on 12% gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in PBS containing 5%

powdered milk and 0.05% Tween 20 for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-M3R (abcam,1:1500) and rabbit anti-actin (Cytoskeleton,1:8000) in blocking solution. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology,1:10000) for 1 hour at room temperature in 5% powdered milk. Antibodies were revealed using ECL reagents (Merck Millipore) and using the imaging Chemidoc MP system (Bio-Rad Laboratories). Protein expression of M3R was quantified using the Image lab software (Bio-Rad Laboratories) and normalized to actin expression.

4.3.8 Statistical analyses

Data are shown as means \pm SEM. Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison tests was used to assess the magnitude of the induced constriction over the 4 days of treatment. Two-way ANOVAs with Sidak's multiple comparison tests were used to assess the effect of treatment on the changes in Rrs and R_N induced by incremental doses of nebulized methacholine, as well as to assess the effect of treatment on the force generated by the tracheas in response to escalating concentrations of MCh and KCl. Mann-Whitney tests were performed to assess the effect of treatment on the MCh EC₅₀ of tracheas, the total cell count and the differential cell counts in the whole-lung lavages, as well as to assess the effect of treatment on the expression of the muscarinic M3 receptor. All statistical analyses were performed using Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA). P < 0.05 was considered sufficient to reject the null hypothesis. Significant results are denoted by * for p<0.05, ** for p<0.01, *** for p<0.001 and **** for p<0.0001.

4.4 Results

4.4.1 The magnitude of the repeated constrictions

The magnitude of the repeated constrictions induced by aerosolized MCh, as well as the effect of PBS (vehicle), was monitored during the 4 days of treatments. The two daily treatments were averaged for each mouse and the means in each group are depicted in Figure 4.2. As expected, the effect of MCh on sRaw (Δ sRaw) was significantly greater than the effect of the vehicle (1.29 cmH₂O·s and -0.22 cmH₂O·s, respectively for a p-value<0.0001). However, there was a decrease in the response to MCh over time, which was significant at days 3 and 4 compared to day 1 (p<0.01 and p<0.001, respectively).

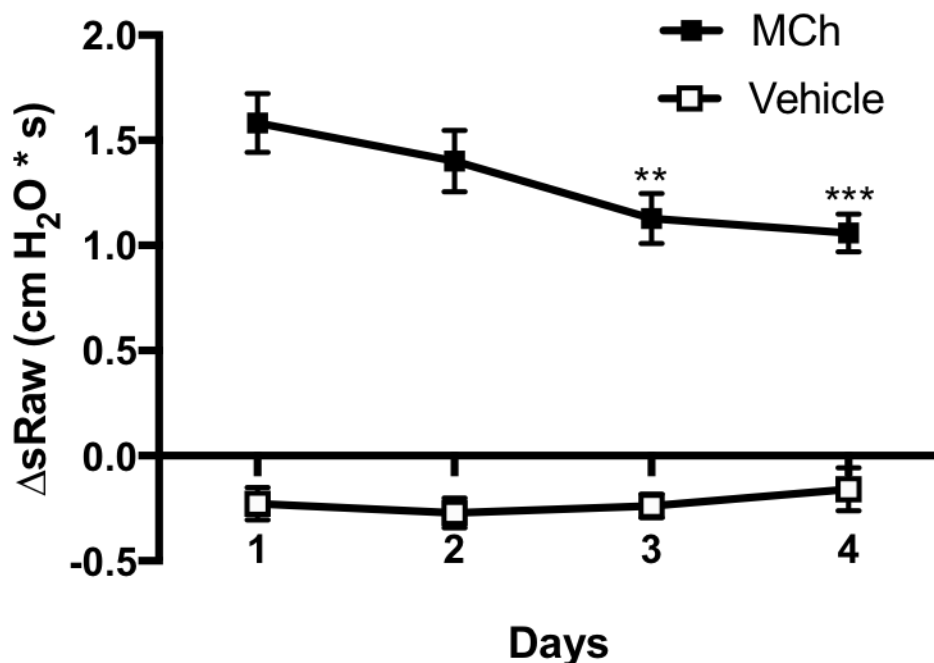


Figure 4.2: Longitudinal effects of methacholine (MCh) on specific airway resistance (sRaw). The airway response to either Vehicle (open squares) or MCh (solid squares) was monitored throughout the 4 days of treatment. More specifically, two groups of mice were treated with either methacholine at 14 mg/ml or the vehicle for 45 minutes twice a day. sRaw for each mouse was measured using the double-chamber plethysmograph both before and after each treatment. The average difference in sRaw (Δ sRaw) post-treatment versus pre-treatment at every tested day is displayed. The results demonstrate that while Vehicle did not affect sRaw, the increase in sRaw induced by MCh (Δ sRaw) significantly decreased over time. n = 31-32 per group.

4.4.2 Airway responsiveness

The values of R_{rs} and R_N in response to incremental doses of nebulized MCh after 4.5 days of treatment are depicted in Figure 4.3. At baseline, the values of R_{rs} and R_N are the same in both groups. The R_{rs} after the last dose of MCh was significantly lower in mice prealably treated with MCh compared to them treated with vehicle ($p < 0.05$). In contrast, R_N after the last dose of MCh was not significantly different between groups ($p = 0.11$).

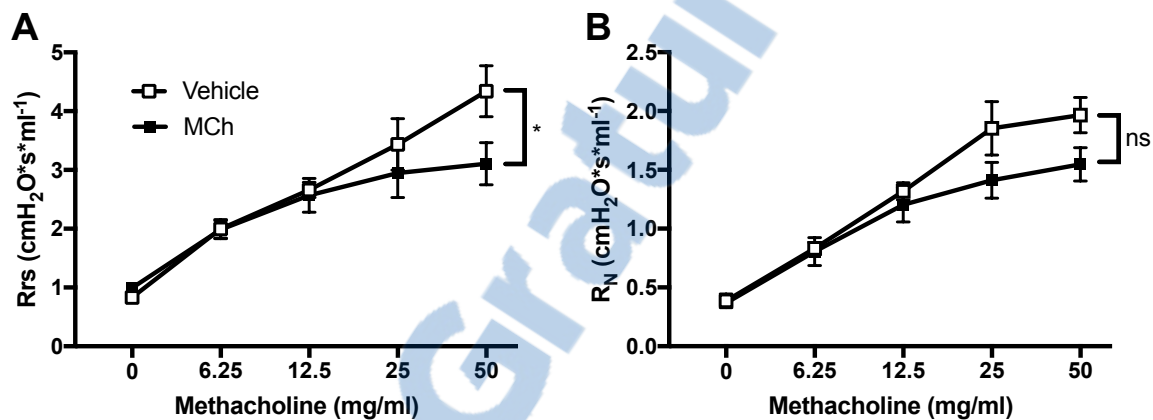


Figure 4.3: The effect of repeated activation of the muscarinic receptors on the responsiveness of the respiratory system to methacholine (MCh). In vivo responsiveness to MCh after 4 days of treatment with either MCh (solid squares) or the Vehicle (open squares) twice a day. Respiratory system resistance (R_{rs}) and Newtonian resistance (R_N) were measured after saline nebulization and in response to incremental doses of nebulized MCh. $n = 11-12$ per group.

4.4.3 Contractile capacity of airway smooth muscle

The *ex vivo* contractile capacity of the isolated tracheas after 4.5 days of treatment is depicted in Figure 4.4. The force generated by the tracheas in response to the maximal concentration of MCh was significantly lower in the tracheas derived from mice prealably treated with MCh compared to them treated with the vehicle ($p < 0.05$). No differences were observed in the contractile response to KCl between the tracheas derived from the two groups of mice. The normalization of the results to the maximal force illustrated a right shift in the sigmoidal curve for the tracheas from the mice prealably treated with MCh compared to them treated with vehicle. This shift is also demonstrated by an increased EC_{50} ($p < 0.001$).

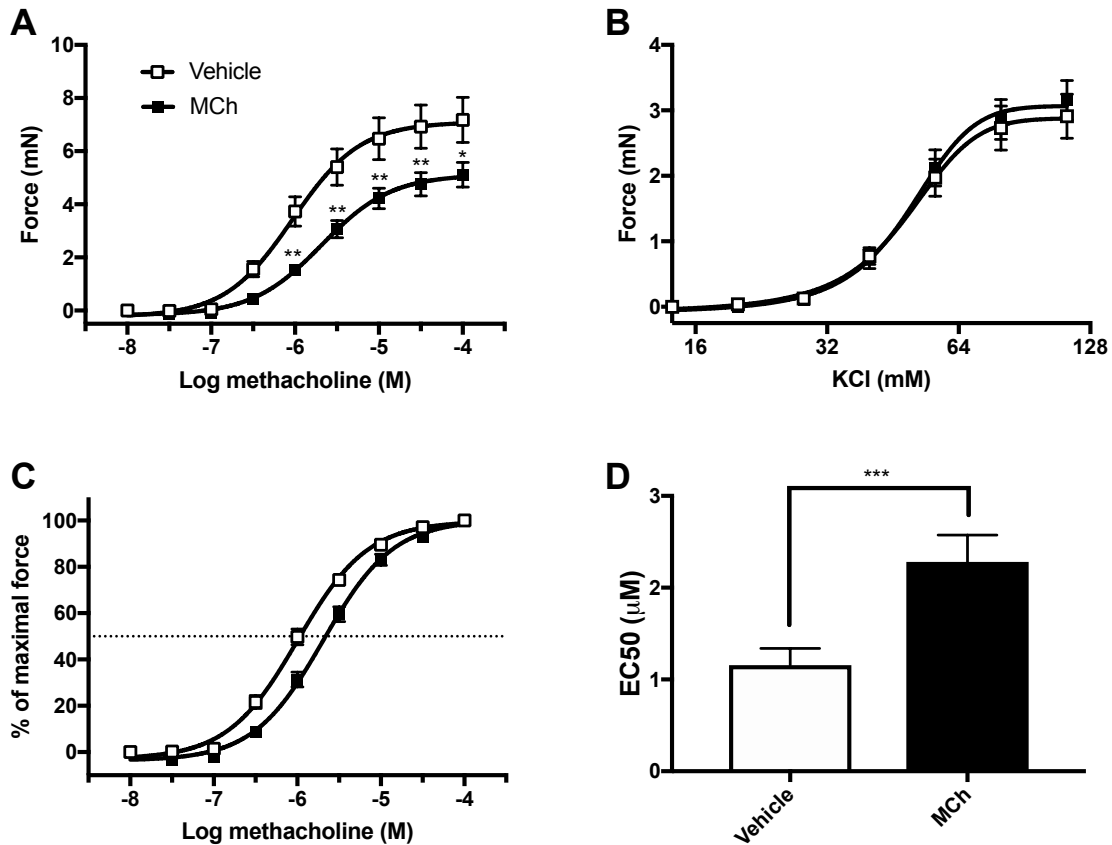


Figure 4.4: The effect of repeated activation of the muscarinic receptors on the contractility of airway smooth muscle. The contractile capacity of airway smooth muscle after 4 days of treatment with either MCh (solid squares) or the Vehicle (open squares) twice a day. The excised tracheas were mounted in an organ bath and the isometric force generated in response to escalating concentrations of either methacholine (A) and KCl (B) was measured. To assess the sensitivity to MCh, the results of the MCh contractions were shown as the percentage of the maximal force (C) and sigmoidal curves were fitted to the data to assess the EC50 for each group (D). n = 20 per group.

4.4.4 In a murine model of asthma

The protocol of repeated treatment with either MCh or the vehicle (PBS) was superimposed on the HDM exposure protocol, as illustrated in protocol 2 of Figure 4.1. As observed in protocol 1 with non- 'asthmatic' mice, the increase in sRaw induced by a treatment with MCh was decreasing over times in 'asthmatic' mice (Figure 4.5 A). This decrease being significant at days 3 and 4 compared to the day 1 ($p < 0.001$).

As expected, the effect of MCh on Rrs was higher ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$, respectively) in 'asthmatic' mice than in non- 'asthmatic' mice (Figure 4.5 B). Despite a tendency ($p = 0.64$), no difference in the effect of MCh on the R_N was observed between these two groups of mice (Figure 4.5 C). Interestingly, in the 'asthmatic' mice, the treatment to MCh decreased dramatically the airway response to MCh assessed by Rrs and R_N ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 4.5 B & C).

The tracheas isolated from 'asthmatic' mice were not hypercontractile compared to them isolated from non- 'asthmatic' mice (Figure 4.5 D). However, as observed in non- 'asthmatic' mice in protocol 1, the force generated in response to MCh was significantly attenuated in tracheas derived from 'asthmatic' mice treated with MCh than those derived from 'asthmatic' mice treated with the vehicle (Figure 4.5 D). This decrease in force was specific to MCh, since the force generated in response to KCl was similar between groups (Figure 4.5 E). The sensitivity, measured by expressing the force relative to the maximal force from either group (Figure 4.5 F) and by the EC50 (Figure 4.5 G), was not different between 'asthmatic' and non- 'asthmatic' mice. However, as observed in non- 'asthmatic' mice (Figure 4.4 C & D), when the force in response to MCh was expressed relative to the maximal force from either group, there was a right shift in the concentration-response curve for the tracheas isolated from 'asthmatic' mice treated with MCh compared to 'asthmatic' mice treated with the vehicle (Figure 4.5 F). Similarly, there an increase in the EC50 ($p < 0.01$) for the tracheas isolated from 'asthmatic' mice treated with MCh, confirming the decrease in sensitivity to MCh in this group (Figure 4.5 G).

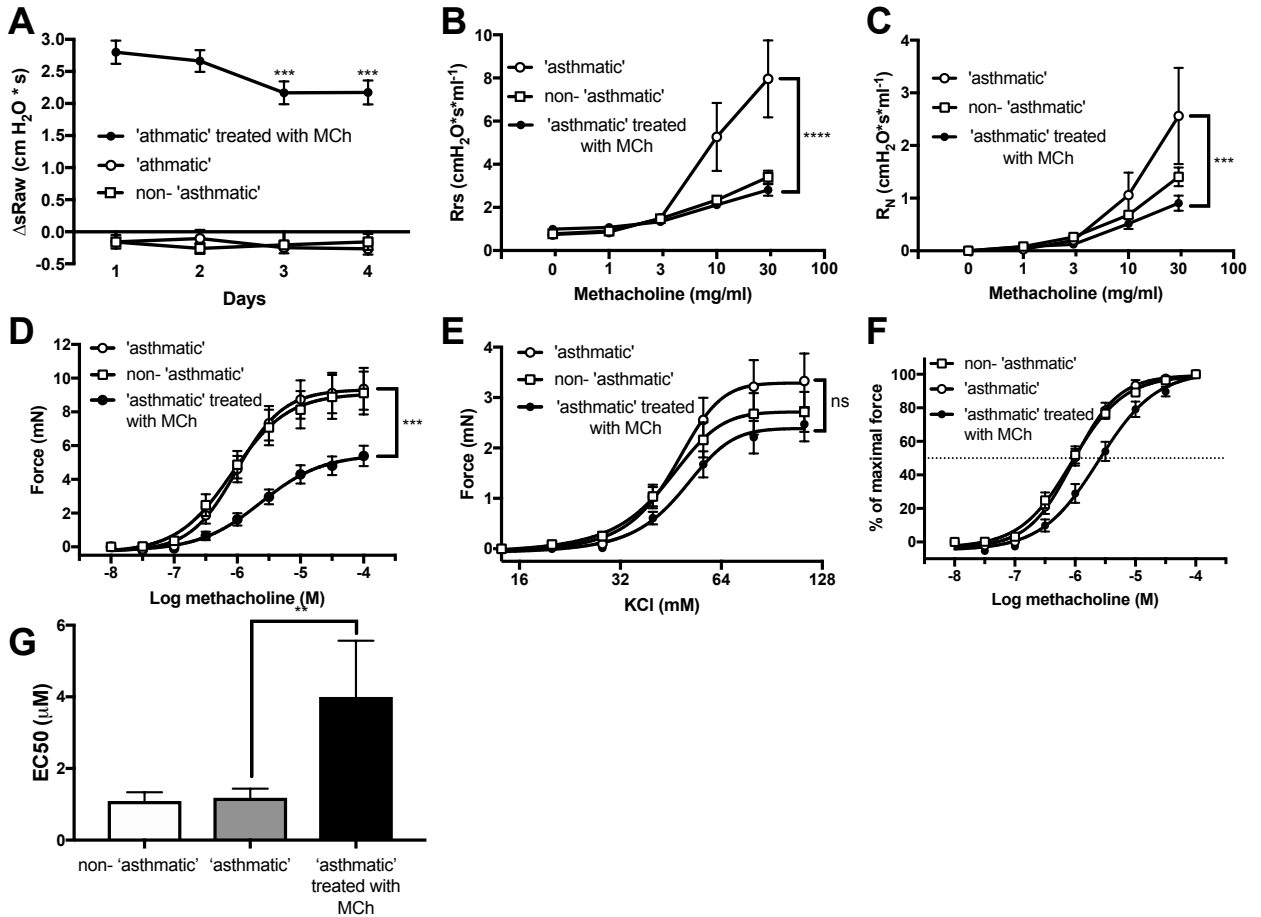


Figure 4.5: The effect of repeated activation of the muscarinic receptors in a murine model of asthma. Non- 'asthmatic' (squares) and 'asthmatic' (circles) mice were treated with either vehicle (open symbols) or methacholine (MCh) (solid symbols) during the last 4.5 days of HDM exposure as depicted in protocol 2 of Figure 4.1. In A, the response to MCh was monitored throughout the first 4 days of MCh treatment. The results shown from B to G were from analyses performed at the end of the protocol. In B-C, *in vivo* airway responsiveness was assessed by measuring respiratory system resistance (Rrs) and Newtonian resistance (RN) after saline nebulization and in response to incremental doses of nebulized MCh. In D-G, the contractile capacity of airway smooth muscle was assessed by mounting excised tracheas in organ baths. The isometric force generated in response to escalating concentrations of either MCh (D) and KCl (E) was measured. To assess the sensitivity to MCh, the results of the MCh contractions were shown as the percentage of the maximal force (F) and sigmoidal curves were fitted to the data to assess the EC50 for each group (G). n = 24 per group for A, n = 8-10 per group for B and C and n=14 per group for D-G.

4.4.5 Inflammation

The inflammatory cells collected in the whole-lung lavages after the protocol are depicted in Figure 4.6. The number of total cells, macrophages and eosinophils were significantly higher ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ and $p < 0.05$, respectively) in the lavages derived from 'asthmatic' than non- 'asthmatic' mice. When expressed in percentage, the macrophages were decreased ($p < 0.05$) and the eosinophils were increased ($p < 0.05$) in 'asthmatic' mice. The number and the percentage of lymphocytes and neutrophils were not affected by daily exposure to HDM instillation for 10 days. The twice-daily treatment with MCh did not alter the number and percentage of inflammatory cells in whole-lung lavages of 'asthmatic' mice.

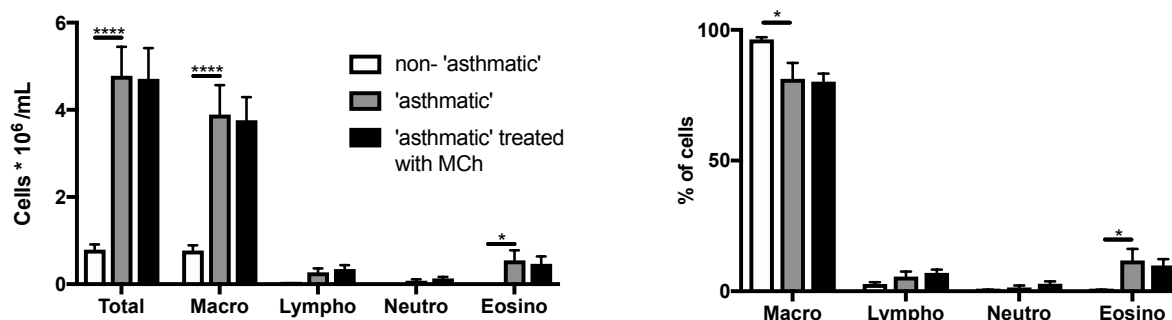


Figure 4.6: The effects of treatments with HDM and MCh on the inflammation. Inflammatory cells within the luminal compartments of the lungs in non- 'asthmatic' mice (open bars) and in 'asthmatic mice' treated with MCh (black bars) or the Vehicle (grey bars). The total number of inflammatory cells per milliliter of whole-lung lavages is displayed in the left panel. The percentage of the total cells that is constituted by macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils is displayed in the right panel. The number of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils in the left panel was estimated based on the total number of cells and the computed proportions made up by each cell type. n = 8-9 per group.

4.4.6 Expression of the M3R

The results of Western Blots are depicted in the figure 4.7. The relative expression of M3R over actin was similar in lung tissue homogenates derived from the three groups of mice.

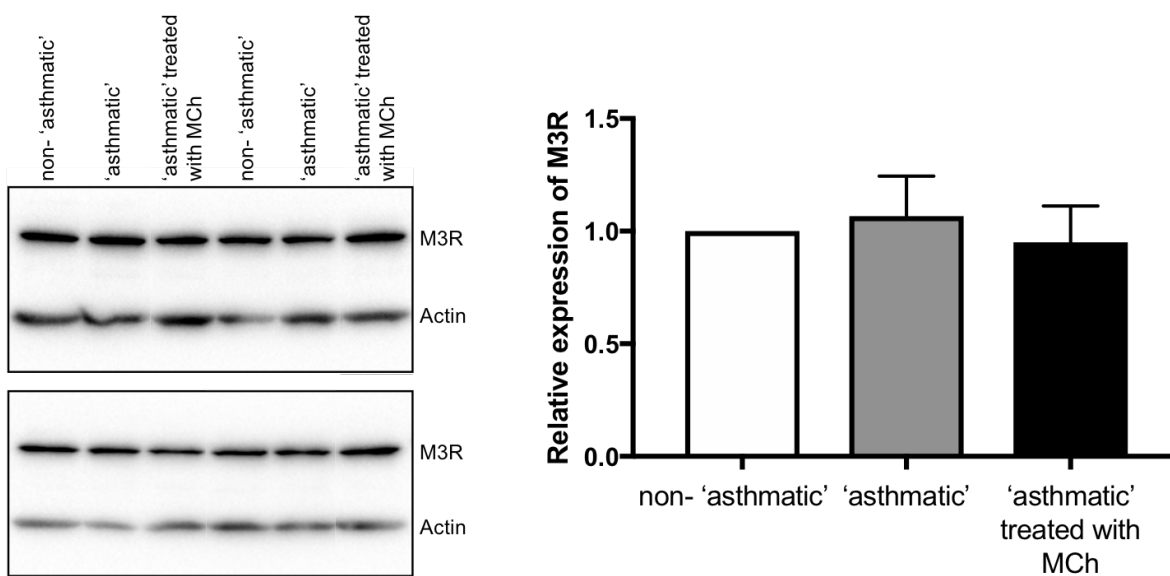


Figure 4.7: Protein expression of the M3R. Western blot analyses were performed on lung homogenates from non-'asthmatic' and 'asthmatic' mice treated b.i.d. with either MCh or the vehicle for 45 minutes during 4.5 days. Two representative immunoblots are shown on the left. The expression of actin is used as a control. The relative expression of M3R over actin was then quantified and the averaged results are displayed in the bar graph on the right. n = 4 per group

4.5 Discussion

In this project, an interesting avenue have been explored to modulate ASM behavior and, concomitantly, airway responsiveness. This study demonstrates that intense and repeated activations of the muscarinic receptors with MCh *in vivo* lead to a phenomenon of adaptation. In non- 'asthmatics' mice, the MCh treatment for 4.5 days twice a day decreased airway responsiveness to MCh assessed by monitoring the increase in Rrs in response to incremental doses of nebulized MCh. This difference in airway responsiveness to MCh is likely due to a change in the contractile response of ASM to MCh. Effectively, the contractile response to MCh was attenuated in isolated tracheas derived from mice treated *in vivo* with MCh. This decreased contractility was seen by a smaller response to MCh in terms of maximal force and sensitivity. These changes are likely dependent of the muscarinic receptors because the contractile response to KCl in the presence of atropine was not altered.

Furthermore, the impact of this phenomenon in a murine model of asthma was evaluated. Impressively, the repeated activation of the muscarinic receptors with MCh *in vivo* completely reversed the airway hyperresponsiveness that characterizes this model. In addition, the contractile response of the isolated tracheas from 'asthmatic' mice were completely in line with the results obtained in non- 'asthmatic' mice.

An altered inflammatory pattern does not seem to be involved in the changes of airway responsiveness *in vivo* and in the changes of ASM's contractile response *ex vivo*. In fact, the content in inflammatory cells assessed in the whole-lung lavages was markedly altered in 'asthmatic' mice compared to non-'asthmatic' mice, but the *in vivo* treatment with MCh did not change the inflammatory environment.

The molecular mechanisms underlying this *in vivo* phenomenon of adaptation remains to be elucidated. In the literature, a lot of molecular mechanisms have been proposed to explain the decreased effect of MCh over time *in vitro*. An

uncoupling/internalization of the M3R or a change in the cholinergic signaling pathways downstream of the receptors could be implicated. M3R can be phosphorylated by the GPCR kinase 6 (GRK6) and uncoupled (Willets et al., 2002). Equally, the M3R is known to be internalized following their activation via an arrestin independent mechanism (K. B. Lee, Pals-Rylaarsdam, Benovic, & Hosey, 1998). This desensitization is probably initiated by the phosphorylation of the M3R by the casein kinase 1- α (CK1 $_{\alpha}$) (Budd, McDonald, & Tobin, 2000). In our study, the protein expression of the M3R has been evaluated by Western-blot on lung homogenates. The results suggested that the expression of the M3R is not altered by *in vivo* treatment with MCh. However, this result does not completely refute the possibility of a decreased expression of the M3R on the cell surface of ASM, as the internalized receptors can still be detected in the lung homogenates and plenty of other cells express M3R in lung homogenates, including macrophages and epithelial cells (Reinoud Gosens, Zaagsma, Meurs, & Halayko, 2006). Another possibility is that the repeated activations of the M3R eventually change the signaling pathways downstream of the receptor. In this regard, the activation of the M3R can activate GPCR kinase 3 (GRK3), which then impairs the activation of the phospholipase C (Willets, Challiss, Kelly, & Nahorski, 2001). Overall, more than one mechanism are probably involved as the knockdown a lot of genes altered the decrease effect of MCh over time (Luo et al., 2008).

Although that M3R is the prominent contributor to the contraction of ASM in response to acetylcholine, M2 receptor (M2R) is also expressed implicated in contraction (Eglen, Reddy, Watson, & Challiss, 1994; Roffel et al., 1988; Roffel, Meurs, et al., 1990). So, theoretically, the activation of the M2R could be implicated in the phenomenon of adaptation and need to be investigate.

Other papers studied the impact of cholinergic signaling on the contractile capacity of ASM. The findings of our study are supported by a previous paper showing that chronic treatment with MCh for 4 weeks in rabbit decreases the *ex vivo* contractility of ASM in response to MCh (Witt-Enderby et al., 1995). More recently, another paper

showed that treatment of neonatal mice with MCh increases airway responsiveness *in vivo*, as well as the *ex vivo* contractile capacity of airway smooth muscle Patel et al., 2017. However, this was not seen in adult mice (S. Mailhot-Larouche et al., 2018; Patel et al., 2017). The discrepancy between our results and these other studies could be explained by the different protocols used. In our study, the mice were treated for 45 min twice a day during 4.5 consecutive days. This protocol is much more intense than the experiments conducted in the other studies.

Asthma is a respiratory disorder characterized by the presence of plenty of spasmogens acting on different receptors (Bosse, 2012). One limitation of our finding is that the beneficial effects seem to be restricted to the response of spasmogens acting on the muscarinic receptors. Nevertheless, the cholinergic signaling seems to be particularly important, as tiotropium bromide, a long-acting muscarinic antagonist (LAMA), is as efficient as the long-acting beta-agonists (LABA) in managing asthma (Busse et al., 2016). This efficacy of LAMA could be explained by the observations that the contraction of ASM in response to many spasmogens, such as histamine and thromboxane A₂, is mediated through the cholinergic system (Allen et al., 2006; Shore, Irvin, Shenkier, & Martin, 1983). In addition, the net impact of a small decrease in the contractile activation of ASM caused by blocking the cholinergic tone with a LAMA should not be underestimated. This is because the contractile activation of ASM is at the very basis of a chain of events that exerts a huge influence on respiratory resistance and that is further potentiated in asthmatic patients (Gazzola, Mailhot-Larouche, Beucher, & Bosse, 2018).

The kinetics of the phenomenon of adaptation that we observed has not been investigated and could be really important to evaluate the therapeutic potential of this adaptation. In this study, the analyses were performed only at 1h after the last treatment with MCh. The total duration of the adaptation is unknown.

The results generated in this study suggest that the phenomenon of adaptation could provide beneficial effects in the treatment of asthma. Unfortunately, the phenomenon

is initiated by an event, i.e. bronchoconstriction induces by the activation of the muscarinic receptor. To avoid this limitation, the concept of biased signaling could be used. Bias signaling is a concept that emerged over the last two decades and stipulates that a GPCR can selectively activate distinct pathways in response to different ligands (Violin, Crombie, Soergel, & Lark, 2014). This concept has been successively used to target other GPCRs, such as the angiotensin II receptor and the μ -opioid receptor, in the management of heart failure and pain, respectively (DeWire et al., 2013; Violin, Soergel, Boerrigter, Burnett, & Lark, 2013). In the context of asthma, the possibility to find a bias ligand that would activate selectively the pathways implicated in this phenomenon of adaptation without activating the pathways leading to contraction is really compelling (Figure 4.8). This type of bias ligands would thus have a double effect: 1- inhibits the pathways inducing contraction and 2- activates the pathways inducing adaptation (desensitization) of the receptor.

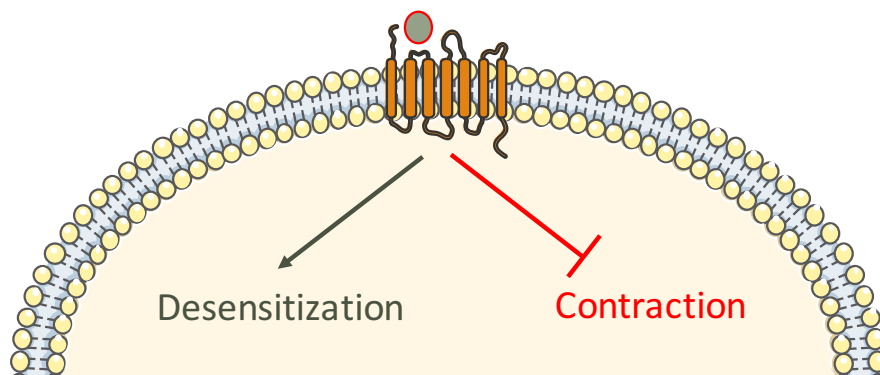


Figure 4.8: The signaling pathways that are activated downstream of the M3R lead to both contraction and receptor desensitization. An ideal treatment for asthma would consist of finding a bias ligand that activates the pathways implicated in the adaptation of the M3R in addition to inhibit the pathways implicated in the contraction of airway smooth muscle.

4.6 Conclusion

This study demonstrates that repeated activation of the muscarinic receptors *in vivo* lead to a phenomenon of adaptation that reduces airway responsiveness by limiting the contractility of ASM in mice. Interestingly, this adaptation completely reverses airway hyperresponsiveness of a murine model of asthma. Finally, the molecular mechanisms underlying this phenomenon are still unknown but do not seem to involve alterations in the inflammatory environment and in the expression of the M3R.

Rapport-Gratuit.com

Conclusion

L'asthme est un désordre respiratoire caractérisé par une obstruction des voies aériennes donnant lieu aux symptômes de l'asthme. L'hyperréactivité bronchique, l'inflammation et le remodelage des voies aériennes représentent les trois grandes composantes physiopathologiques sous-jacentes à cette obstruction. Une meilleure compréhension de ces composantes pourrait éventuellement permettre de développer de nouvelles thérapies.

L'étude du remodelage des voies aériennes est un filon intéressant puisque ce remodelage est associé au développement d'un asthme sévère réfractaire aux traitements actuels. Néanmoins, les mécanismes biologiques expliquant le remodelage des voies aériennes ne sont pas complètement élucidés. Récemment, il a été suggéré que le stress mécanique induit à l'épithélium lors de bronchoconstrictions pouvait contribuer au remodelage des voies aériennes. Le chapitre 3 a permis d'étudier la pertinence de ce phénomène biologique. En effet, chez des souris, il a été démontré que des bronchoconstrictions répétées en l'absence d'inflammation ne suffisaient pas pour induire plusieurs composantes du remodelage des voies aériennes. Également, ces bronchoconstrictions répétées n'altéraient pas la contractilité du muscle lisse des voies aériennes ainsi que les fonctions respiratoires des souris.

Les traitements actuels de l'asthme agissent en ayant des effets anti-inflammatoires ou en étant des bronchodilatateurs. Parmi les bronchodilatateurs, la majorité des médicaments actuellement utilisés ciblent le récepteur β_2 -adrénergique. Des études récentes démontrent que des antagonistes des récepteurs muscariniques sont aussi efficaces dans la gestion de l'obstruction des voies aériennes que peuvent l'être les agonistes du récepteur β_2 -adrénergique. Le chapitre 4 explore une approche novatrice ciblant les récepteurs muscariniques qui pourrait potentiellement être utilisée dans un contexte de traitement de l'asthme. Cette approche consiste à activer intensément les récepteurs muscariniques exprimés à la surface du muscle

lisse des voies aériennes afin d'induire un phénomène d'adaptation du récepteur. Chez des souris, ce phénomène d'adaptation se répercute en diminution de la réactivité bronchique et de la contractilité des trachées. De façon encore plus impressionnante, l'activation intense du récepteur muscarinique a permis de complètement renverser l'hyperréactivité bronchique dans un modèle murin d'asthme. Néanmoins, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à être élucidés.

Perspectives

Le projet présenté dans le chapitre 3 a démontré que des bronchoconstrictions induites chez des souris en l'absence d'inflammation n'altéraient pas différentes composantes du remodelage et les fonctions respiratoires. Néanmoins, la réalité d'un contexte d'asthme implique une inflammation des voies aériennes. Ainsi, dans ce contexte pathologique, des bronchoconstrictions pourraient potentiellement interagir avec l'inflammation afin de favoriser le remodelage des voies aériennes. Il serait donc intéressant d'évaluer si les mêmes bronchoconstrictions permettent de modifier la structure des voies aériennes et les fonctions respiratoires lorsqu'elles sont réalisées en présence d'inflammation. L'utilisation d'un modèle murin d'asthme pourrait permettre de répondre à cette question en simulant l'inflammation retrouvée chez les patients atteints d'asthme.

Le projet présenté dans le chapitre 4 a permis d'explorer un phénomène d'adaptation du récepteur muscarinique qui pourrait avoir des effets bénéfiques dans un contexte d'asthme. Néanmoins, il serait nécessaire de bien caractériser l'ensemble du phénomène pour évaluer son réel potentiel thérapeutique. La cinétique du phénomène d'adaptation pourrait permettre de déterminer la durée pendant laquelle les effets bénéfiques du phénomène peuvent persister et établir si cette durée est assez longue pour être considérée cliniquement intéressante. Il faut aussi confirmer que le phénomène d'adaptation du récepteur muscarinique peut subvenir au sein du tissu humain. Pour cela, nous voulons exposer des bronches humaines à la MCh et évaluer l'effet de cette exposition sur leur contraction. Les bronches excisées de patients atteints de cancer nécessitant une lobectomie ou une segmentectomie seraient utiles à cet égard. De plus, lors du projet, la réactivité bronchique des souris à la métacholine a été évaluée, mais l'asthme est une maladie complexe dans laquelle plusieurs médiateurs inflammatoires régulent la contraction du muscle lisse des voies aériennes. Ainsi, il serait important d'évaluer si la réactivité bronchique en réponse à un allergène, qui est certainement plus représentative de celle retrouvée dans un contexte d'asthme, est également altérée.

La compréhension moléculaire du phénomène d'adaptation du récepteur muscarinique est une étape importante dans le processus de caractérisation du phénomène. À cette fin, des modèles *in vitro* du phénomène d'adaptation pourraient s'avérer fort utiles. Un premier modèle *in vitro* proposé consisterait à exposer directement du tissu musculaire lisse à la métacholine. Ce modèle permettrait, d'une part, de s'assurer que le phénomène de désensibilisation est indépendant des autres types de cellules retrouvés dans les voies respiratoires et, d'autre part, d'évaluer quel sous-type de récepteur muscarinique est réellement impliqué dans le phénomène de désensibilisation (en utilisant des agonistes/antagonistes spécifiques pour chacun d'eux). Un deuxième modèle *in vitro* proposé consisterait à exposer des cellules en cultures pour une longue durée afin d'évaluer le comportement du récepteur muscarinique par des méthodes de biologie moléculaire.

L'objectif final du projet d'adaptation du récepteur muscarinique est d'utiliser ce phénomène dans une optique de développement de nouveaux traitements contre l'asthme plus efficaces. Ainsi, nous voudrions réaliser un criblage à haut débit afin d'évaluer les impacts de différents agonistes sur les différentes voies de signalisation en aval du récepteur muscarinique. Pour cela, la technologie de transfert d'énergie par bioluminescence (BRET) pourrait être utilisée. Cette technologie permet de quantifier l'interaction en direct entre deux protéines fusionnées respectivement avec un donneur d'énergie et un accepteur, et ce, dans un modèle de cellules en culture. Ainsi, des stratagèmes BRET permettraient d'évaluer simultanément les différents comportements du récepteur soit celui d'adaptation et d'activation de la contraction. L'objectif serait d'éventuellement trouver des molécules qui permettent d'induire le phénomène d'adaptation du récepteur sans activer le récepteur. Bref, ce type de molécule aurait un double effet soit en agissant comme antagoniste du récepteur muscarinique et en induisant l'adaptation du récepteur.

Autres publications

Lors de mon cheminement à la Maîtrise en médecine expérimentale, j'ai contribué à la publication de 6 articles scientifiques, dont 4 à titre de premier auteur. Dans la section suivante de mon mémoire, je présente les résumés de deux articles dans lesquels j'ai contribué et qui ont été publiés lors de mes études de maîtrise.

Assessment of Airway Distensibility by the Forced Oscillation Technique: Reproducible and Potentially Simplifiable

Samuel Mailhot-Larouche¹, Mélanie Lachance¹, Michella Bullone², Cyndi Henry¹, Ronald J. Dandurand³, Louis-Philippe Boulet¹, Michel Laviolette¹, Gregory G. King^{4,5,6}, Claude S. Farah^{4,5,7,8}, Bossé Y¹.

¹Department of Medicine, Quebec Heart and Lung Institute, Université Laval, Quebec, QC, Canada

²Department of Veterinary Science, University of Turin, Turin, Italy

³Meakins-Christie Laboratories, FOT Unit, Centre for Innovative Medicine, Montreal Chest Institute, McGill University Health Centre and McGill University, Montreal, QC, Canada

⁴Woolcock Institute of Medical Research, Sydney, NSW, Australia

⁵Sydney Medical School, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia

⁶Department of Respiratory Medicine, Royal North Shore Hospital, Sydney, NSW, Australia

⁷Department of Respiratory Medicine, Concord Hospital, Sydney, NSW, Australia

⁸Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Macquarie University, Sydney, NSW, Australia

A non-invasive index of airway distensibility is required to track airway remodeling over time. The forced oscillation technique (FOT) provides such an index by measuring the change in respiratory system conductance at 5 Hz over the corresponding change in lung volume ($\Delta G_{rs5}/\Delta V_L$). To become useful clinically, this method has to be reproducible and easy to perform. The series of breathing maneuvers required to measure distensibility would be greatly facilitated if the difficulty of breathing below functional residual capacity (FRC) could be precluded and the number of maneuvers could be reduced. The distensibility at lung volumes below FRC is also reduced by several confounders, suggesting that excluding data points below FRC should provide a better surrogate for airway remodeling. The objectives of this study were to investigate the reproducibility of airway distensibility measured by FOT and to assess whether the method could be simplified to increase feasibility. Distensibility was measured at three separate occasions in 13 healthy volunteers. At each visit, three deflationary maneuvers were performed, each

consisting of tidal breathing from total lung capacity (TLC) to residual volume by slowly decreasing the end-expiratory volume on each subsequent breath. Distensibility was calculated by using either all data points from TLC to residual volume (RV) or only data points from TLC to FRC for either all three or only the first two deflationary maneuvers. Intra-class correlation coefficients (ICC) were used to assess reproducibility and Bland-Altman analyses were used to assess the level of agreement between the differently calculated values of distensibility. The results indicate that distensibility calculated using all data points is reproducible (ICC = 0.64). Using data points from TLC to FRC slightly improved reproducibility (ICC = 0.68) and increased distensibility by 19.4%, which was expected as distensibility above FRC should not be affected by confounders. Using only data points within the first two maneuvers did not affect reproducibility when tested between TLC and FRC (ICC = 0.66). We conclude that a valuable measure of airway distensibility could potentially be obtained with only two deflationary maneuvers that do not require breathing below FRC. This simplified method would increase feasibility without compromising reproducibility. **Front. Physiol. 2017; 8: 223**

Copyright © 2017 Mailhot-Larouche, Lachance, Bullone, Henry, Dandurand, Boulet, Laviolette, King, Farah and Bossé.

An in vitro study examining the duration between deep inspirations on the rate of renarrowing.

Samuel Mailhot-Larouche¹, Katherine Lortie¹, David Marsolais¹, Nicolas Flamand¹, Ynuk Bossé¹

¹Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Québec, Canada

The factors altering the bronchodilatory response to a deep inspiration (DI) in asthma are important to decipher. In this in vitro study, we investigated the effect of changing the duration between DIs on the rate of force recovery post-DI in guinea pig bronchi. The airway smooth muscle (ASM) within the main bronchi were submitted to length oscillation that simulated tidal breathing in different contractile states during 2, 5, 10 or 30min prior to a larger length excursion that simulated a DI. The contractile states of ASM were determined by adding either methacholine or isoproterenol. Irrespective of the contractile state, the duration between DIs neither affected the measured force during length oscillation nor the bronchodilator effect of DI. Contrastingly, the rate of force recovery post-DI in contracted state increased as the duration between DIs decreased. Similar results were obtained with contracted parenchymal strips. These findings suggest that changing the duration between DIs may alter the rate of ASM force recovery post-DI and thereby affect the rate of renarrowing and the duration of the respiratory relief afforded by DI. **Repir. Physiol. Neurobiol. 2017 Sep;243:13-19**

Copyright © 2017 Elsevier B.V

Bibliographie

- Adler, K. B., Krill, J., Alberghini, T. V., & Evans, J. N. (1983). Effect of cytochalasin D on smooth muscle contraction. *Cell Motil*, 3(5-6), 545-551.
- Agrawal, A., Rengarajan, S., Adler, K. B., Ram, A., Ghosh, B., Fahim, M., & Dickey, B. F. (2007). Inhibition of mucin secretion with MARCKS-related peptide improves airway obstruction in a mouse model of asthma. *J Appl Physiol* (1985), 102(1), 399-405. doi:10.1152/jappphysiol.00630.2006
- Aikawa, T., Shimura, S., Sasaki, H., Ebina, M., & Takishima, T. (1992). Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*, 101(4), 916-921.
- Alangari, A. A. (2014). Corticosteroids in the treatment of acute asthma. *Ann Thorac Med*, 9(4), 187-192. doi:10.4103/1817-1737.140120
- Allen, I. C., Hartney, J. M., Coffman, T. M., Penn, R. B., Wess, J., & Koller, B. H. (2006). Thromboxane A2 induces airway constriction through an M3 muscarinic acetylcholine receptor-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290(3), L526-533. doi:10.1152/ajplung.00340.2005
- Altraja, A., Laitinen, A., Virtanen, I., Kampe, M., Simonsson, B. G., Karlsson, S. E., . . . Laitinen, L. A. (1996). Expression of laminins in the airways in various types of asthmatic patients: a morphometric study. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15(4), 482-488. doi:10.1165/ajrcmb.15.4.8879182
- Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med*, 106(1), 9-14. doi:10.1016/j.rmed.2011.09.007
- Anderson, S. D., & Kippelen, P. (2008). Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J Allergy Clin Immunol*, 122(2), 225-235; quiz 236-227. doi:10.1016/j.jaci.2008.05.001
- Avila, P. C. (2007). Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies. *Annu Rev Med*, 58, 185-203. doi:10.1146/annurev.med.58.061705.145252
- Ayres, J. G., Miles, J. F., & Barnes, P. J. (1998). Brittle asthma. *Thorax*, 53(4), 315-321. doi:10.1136/thx.53.4.315
- Baddar, S., Jayakrishnan, B., & Al-Rawas, O. A. (2014). Asthma control: importance of compliance and inhaler technique assessments. *J Asthma*, 51(4), 429-434. doi:10.3109/02770903.2013.871558
- Bai, A., Eidelman, D. H., Hogg, J. C., James, A. L., Lambert, R. K., Ludwig, M. S., . . . et al. (1994). Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol* (1985), 77(2), 1011-1014. doi:10.1152/jappl.1994.77.2.1011
- Bai, T. R. (1991). Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. A comparison between trachea and bronchus. *Am Rev Respir Dis*, 143(2), 441-443. doi:10.1164/ajrccm/143.2.441
- Balhara, J., & Gounni, A. S. (2012). The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. *Mucosal Immunol*, 5(6), 605-609. doi:10.1038/mi.2012.74
- Bara, I., Ozier, A., Tunon de Lara, J. M., Marthan, R., & Berger, P. (2010). Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J*, 36(5), 1174-1184. doi:10.1183/09031936.00019810

- Barbato, A., Turato, G., Baraldo, S., Bazzan, E., Calabrese, F., Panizzolo, C., . . . Saetta, M. (2006). Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(9), 975-981. doi:10.1164/rccm.200602-189OC
- Barisione, G., Baroffio, M., Crimi, E., & Brusasco, V. (2010). Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(4), 1016-1044. doi:10.3390/ph3041016
- Barlow, J. L., Bellosi, A., Hardman, C. S., Drynan, L. F., Wong, S. H., Cruickshank, J. P., & McKenzie, A. N. (2012). Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 129(1), 191-198.e191-194. doi:10.1016/j.jaci.2011.09.041
- Barnes, P., & Woolcock, A. (1998). Difficult asthma. *European Respiratory Journal*, 12(5), 1209-1218.
- Barnes, P. J. (1993). Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*, 52(5-6), 521-527.
- Barnes, P. J. (1995). Inhaled Glucocorticoids for Asthma. *New England Journal of Medicine*, 332(13), 868-875. doi:10.1056/nejm199503303321307
- Barnes, P. J. (1998). Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(5 Pt 3), S123-132. doi:10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac800
- Barnes, P. J. (2001). Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respir Res*, 2(2), 64-65. doi:10.1186/rr39
- Barnes, P. J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 8(3), 183-192. doi:10.1038/nri2254
- Bates, J. H., & Suki, B. (2008). Assessment of peripheral lung mechanics. *Respir Physiol Neurobiol*, 163(1-3), 54-63. doi:10.1016/j.resp.2008.03.012
- Benayoun, L., Druilhe, A., Dombret, M. C., Aubier, M., & Pretolani, M. (2003). Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(10), 1360-1368. doi:10.1164/rccm.200209-1030OC
- Bentley, J. K., & Hershenson, M. B. (2008). Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc*, 5(1), 89-96. doi:10.1513/pats.200705-063VS
- Berger, P., Girodet, P. O., Begueret, H., Ousova, O., Perng, D. W., Marthan, R., . . . Tunon de Lara, J. M. (2003). Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb j*, 17(14), 2139-2141. doi:10.1096/fj.03-0041fje
- Bergeron, C., Al-Ramli, W., & Hamid, Q. (2009). Remodeling in Asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(3), 301-305. doi:10.1513/pats.200808-089RM
- Bergeron, C., Tulic, M. K., & Hamid, Q. (2007). Tools used to measure airway remodelling in research. *Eur Respir J*, 29(3), 596-604. doi:10.1183/09031936.00019906
- Bergeron, C., Tulic, M. K., & Hamid, Q. (2010). Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice. *Canadian Respiratory Journal : Journal of the Canadian Thoracic Society*, 17(4), e85-e93.
- Billington, C. K., & Penn, R. B. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res*, 4(1), 2.
- Bjorck, T., Gustafsson, L. E., & Dahlen, S. E. (1992). Isolated bronchi from asthmatics are hyperresponsive to adenosine, which apparently acts indirectly by liberation of

- leukotrienes and histamine. *Am Rev Respir Dis*, 145(5), 1087-1091. doi:10.1164/ajrccm/145.5.1087
- Bolton, T. B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiological Reviews*, 59(3), 606-718. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.606
- Bos, I. S., Gosens, R., Zuidhof, A. B., Schaafsma, D., Halayko, A. J., Meurs, H., & Zaagsma, J. (2007). Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J*, 30(4), 653-661. doi:10.1183/09031936.00004907
- Bosse, Y. (2012). Asthmatic airway hyperresponsiveness: the ants in the tree. *Trends Mol Med*, 18(11), 627-633. doi:10.1016/j.molmed.2012.09.002
- Bosse, Y. (2014). Endocrine regulation of airway contractility is overlooked. *J Endocrinol*, 222(2), R61-73. doi:10.1530/joe-14-0220
- Bosse, Y., & Hudson, T. J. (2007). Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. *Annu Rev Med*, 58, 171-184. doi:10.1146/annurev.med.58.071105.111738
- Bosse, Y., Pare, P. D., & Seow, C. Y. (2008). Airway wall remodeling in asthma: from the epithelial layer to the adventitia. *Curr Allergy Asthma Rep*, 8(4), 357-366.
- Bosse, Y., Riesenfeld, E. P., Pare, P. D., & Irvin, C. G. (2010). It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow. *Annu Rev Physiol*, 72, 437-462. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135851
- Boulet, L.-P., Boutin, H., Beauchesne, M.-F., Ducharme, F. M., & Ringuette, L. (2016). *L'asthme : comment devenir expert dans la prise en charge de cette maladie*. [Québec]: Presses Université Laval.
- Boulet, L.-P., Laviolette, M., Turcotte, H., Cartier, A., Dugas, M., Malo, J.-L., & Boutet, M. (1997). Bronchial Subepithelial Fibrosis Correlates With Airway Responsiveness to Methacholine. *Chest*, 112(1), 45-52. doi:<https://doi.org/10.1378/chest.112.1.45>
- Boulet, L. P. (2003). Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a curiosity or an opportunity to prevent asthma? *Am J Respir Crit Care Med*, 167(3), 371-378. doi:10.1164/rccm.200111-084PP
- Boulet, L. P., Cartier, A., Thomson, N. C., Roberts, R. S., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1983). Asthma and increases in nonallergic bronchial responsiveness from seasonal pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol*, 71(4), 399-406.
- Boulet, L. P., Roberts, R. S., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1984). Prediction of late asthmatic responses to inhaled allergen. *Clin Allergy*, 14(4), 379-385.
- Boulet, L. P., Turcott, H., Plante, S., & Chakir, J. (2012). Airway function, inflammation and regulatory T cell function in subjects in asthma remission. *Can Respir J*, 19(1), 19-25. doi:10.1155/2012/347989
- Bradding, P., & Holgate, S. T. (1999). Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol*, 31(2), 119-133.
- Bremerich, D. H., Warner, D. O., Lorenz, R. R., Shumway, R., & Jones, K. A. (1997). Role of protein kinase C in calcium sensitization during muscarinic stimulation in airway smooth muscle. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 1), L775-781.
- Brewster, C. E., Howarth, P. H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S. T., & Roche, W. R. (1990). Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3(5), 507-511. doi:10.1165/ajrcmb/3.5.507

- Brightling, C. E., Ammit, A. J., Kaur, D., Black, J. L., Wardlaw, A. J., Hughes, J. M., & Bradding, P. (2005). The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*, *171*(10), 1103-1108. doi:10.1164/rccm.200409-1220OC
- Brightling, C. E., Bradding, P., Symon, F. A., Holgate, S. T., Wardlaw, A. J., & Pavord, I. D. (2002). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*, *346*(22), 1699-1705. doi:10.1056/NEJMoa012705
- Brown, R. H. (2004). Marching to the beat of different drummers: individual airway response diversity. *Eur Respir J*, *24*(2), 193-194.
- Bucchieri, F., Puddicombe, S. M., Lordan, J. L., Richter, A., Buchanan, D., Wilson, S. J., . . . Davies, D. E. (2002). Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *27*(2), 179-185. doi:10.1165/ajrcmb.27.2.4699
- Budd, D. C., McDonald, J. E., & Tobin, A. B. (2000). Phosphorylation and regulation of a Gq/11-coupled receptor by casein kinase 1alpha. *J Biol Chem*, *275*(26), 19667-19675. doi:10.1074/jbc.M000492200
- Buist, A. S. (2003). Similarities and differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease: treatment and early outcomes. *European Respiratory Journal*, *21*(39 suppl), 30s-35s. doi:10.1183/09031936.03.00404903
- Bullens, D. M., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P. W., Dupont, L. J., & Ceuppens, J. L. (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res*, *7*, 135. doi:10.1186/1465-9921-7-135
- Bullimore, S. R., Siddiqui, S., Donovan, G. M., Martin, J. G., Sneyd, J., Bates, J. H., & Lauzon, A. M. (2011). Could an increase in airway smooth muscle shortening velocity cause airway hyperresponsiveness? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *300*(1), L121-131. doi:10.1152/ajplung.00228.2010
- Bullone, M., Beauchamp, G., Godbout, M., Martin, J. G., & Lavoie, J. P. (2015). Endobronchial Ultrasound Reliably Quantifies Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Asthma Model. *PLoS One*, *10*(9), e0136284. doi:10.1371/journal.pone.0136284
- Bullone, M., Chevigny, M., Allano, M., Martin, J. G., & Lavoie, J. P. (2014). Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol (1985)*, *117*(7), 806-815. doi:10.1152/jappphysiol.00468.2014
- Busse, W. W., Banks-Schlegel, S., & Wenzel, S. E. (2000). Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *106*(6), 1033-1042. doi:10.1067/mai.2000.111307
- Busse, W. W., Dahl, R., Jenkins, C., & Cruz, A. A. (2016). Long-acting muscarinic antagonists: a potential add-on therapy in the treatment of asthma? *Eur Respir Rev*, *25*(139), 54-64. doi:10.1183/16000617.0052-2015
- Busse, W. W., & Sedgwick, J. B. (1992). Eosinophils in asthma. *Ann Allergy*, *68*(3), 286-290.
- Calderon, M. A., Alves, B., Jacobson, M., Hurwitz, B., Sheikh, A., & Durham, S. (2007). Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*(1), Cd001936. doi:10.1002/14651858.CD001936.pub2

- Campana, L., Kenyon, J., Zhalehdoust-Sani, S., Tzeng, Y. S., Sun, Y., Albert, M., & Lutchen, K. R. (2009). Probing airway conditions governing ventilation defects in asthma via hyperpolarized MRI image functional modeling. *J Appl Physiol*, *106*(4), 1293-1300.
- Canada, S. (2014). CANSIM (base de données) Tableau 105-0501.
- Canning, B. J. (2006). Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol* (1985), *101*(3), 971-985. doi:10.1152/jappphysiol.00313.2006
- Canning, B. J., & Fischer, A. (2001). Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir Physiol*, *125*(1-2), 113-127.
- Careau, E., & Bissonnette, E. Y. (2004). Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *31*(1), 22-27. doi:10.1165/rcmb.2003-0229OC
- Careau, E., Proulx, L. I., Pouliot, P., Spahr, A., Turmel, V., & Bissonnette, E. Y. (2006). Antigen sensitization modulates alveolar macrophage functions in an asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *290*(5), L871-879. doi:10.1152/ajplung.00219.2005
- Careau, E., Turmel, V., Lauzon-Joset, J. F., & Bissonnette, E. Y. (2010). Alveolar macrophages reduce airway hyperresponsiveness and modulate cytokine levels. *Exp Lung Res*, *36*(5), 255-261. doi:10.3109/01902140903410757
- Carey, W. D. (2010). *Current clinical medicine*. In. Retrieved from Accès via ProQuest Ebook Central
<https://ebookcentral.proquest.com/lib/ulaval/detail.action?docID=1430129>
<http://ariane.ulaval.ca/cgi-bin/recherche.cgi?qu=a2344284>
- Carr, T. F., & Bleecker, E. (2016). Asthma heterogeneity and severity. *The World Allergy Organization Journal*, *9*(1), 41. doi:10.1186/s40413-016-0131-2
- Carroll, N., Elliot, J., Morton, A., & James, A. (1993). The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*, *147*(2), 405-410. doi:10.1164/ajrccm/147.2.405
- Carroll, N. G., Mutavdzic, S., & James, A. L. (2002). Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*, *19*(5), 879-885.
- Casarosa, P., Bouyssou, T., Germeyer, S., Schnapp, A., Gantner, F., & Pieper, M. (2009). Preclinical evaluation of long-acting muscarinic antagonists: comparison of tiotropium and investigational drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, *330*(2), 660-668. doi:10.1124/jpet.109.152470
- Caulfield, M. P., & Birdsall, N. J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, *50*(2), 279-290.
- Celli, B. R. (2000). The importance of spirometry in COPD and asthma: effect on approach to management. *Chest*, *117*(2 Suppl), 15s-19s.
- Chakir, J., Haj-Salem, I., Gras, D., Joubert, P., Beaudoin, E. L., Biardel, S., . . . Laviolette, M. (2015). Effects of Bronchial Thermoplasty on Airway Smooth Muscle and Collagen Deposition in Asthma. *Ann Am Thorac Soc*, *12*(11), 1612-1618. doi:10.1513/AnnalsATS.201504-208OC
- Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., . . . Hamid, Q. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*, *111*(6), 1293-1298.

- Chang, A., & Bosse, Y. (2016). Targeting Single Molecules in Asthma Benefits Few. *Trends Mol Med*, 22(11), 935-945. doi:10.1016/j.molmed.2016.09.001
- Chen, Y., Dales, R., & Jiang, Y. (2006). The association between obesity and asthma is stronger in nonallergic than allergic adults. *Chest*, 130(3), 890-895. doi:10.1378/chest.130.3.890
- Chetta, A., Foresi, A., Del Donno, M., Bertorelli, G., Pesci, A., & Olivieri, D. (1997). Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest*, 111(4), 852-857.
- Chhabra, S. K. (2015). Clinical application of spirometry in asthma: Why, when and how often? *Lung India*, 32(6), 635-637. doi:10.4103/0970-2113.168139
- Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, 10(8), 322-328.
- Chin, L. Y., Bosse, Y., Pascoe, C., Hackett, T. L., Seow, C. Y., & Pare, P. D. (2012). Mechanical properties of asthmatic airway smooth muscle. *Eur Respir J*, 40(1), 45-54. doi:10.1183/09031936.00065411
- Cockcroft, D. W. (2010). Direct challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*, 138(2 Suppl), 18S-24S. doi:10.1378/chest.10-0088
- Cockcroft, D. W., Ruffin, R. E., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1977). Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy*, 7(6), 503-513.
- Colebatch, H. J., & Halmagyi, D. F. (1963). EFFECT OF VAGOTOMY AND VAGAL STIMULATION ON LUNG MECHANICS AND CIRCULATION. *J Appl Physiol*, 18, 881-887. doi:10.1152/jappl.1963.18.5.881
- Cortijo, J., Mata, M., Milara, J., Donet, E., Gavalda, A., Miralpeix, M., & Morcillo, E. J. (2011). Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur Respir J*, 37(2), 244-254. doi:10.1183/09031936.00182009
- Cox, G., Thomson, N. C., Rubin, A. S., Niven, R. M., Corris, P. A., Siersted, H. C., . . . Laviolette, M. (2007). Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med*, 356(13), 1327-1337. doi:10.1056/NEJMoa064707
- Crapo, R. O., Casaburi, R., Coates, A. L., Enright, P. L., Hankinson, J. L., Irvin, C. G., . . . Sterk, P. J. (2000). Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(1), 309-329. doi:10.1164/ajrccm.161.1.ats11-99
- Crawford, A. B., Makowska, M., & Engel, L. A. (1987). Effect of bronchomotor tone on static mechanical properties of lung and ventilation distribution. *J Appl Physiol*, 63(6), 2278-2285. doi:10.1152/jappl.1987.63.6.2278
- D'Amato, G., Salzillo, A., Piccolo, A., D'Amato, M., & Liccardi, G. (2007). A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy for severe allergic (IgE-mediated) asthma. *Ther Clin Risk Manag*, 3(4), 613-619.
- D'Urzo, A. D., Tamari, I., Bouchard, J., Jhirad, R., & Jugovic, P. (2011). New spirometry interpretation algorithm: Primary Care Respiratory Alliance of Canada approach. *Can Fam Physician*, 57(10), 1148-1152.

- Da Silva, C. A., Reber, L., & Frossard, N. (2006). Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol*, *20*(1), 21-39. doi:10.1111/j.1472-8206.2005.00390.x
- Dahl, R. (2006). Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir Med*, *100*(8), 1307-1317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.11.020>
- Damera, G., Tliba, O., & Panettieri, R. A., Jr. (2009). Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. *Pulm Pharmacol Ther*, *22*(5), 353-359. doi:10.1016/j.pupt.2008.12.006
- Daykin, K., Widdop, S., & Hall, I. P. (1993). Control of histamine induced inositol phospholipid hydrolysis in cultured human tracheal smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, *246*(2), 135-140.
- de Lange, E. E., Altes, T. A., Patrie, J. T., Battiston, J. J., Juersivich, A. P., Mugler, J. P., 3rd, & Platts-Mills, T. A. (2009). Changes in regional airflow obstruction over time in the lungs of patients with asthma: evaluation with 3He MR imaging. *Radiology*, *250*(2), 567-575. doi:10.1148/radiol.2502080188
- de Marco, R., Locatelli, F., Sunyer, J., & Burney, P. (2000). Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med*, *162*(1), 68-74. doi:10.1164/ajrccm.162.1.9907008
- de Medeiros Matsushita, M., da Silva, L. F., dos Santos, M. A., Fernezlian, S., Schruppf, J. A., Roughley, P., . . . Dolhnikoff, M. (2005). Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol*, *207*(1), 102-110. doi:10.1002/path.1818
- Dean, K., & Niven, R. (2017). Asthma Phenotypes and Endotypes: Implications for Personalised Therapy. *BioDrugs*, *31*(5), 393-408. doi:10.1007/s40259-017-0242-5
- Detjen, K., Yang, J., & Logsdon, C. D. (1995). Muscarinic acetylcholine receptor down-regulation limits the extent of inhibition of cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(24), 10929-10933.
- DeWire, S. M., Yamashita, D. S., Rominger, D. H., Liu, G., Cowan, C. L., Graczyk, T. M., . . . Violin, J. D. (2013). A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, *344*(3), 708-717. doi:10.1124/jpet.112.201616
- Dick, S., Doust, E., Cowie, H., Ayres, J. G., & Turner, S. (2014). Associations between environmental exposures and asthma control and exacerbations in young children: a systematic review. *BMJ Open*, *4*(2). doi:10.1136/bmjopen-2013-003827
- Disse, B., Speck, G. A., Rominger, K. L., Witek, T. J., Jr., & Hammer, R. (1999). Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life Sci*, *64*(6-7), 457-464.
- Dowell, M. L., Lavoie, T. L., Solway, J., & Krishnan, R. (2014). Airway smooth muscle: a potential target for asthma therapy. *Curr Opin Pulm Med*, *20*(1), 66-72. doi:10.1097/mcp.0000000000000011
- Downie, S. R., Salome, C. M., Verbanck, S., Thompson, B., Berend, N., & King, G. G. (2007). Ventilation heterogeneity is a major determinant of airway hyperresponsiveness in asthma, independent of airway inflammation. *Thorax*, *62*(8), 684-689. doi:10.1136/thx.2006.069682

- DuBois, A. B., Botelho, S. Y., & Comroe, J. H. (1956). A NEW METHOD FOR MEASURING AIRWAY RESISTANCE IN MAN USING A BODY PLETHYSMOGRAPH: VALUES IN NORMAL SUBJECTS AND IN PATIENTS WITH RESPIRATORY DISEASE. *J Clin Invest*, 35(3), 327-335.
- Duffy, D. L., Martin, N. G., Battistutta, D., Hopper, J. L., & Mathews, J. D. (1990). Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis*, 142(6 Pt 1), 1351-1358. doi:10.1164/ajrccm/142.6_Pt_1.1351
- Duhamel, D. R., & Hales, J. B. (2010). Bronchial Thermoplasty: A Novel Therapeutic Approach to Severe Asthma. (45), e2428. doi:doi:10.3791/2428
- Dweik, R. A., Boggs, P. B., Erzurum, S. C., Irvin, C. G., Leigh, M. W., Lundberg, J. O., . . . Taylor, D. R. (2011). An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled. *Am J Respir Crit Care Med*, 184(5), 602-615. doi:10.1164/rccm.9120-11ST
- Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T., & Motomiya, M. (1993). Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis*, 148(3), 720-726. doi:10.1164/ajrccm/148.3.720
- Ebina, M., Yaegashi, H., Takahashi, T., Motomiya, M., & Tanemura, M. (1990). Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am Rev Respir Dis*, 141(5 Pt 1), 1322-1326. doi:10.1164/ajrccm/141.5_Pt_1.1322
- Eglen, R. M., Reddy, H., Watson, N., & Challiss, R. A. (1994). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*, 15(4), 114-119. doi:10.1016/0165-6147(94)90047-7
- El-Shazly, A., Berger, P., Girodet, P.-O., Ousova, O., Fayon, M., Vernejoux, J.-M., . . . Tunonde-Lara, J. M. (2006). Fraktalkine Produced by Airway Smooth Muscle Cells Contributes to Mast Cell Recruitment in Asthma. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1860-1868. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1860
- Erle, D. J., & Sheppard, D. (2014). The cell biology of asthma. *The Journal of Cell Biology*, 205(5), 621-631. doi:10.1083/jcb.201401050
- Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. (2007). *J Allergy Clin Immunol*, 120(5 Suppl), S94-138. doi:10.1016/j.jaci.2007.09.043
- Fahy, J. V. (2009). Eosinophilic and Neutrophilic Inflammation in Asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(3), 256-259. doi:10.1513/pats.200808-087RM
- Fahy, J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 57-65. doi:10.1038/nri3786
- Fahy, J. V., & Dickey, B. F. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *The New England journal of medicine*, 363(23), 2233-2247. doi:10.1056/NEJMra0910061
- Fanta, C. H. (2009). Asthma. *New England Journal of Medicine*, 360(10), 1002-1014. doi:10.1056/NEJMra0804579
- Farghaly, H. S., Blagbrough, I. S., Medina-Tato, D. A., & Watson, M. L. (2008). Interleukin 13 increases contractility of murine tracheal smooth muscle by a phosphoinositide 3-kinase p110delta-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 73(5), 1530-1537. doi:10.1124/mol.108.045419

- Feltis, B. N., Wignarajah, D., Reid, D. W., Ward, C., Harding, R., & Walters, E. H. (2007). Effects of inhaled fluticasone on angiogenesis and vascular endothelial growth factor in asthma. *Thorax*, *62*(4), 314-319. doi:10.1136/thx.2006.069229
- FitzGerald, J. M., Lemiere, C., Loughheed, M. D., Ducharme, F. M., Dell, S. D., Ramsey, C., . . . Grad, R. (2017). Recognition and management of severe asthma: A Canadian Thoracic Society position statement. *Canadian Journal of Respiratory, Critical Care, and Sleep Medicine*, *1*(4), 199-221. doi:10.1080/24745332.2017.1395250
- Fowler, S. J., Dempsey, O. J., Sims, E. J., & Lipworth, B. J. (2000). Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. Relationship to asthma severity and beta(2)-receptor genotype. *Am J Respir Crit Care Med*, *162*(4 Pt 1), 1318-1322. doi:10.1164/ajrccm.162.4.9912103
- Fredberg, J. J. (2001). Airway obstruction in asthma: does the response to a deep inspiration matter? *Respir Res*, *2*(5), 273-275.
- Fries, K. M., Blieden, T., Looney, R. J., Sempowski, G. D., Silvera, M. R., Willis, R. A., & Phipps, R. P. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*, *72*(3), 283-292.
- Fritzsching, B. (2017). Personalized Medicine in Allergic Asthma: At the Crossroads of Allergen Immunotherapy and "Biologicals". *Front Pediatr*, *5*. doi:10.3389/fped.2017.00031
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature medicine*, *18*(5), 693-704. doi:10.1038/nm.2755
- Ganitkevich, V. Y., & Isenberg, G. (1991). Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*, *435*, 187-205.
- Gaurav, R., & Agrawal, D. K. (2013). Clinical View on the Importance of Dendritic Cells in Asthma. *Expert Rev Clin Immunol*, *9*(10), 899-919. doi:10.1586/1744666x.2013.837260
- Gazzola, M., Henry, C., Couture, C., Marsolais, D., King, G. G., Fredberg, J. J., & Bosse, Y. (2016). Smooth muscle in human bronchi is disposed to resist airway distension. *Respir Physiol Neurobiol*, *229*, 51-58. doi:10.1016/j.resp.2016.04.005
- Gazzola, M., Lortie, K., Henry, C., Mailhot-Larouche, S., Chapman, D. G., Couture, C., . . . Bosse, Y. (2017). Airway smooth muscle tone increases airway responsiveness in healthy young adults. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *312*(3), L348-L357. doi:10.1152/ajplung.00400.2016
- Gazzola, M., Mailhot-Larouche, S., Beucher, C., & Bosse, Y. (2018). The underlying physiological mechanisms whereby anti-cholinergics alleviate asthma. *Can J Physiol Pharmacol*. doi:10.1139/cjpp-2017-0448
- Geha, R. S., Jabara, H. H., & Brodeur, S. R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*, *3*(9), 721-732. doi:10.1038/nri1181
- Ghosh, E., Kumari, P., Jaiman, D., & Shukla, A. K. (2015). Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *16*(2), 69-81. doi:10.1038/nrm3933

- Giembycz, M. A., & Raeburn, D. (1991). Putative substrates for cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the control of airway smooth muscle tone. *J Auton Pharmacol*, *11*(6), 365-398.
- Gold, M. J., Antignano, F., Halim, T. Y., Hirota, J. A., Blanchet, M. R., Zaph, C., . . . McNagny, K. M. (2014). Group 2 innate lymphoid cells facilitate sensitization to local, but not systemic, TH2-inducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol*, *133*(4), 1142-1148. doi:10.1016/j.jaci.2014.02.033
- Goldie, R. G., Spina, D., Henry, P. J., Lulich, K. M., & Paterson, J. W. (1986). In vitro responsiveness of human asthmatic bronchus to carbachol, histamine, beta-adrenoceptor agonists and theophylline. *Br J Clin Pharmacol*, *22*(6), 669-676.
- Goldman, M. D. (2001). Clinical application of forced oscillation. *Pulm Pharmacol Ther*, *14*(5), 341-350. doi:10.1006/pupt.2001.0310
- Goldman, M. D., Saadeh, C., & Ross, D. (2005). Clinical applications of forced oscillation to assess peripheral airway function. *Respir Physiol Neurobiol*, *148*(1-2), 179-194. doi:10.1016/j.resp.2005.05.026
- Gorska, K., Korczynski, P., Mierzejewski, M., Kosciuch, J., Zukowska, M., Maskey-Warzechowska, M., & Krenke, R. (2016). Comparison of endobronchial ultrasound and high resolution computed tomography as tools for airway wall imaging in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, *117*, 131-138. doi:10.1016/j.rmed.2016.06.011
- Gosens, R., & Grainge, C. (2015). Bronchoconstriction and airway biology: potential impact and therapeutic opportunities. *Chest*, *147*(3), 798-803. doi:10.1378/chest.14-1142
- Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H., & Halayko, A. J. (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respiratory Research*, *7*(1), 73-73. doi:10.1186/1465-9921-7-73
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, *8*(3), 205-217. doi:10.1038/nri2273
- Grainge, C. L., Lau, L. C., Ward, J. A., Dulay, V., Lahiff, G., Wilson, S., . . . Howarth, P. H. (2011). Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med*, *364*(21), 2006-2015. doi:10.1056/NEJMoa1014350
- Guarnieri, M., & Balmes, J. R. (2014). Outdoor air pollution and asthma. *Lancet*, *383*(9928), 1581-1592. doi:10.1016/S0140-6736(14)60617-6
- Gunst, S. J., & Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, *295*(3), C576-587. doi:10.1152/ajpcell.00253.2008
- Halim, T. Y., Krauss, R. H., Sun, A. C., & Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, *36*(3), 451-463. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.020
- Halim, T. Y., Steer, C. A., Matha, L., Gold, M. J., Martinez-Gonzalez, I., McNagny, K. M., . . . Takei, F. (2014). Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, *40*(3), 425-435. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.011

- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., & Hamid, Q. (2011). Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *44*(2), 127-133. doi:10.1165/rcmb.2010-0027TR
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., & Hamid, Q. (2010). Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pharmacol*, *10*(3), 236-245. doi:10.1016/j.coph.2010.06.004
- Hantos, Z., Daroczy, B., Suki, B., Nagy, S., & Fredberg, J. J. (1992). Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* (1985), *72*(1), 168-178. doi:10.1152/jappl.1992.72.1.168
- Harris, R. S., Winkler, T., Tgavalekos, N., Musch, G., Melo, M. F., Schroeder, T., . . . Venegas, J. G. (2006). Regional pulmonary perfusion, inflation, and ventilation defects in bronchoconstricted patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, *174*(3), 245-253. doi:10.1164/rccm.200510-1634OC
- Harrison, T. R., & Kasper, D. L. (2006). *Harrison, principes de médecine interne* (7e éd. française ed.). Paris: Flammarion médecine-sciences.
- Heinzerling, L., Frew, A. J., Bindslev-Jensen, C., Bonini, S., Bousquet, J., Bresciani, M., . . . Zuberbier, T. (2005). Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe--a survey from the GALEN network. *Allergy*, *60*. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00895.x
- Hetzl, M. R., & Clark, T. J. (1980). Comparison of normal and asthmatic circadian rhythms in peak expiratory flow rate. *Thorax*, *35*(10), 732-738.
- Hirschhorn, J. N., Lohmueller, K., Byrne, E., & Hirschhorn, K. (2002). A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*, *4*(2), 45-61. doi:10.1097/00125817-200203000-00002
- Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A., & Sly, P. D. (1999). The role of allergy in the development of asthma. *Nature*, *402*(6760 Suppl), B12-17.
- Homer, R. J., & Elias, J. A. (2000). Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med*, *21*(2), 331-343, ix.
- Hoshino, M., Takahashi, M., & Aoike, N. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, *107*(2), 295-301. doi:10.1067/mai.2001.111928
- Huang, J., Olivenstein, R., Taha, R., Hamid, Q., & Ludwig, M. (1999). Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, *160*(2), 725-729. doi:10.1164/ajrccm.160.2.9809040
- Hui, Y., Cheng, Y., Smalera, I., Jian, W., Goldhahn, L., Fitzgerald, G. A., & Funk, C. D. (2004). Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. *Circulation*, *110*(21), 3360-3366. doi:10.1161/01.Cir.0000147775.50954.Aa
- Humbert, M., Corrigan, C. J., Kimmitt, P., Till, S. J., Kay, A. B., & Durham, S. R. (1997). Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, *156*(3 Pt 1), 704-708. doi:10.1164/ajrccm.156.3.9610033
- Israel, E., & Reddel, H. K. (2017). Severe and Difficult-to-Treat Asthma in Adults. *New England Journal of Medicine*, *377*(10), 965-976. doi:10.1056/NEJMra1608969

- James, A. L., Elliot, J. G., Jones, R. L., Carroll, M. L., Mauad, T., Bai, T. R., . . . Green, F. H. (2012). Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, *185*(10), 1058-1064. doi:10.1164/rccm.201110-1849OC
- James, A. L., & Wenzel, S. (2007). Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J*, *30*(1), 134-155. doi:10.1183/09031936.00146905
- Jansen, D. F., Timens, W., Kraan, J., Rijcken, B., & Postma, D. S. (1997). (A)symptomatic bronchial hyper-responsiveness and asthma. *Respir Med*, *91*(3), 121-134.
- Janssen, L. J., Gauvreau, G. M., Killian, K. J., & O'Byrne, P. M. (2015). The Effects of Repeated Bronchoprovocation on FEV1 in Subjects with Asthma. *Ann Am Thorac Soc*, *12*(10), 1589-1591. doi:10.1513/AnnalsATS.201506-325LE
- Jat, K. R. (2013). Spirometry in children. *Prim Care Respir J*, *22*(2), 221-229. doi:10.4104/pcrj.2013.00042
- Jeffery, P., Holgate, S., & Wenzel, S. (2003). Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, *168*(6 Pt 2), S1-17. doi:10.1164/rccm.200202-150WS
- Jeffery, P. K. (2001). Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, *164*(10 Pt 2), S28-38. doi:10.1164/ajrccm.164.supplement_2.2106061
- Jeffery, P. K., Wardlaw, A. J., Nelson, F. C., Collins, J. V., & Kay, A. B. (1989). Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*, *140*(6), 1745-1753. doi:10.1164/ajrccm/140.6.1745
- Johns, D. P., Walters, J. A. E., & Walters, E. H. (2014). Diagnosis and early detection of COPD using spirometry. *J Thorac Dis*, *6*(11), 1557-1569. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.18
- Johnson, P. R., Black, J. L., Carlin, S., Ge, Q., & Underwood, P. A. (2000). The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med*, *162*(6), 2145-2151. doi:10.1164/ajrccm.162.6.9909111
- Johnston, N. W., Johnston, S. L., Duncan, J. M., Greene, J. M., Kebabze, T., Keith, P. K., . . . Sears, M. R. (2005). The September epidemic of asthma exacerbations in children: a search for etiology. *J Allergy Clin Immunol*, *115*(1), 132-138. doi:10.1016/j.jaci.2004.09.025
- Joseph, M., Tonnel, A. B., Torpier, G., Capron, A., Arnoux, B., & Benveniste, J. (1983). Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Clin Invest*, *71*(2), 221-230.
- Kaminsky, D. A. (2012). What does airway resistance tell us about lung function? *Respir Care*, *57*(1), 85-96; discussion 96-89. doi:10.4187/respcare.01411
- Kamm, K. E., & Stull, J. T. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *25*, 593-620. doi:10.1146/annurev.pa.25.040185.003113
- Kang, J. Y., Rhee, C. K., Kim, J. S., Park, C. K., Kim, S. J., Lee, S. H., . . . Lee, S. Y. (2012). Effect of tiotropium bromide on airway remodeling in a chronic asthma model. *Annals of*

- Allergy, Asthma & Immunology*, 109(1), 29-35.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.05.005>
- Kim, S. H., & Lee, Y. C. (2009). Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model. *J Pharm Pharmacol*, 61(3), 353-359. doi:10.1211/jpp/61.03.0010
- King, G. G., Eberl, S., Salome, C. M., Meikle, S. R., & Woolcock, A. J. (1997). Airway closure measured by a technegas bolus and SPECT. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(2), 682-688. doi:10.1164/ajrccm.155.2.9032213
- King, G. G., Eberl, S., Salome, C. M., Young, I. H., & Woolcock, A. J. (1998). Differences in airway closure between normal and asthmatic subjects measured with single-photon emission computed tomography and technegas. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(6), 1900-1906. doi:10.1164/ajrccm.158.6.9608027
- Kistemaker, L. E., Bos, S. T., Mudde, W. M., Hylkema, M. N., Hiemstra, P. S., Wess, J., . . . Gosens, R. (2014). Muscarinic M(3) receptors contribute to allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50(4), 690-698. doi:10.1165/rcmb.2013-0220OC
- Kistemaker, L. E., Hiemstra, P. S., Bos, I. S., Bouwman, S., van den Berge, M., Hylkema, M. N., . . . Gosens, R. (2015). Tiotropium attenuates IL-13-induced goblet cell metaplasia of human airway epithelial cells. *Thorax*, 70(7), 668-676. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-205731
- Kistemaker, L. E. M., Oenema, T. A., Baarsma, H. A., Bos, I. S. T., Schmidt, M., Facchinetti, F., . . . Gosens, R. (2017). The PDE4 inhibitor CHF-6001 and LAMAs inhibit bronchoconstriction-induced remodeling in lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 313(3), L507-L515. doi:10.1152/ajplung.00069.2017
- Klein Wolterink, R. G., Kleinjan, A., van Nimwegen, M., Bergen, I., de Bruijn, M., Levani, Y., & Hendriks, R. W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol*, 42(5), 1106-1116. doi:10.1002/eji.201142018
- Koarai, A., Traves, S. L., Fenwick, P. S., Brown, S. M., Chana, K. K., Russell, R. E., . . . Donnelly, L. E. (2012). Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J*, 39(3), 698-704. doi:10.1183/09031936.00136710
- Kotaru, C., Coreno, A., Skowronski, M., Muswick, G., Gilkeson, R. C., & McFadden, E. R., Jr. (2005). Morphometric changes after thermal and methacholine bronchoprovocations. *J Appl Physiol* (1985), 98(3), 1028-1036. doi:10.1152/japplphysiol.01186.2003
- Kozyrskyj, A. L., & Becker, A. B. (2004). Rural-urban differences in asthma prevalence: Possible explanations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2, Supplement), S306. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.596>
- Kudo, M., Melton, A. C., Chen, C., Engler, M. B., Huang, K. E., Ren, X., . . . Sheppard, D. (2012). IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med*, 18(4), 547-554. doi:10.1038/nm.2684

- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., . . . Ito, M. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, *272*(19), 12257-12260.
- Laidlaw, T. M., & Boyce, J. A. (2016). Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease — New Prime Suspects. *New England Journal of Medicine*, *374*(5), 484-488. doi:10.1056/NEJMcibr1514013
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*, *31*(3), 412-424. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.008
- Lauzon, A. M. (2016). Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *5*. doi:10.12688/f1000research.7422.1
- Lauzon-Joset, J. F., Marsolais, D., Langlois, A., & Bissonnette, E. Y. (2014). Dysregulation of alveolar macrophages unleashes dendritic cell-mediated mechanisms of allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol*, *7*(1), 155-164. doi:10.1038/mi.2013.34
- Lavietes, M. H. (1984). Ventilatory control in asthma. *Clin Chest Med*, *5*(4), 607-617.
- LAVIOLETTE, M., MALMSTROM, K., LU, S., CHERVINSKY, P., PUJET, J.-C., PESZEK, I., . . . REISS, T. F. (1999). Montelukast Added to Inhaled Beclomethasone in Treatment of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *160*(6), 1862-1868. doi:10.1164/ajrccm.160.6.9803042
- Lavoie-Charland, E., Berube, J. C., Boulet, L. P., & Bosse, Y. (2016). Asthma susceptibility variants are more strongly associated with clinically similar subgroups. *J Asthma*, *53*(9), 907-913. doi:10.3109/02770903.2016.1165699
- Law, M., Morris, J. K., Wald, N., Luczynska, C., & Burney, P. (2005). Changes in atopy over a quarter of a century, based on cross sectional data at three time periods. *Bmj*, *330*(7501), 1187-1188. doi:10.1136/bmj.38435.582975.AE
- Lee, J. J., Dimina, D., Macias, M. P., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., O'Neill, K. R., . . . Lee, N. A. (2004). Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. *Science*, *305*(5691), 1773-1776. doi:10.1126/science.1099472
- Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L., & Hosey, M. M. (1998). Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*, *273*(21), 12967-12972.
- Lee, S. H., Johnson, J. D., Walsh, M. P., Van Lierop, J. E., Sutherland, C., Xu, A., . . . Cho, M. J. (2000). Differential regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca²⁺ concentration. *Biochem J*, *350 Pt 1*, 299-306.
- Lee-Gosselin, A., Gendron, D., Blanchet, M. R., Marsolais, D., & Bosse, Y. (2015). The gain of smooth muscle's contractile capacity induced by tone on in vivo airway responsiveness in mice. *J Appl Physiol (1985)*, *118*(6), 692-698. doi:10.1152/jappphysiol.00645.2014
- Li, J. T. (1995). Home peak expiratory flow rate monitoring in patients with asthma. *Mayo Clin Proc*, *70*(7), 649-656. doi:10.1016/s0025-6196(11)63916-5
- LI, X., & WILSON, J. W. (1997). Increased Vascularity of the Bronchial Mucosa in Mild Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *156*(1), 229-233. doi:10.1164/ajrccm.156.1.9607066
- Little, S. A., Sproule, M. W., Cowan, M. D., Macleod, K. J., Robertson, M., Love, J. G., . . . Thomson, N. C. (2002). High resolution computed tomographic assessment of

- airway wall thickness in chronic asthma: reproducibility and relationship with lung function and severity. *Thorax*, 57(3), 247-253.
- Liu, Y. J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, 203(2), 269-273. doi:10.1084/jem.20051745
- Lloyd, C. M., & Hawrylowicz, C. M. (2009). Regulatory T Cells in Asthma. *Immunity*, 31(3), 438-449. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.007
- Lloyd, C. M., & Hessel, E. M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*, 10(12), 838-848. doi:10.1038/nri2870
- Lopez, A. F., Begley, C. G., Williamson, D. J., Warren, D. J., Vadas, M. A., & Sanderson, C. J. (1986). Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J Exp Med*, 163(5), 1085-1099.
- Lortie, K., Maheux, C., Gendron, D., Langlois, A., Beaulieu, M.-J., Marsolais, D., . . . Blanchet, M.-R. (2018). CD34 Differentially Regulates Contractile and Noncontractile Elements of Airway Reactivity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(1), 79-88. doi:10.1165/rcmb.2017-0008OC
- Lötvall, J. (2001). Pharmacological similarities and differences between β 2-agonists. *Respir Med*, 95, S7-S11. doi:<https://doi.org/10.1053/rmed.2001.1139>
- Lotvall, J., Akdis, C. A., Bacharier, L. B., Bjermer, L., Casale, T. B., Custovic, A., . . . Greenberger, P. A. (2011). Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 127(2), 355-360. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.037
- Louis, R., Bettiol, J., Cataldo, D., Bureau, F., Seumois, G., Radermecker, M., . . . Djukanovic, R. (2003). [Value of induced sputum in the investigation of asthma]. *Rev Mal Respir*, 20(2 Pt 1), 215-223.
- Ludwig, M. S., Ftouhi-Paquin, N., Huang, W., Page, N., Chakir, J., & Hamid, Q. (2004). Mechanical strain enhances proteoglycan message in fibroblasts from asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 34(6), 926-930. doi:10.1111/j.1365-2222.2004.01980.x
- Lundgren, R., Soderberg, M., Horstedt, P., & Stenling, R. (1988). Morphological studies of bronchial mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Respir J*, 1(10), 883-889.
- Luo, J., Busillo, J. M., & Benovic, J. L. (2008). M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol*, 74(2), 338-347. doi:10.1124/mol.107.044750
- Lynch, K. R., O'Neill, G. P., Liu, Q., Im, D. S., Sawyer, N., Metters, K. M., . . . Evans, J. F. (1999). Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*, 399(6738), 789-793. doi:10.1038/21658
- Mailhot-Larouche, S., Deschenes, L., Gazzola, M., Lortie, K., Henry, C., Brook, B. S., . . . Bosse, Y. (2018). Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function. *J Appl Physiol (1985)*. doi:10.1152/jappphysiol.01073.2017
- Mailhot-Larouche, S., Lachance, M., Bullone, M., Henry, C., Dandurand, R. J., Boulet, L.-P., . . . Bossé, Y. (2017). Assessment of Airway Distensibility by the Forced Oscillation Technique: Reproducible and Potentially Simplifiable. *Front Physiol*, 8, 223. doi:10.3389/fphys.2017.00223

- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., & Beasley, R. (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*, *59*(5), 469-478. doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x
- Matsuda, A., Okayama, Y., Ebihara, N., Yokoi, N., Gao, P., Hamuro, J., . . . Kinoshita, S. (2008). High-affinity IgE receptor- β chain expression in human mast cells. *Journal of Immunological Methods*, *336*(2), 229-234. doi:10.1016/j.jim.2008.05.006
- Maurer, D., Ebner, C., Reininger, B., Fiebiger, E., Kraft, D., Kinet, J. P., & Stingl, G. (1995). The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol*, *154*(12), 6285-6290.
- Mazurek, J. M., & White, G. E. (2015). Work-related asthma-22 states, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *64*(13), 343-346.
- McGovern, T. K., Robichaud, A., Fereydoonzad, L., Schuessler, T. F., & Martin, J. G. (2013). Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique. *J Vis Exp*(75), e50172. doi:10.3791/50172
- McParland, B. E., Macklem, P. T., & Pare, P. D. (2003). Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol* (1985), *95*(1), 426-434. doi:10.1152/jappphysiol.00159.2003
- Mehta, D., & Gunst, S. J. (1999). Actin polymerization stimulated by contractile activation regulates force development in canine tracheal smooth muscle. *J Physiol*, *519 Pt 3*, 829-840.
- Miranda, C., Busacker, A., Balzar, S., Trudeau, J., & Wenzel, S. E. (2004). Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, *113*(1), 101-108. doi:10.1016/j.jaci.2003.10.041
- Mitchell, P. D., & O'Byrne, P. M. (2017). Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. *Pharmacol Ther*, *169*, 104-112. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.06.009
- Mitzner, W. (2004). Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, *169*(7), 787-790. doi:10.1164/rccm.200312-1636PP
- Moore, W. C., Hastie, A. T., Li, X., Li, H., Busse, W. W., Jarjour, N. N., . . . Bleecker, E. R. (2014). Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol*, *133*(6), 1557-1563.e1555. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.011
- Morishima, T., Ikai, H., & Imanaka, Y. (2013). Cost-Effectiveness Analysis of Omalizumab for the Treatment of Severe Asthma in Japan and the Value of Responder Prediction Methods Based on a Multinational Trial. *Value in Health Regional Issues*, *2*(1), 29-36. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vhri.2013.01.007>
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., . . . Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, *463*(7280), 540-544. doi:10.1038/nature08636
- Murdoch, J. R., & Lloyd, C. M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research*, *690*(1-2), 24-39. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005
- Nagai, H., Abe, T., Yamaguchi, I., Mito, K., Tsunematsu, M., Kimata, M., & Inagaki, N. (2000). Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase cutaneous response in mice. *J Allergy Clin Immunol*, *106*(1 Pt 2), S91-98.

- Nagarkar, D. R., Poposki, J. A., Comeau, M. R., Biyasheva, A., Avila, P. C., Schleimer, R. P., & Kato, A. (2012). Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(1), 225-232.e224. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.019>
- Nakano, Y., Muller, N. L., King, G. G., Niimi, A., Kalloger, S. E., Mishima, M., & Pare, P. D. (2002). Quantitative assessment of airway remodeling using high-resolution CT. *Chest*, *122*(6 Suppl), 271s-275s.
- Nakatani, Y., Nishimura, Y., Nishiuma, T., Maeda, H., & Yokoyama, M. (2000). Tumor necrosis factor-alpha augments contraction and cytosolic Ca(2+) sensitivity through phospholipase A(2) in bovine tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, *392*(3), 175-182.
- Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K., . . . McKenzie, A. N. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, *464*(7293), 1367-1370. doi:10.1038/nature08900
- Nelson, H. S. (1995). β -Adrenergic Bronchodilators. *New England Journal of Medicine*, *333*(8), 499-507. doi:10.1056/nejm199508243330807
- Nelson, H. S. (2001). Advair: combination treatment with fluticasone propionate/salmeterol in the treatment of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *107*(2), 398-416. doi:10.1067/mai.2001.112939
- Nials, A. T., Coleman, R. A., Johnson, M., Magnussen, H., Rabe, K. F., & Vardey, C. J. (1993). Effects of beta-adrenoceptor agonists in human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol*, *110*(3), 1112-1116.
- Nieminen, M. M., Kaprio, J., & Koskenvuo, M. (1991). A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest*, *100*(1), 70-75.
- Nieuwenhuis, M. A., Siedlinski, M., van den Berge, M., Granell, R., Li, X., Niens, M., . . . Koppelman, G. H. (2016). Combining genomewide association study and lung eQTL analysis provides evidence for novel genes associated with asthma. *Allergy*, *71*(12), 1712-1720. doi:10.1111/all.12990
- Noble, P. B., Pascoe, C. D., Lan, B., Ito, S., Kistemaker, L. E. M., Tatler, A. L., . . . West, A. R. (2014). Airway smooth muscle in asthma: Linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodelling. *Pulm Pharmacol Ther*, *29*(2), 96-107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.07.005>
- O'Byrne, P. M., & Inman, M. D. (2003). Airway hyperresponsiveness. *Chest*, *123*(3 Suppl), 411s-416s.
- O'Byrne, P. M., Naji, N., & Gauvreau, G. M. (2012). Severe asthma: future treatments. *Clin Exp Allergy*, *42*(5), 706-711. doi:10.1111/j.1365-2222.2012.03965.x
- Ober, C. (2016). Asthma Genetics in the Post-GWAS Era. *Annals of the American Thoracic Society*, *13*(Supplement 1), S85-S90. doi:10.1513/AnnalsATS.201507-459MG
- Ober, C., & Vercelli, D. (2011). Gene-environment interactions in human disease: nuisance or opportunity? *Trends Genet*, *27*(3), 107-115. doi:10.1016/j.tig.2010.12.004
- Oenema, T. A., Maarsingh, H., Smit, M., Groothuis, G. M., Meurs, H., & Gosens, R. (2013). Bronchoconstriction Induces TGF-beta Release and Airway Remodelling in Guinea Pig Lung Slices. *PLoS One*, *8*(6), e65580. doi:10.1371/journal.pone.0065580

- Ohta, S., Oda, N., Yokoe, T., Tanaka, A., Yamamoto, Y., Watanabe, Y., . . . Adachi, M. (2010). Effect of tiotropium bromide on airway inflammation and remodelling in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy*, *40*(8), 1266-1275. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03478.x
- Ohtomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Abe, A., Kobayashi, N., . . . Mori, A. (2010). Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th transfer model of BALB/c background. *Int Arch Allergy Immunol*, *152 Suppl 1*, 79-82. doi:10.1159/000312130
- Oliver, B. G. G., Robinson, P., Peters, M., & Black, J. (2014). Viral infections and asthma: an inflammatory interface? *European Respiratory Journal*, *44*(6), 1666-1681. doi:10.1183/09031936.00047714
- Ordonez, C. L., Khashayar, R., Wong, H. H., Ferrando, R., Wu, R., Hyde, D. M., . . . Fahy, J. V. (2001). Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*, *163*(2), 517-523. doi:10.1164/ajrccm.163.2.2004039
- Orehek, J., Nicoli, M. M., Delpierre, S., & Beaupre, A. (1981). Influence of the Previous Deep Inspiration on the Spirometric Measurement of Provoked Bronchoconstriction in Asthma. *American Review of Respiratory Disease*, *123*(3), 269-272. doi:10.1164/arrd.1981.123.3.269
- Organization, W. H. (2007). Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach.
- Ozier, A., Allard, B., Bara, I., Girodet, P. O., Trian, T., Marthan, R., & Berger, P. (2011). The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology. *J Allergy (Cairo)*, *2011*, 742710. doi:10.1155/2011/742710
- Palmans, E., Kips, J. C., & Pauwels, R. A. (2000). Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med*, *161*(2 Pt 1), 627-635. doi:10.1164/ajrccm.161.2.9902094
- Palmqvist, M., Persson, G., Lazer, L., Rosenborg, J., Larsson, P., & Lotvall, J. (1997). Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency. *Eur Respir J*, *10*(11), 2484-2489.
- Park, J. A., Kim, J. H., Bi, D., Mitchel, J. A., Qazvini, N. T., Tantisira, K., . . . Fredberg, J. J. (2015). Unjamming and cell shape in the asthmatic airway epithelium. *Nat Mater*, *14*(10), 1040-1048. doi:10.1038/nmat4357
- Pascoe, C. D., Seow, C. Y., Hackett, T. L., Pare, P. D., & Donovan, G. M. (2017). Heterogeneity of airway wall dimensions in humans: a critical determinant of lung function in asthmatics and nonasthmatics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *312*(3), L425-L431. doi:10.1152/ajplung.00421.2016
- Patel, K. R., Bai, Y., Trieu, K. G., Barrios, J., & Ai, X. (2017). Targeting acetylcholine receptor M3 prevents the progression of airway hyperreactivity in a mouse model of childhood asthma. *Faseb J*, *31*(10), 4335-4346. doi:10.1096/fj.201700186R
- Pavord, I. D., Hilvering, B., & Shrimanker, R. (2016). Emerging Biologics in Severe Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*, *36*(3), 609-623. doi:10.1016/j.iac.2016.04.001
- Payne, D. N., Rogers, A. V., Adelroth, E., Bandi, V., Guntupalli, K. K., Bush, A., & Jeffery, P. K. (2003). Early thickening of the reticular basement membrane in children with

- difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(1), 78-82. doi:10.1164/rccm.200205-414OC
- Pearce, N., Pekkanen, J., & Beasley, R. (1999). How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*, 54(3), 268-272.
- Pearlman, D. S., Chervinsky, P., LaForce, C., Seltzer, J. M., Southern, D. L., Kemp, J. P., . . . et al. (1992). A comparison of salmeterol with albuterol in the treatment of mild-to-moderate asthma. *N Engl J Med*, 327(20), 1420-1425. doi:10.1056/nejm199211123272004
- Pekkanen, J., Lampi, J., Genuneit, J., Hartikainen, A. L., & Jarvelin, M. R. (2012). Analyzing atopic and non-atopic asthma. *Eur J Epidemiol*, 27(4), 281-286. doi:10.1007/s10654-012-9649-y
- Pepe, C., Foley, S., Shannon, J., Lemiere, C., Olivenstein, R., Ernst, P., . . . Hamid, Q. (2005). Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 116(3), 544-549. doi:10.1016/j.jaci.2005.06.011
- Perez, L., Declercq, C., Iniguez, C., Aguilera, I., Badaloni, C., Ballester, F., . . . Kunzli, N. (2013). Chronic burden of near-roadway traffic pollution in 10 European cities (APHEKOM network). *Eur Respir J*, 42(3), 594-605. doi:10.1183/09031936.00031112
- Platts-Mills, T. A. (2001). The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(8 Pt 2), S1-5. doi:10.1164/ajrccm.164.supplement_1.2103024
- Pretolani, M., Dombret, M. C., Thabut, G., Knap, D., Hamidi, F., Debray, M. P., . . . Aubier, M. (2014). Reduction of airway smooth muscle mass by bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 190(12), 1452-1454. doi:10.1164/rccm.201407-1374LE
- Pride, N. B. (1992). Forced oscillation techniques for measuring mechanical properties of the respiratory system. *Thorax*, 47(4), 317-320.
- Radhakrishnan, D. K., Dell, S. D., Guttmann, A., Shariff, S. Z., Liu, K., & To, T. (2014). Trends in the age of diagnosis of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 134(5), 1057-1062.e1055. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.012
- Rebuck, A. S., Chapman, K. R., Abboud, R., Pare, P. D., Kreisman, H., Wolkove, N., & Vickerson, F. (1987). Nebulized anticholinergic and sympathomimetic treatment of asthma and chronic obstructive airways disease in the emergency room. *The American Journal of Medicine*, 82(1), 59-64. doi:[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90378-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90378-0)
- Reddel, H. K., Bateman, E. D., Becker, A., Boulet, L. P., Cruz, A. A., Drazen, J. M., . . . FitzGerald, J. M. (2015). A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*, 46(3), 622-639. doi:10.1183/13993003.00853-2015
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tscopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., . . . Kay, A. B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326(5), 298-304. doi:10.1056/nejm199201303260504
- Roche, W. R., Beasley, R., Williams, J. H., & Holgate, S. T. (1989). Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*, 1(8637), 520-524.
- Rodrigo, G. J., & Castro-Rodriguez, J. A. (2005). Anticholinergics in the treatment of children and adults with acute asthma: a systematic review with meta-analysis. *Thorax*, 60(9), 740-746. doi:10.1136/thx.2005.047803

- Roffel, A. F., Elzinga, C. R., Van Amsterdam, R. G., De Zeeuw, R. A., & Zaagsma, J. (1988). Muscarinic M2 receptors in bovine tracheal smooth muscle: discrepancies between binding and function. *Eur J Pharmacol*, *153*(1), 73-82.
- Roffel, A. F., Elzinga, C. R., & Zaagsma, J. (1990). Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol*, *3*(1), 47-51.
- Roffel, A. F., Meurs, H., Elzinga, C. R., & Zaagsma, J. (1990). Characterization of the muscarinic receptor subtype involved in phosphoinositide metabolism in bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol*, *99*(2), 293-296.
- Romagnani, S. (2004). The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*, *112*(3), 352-363. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01925.x
- Ronchetti, R., Jesenak, M., Rennerova, Z., Barreto, M., Ronchetti, F., & Villa, M. P. (2009). Relationship between atopic asthma and the population prevalence rates for asthma or atopy in children: atopic and nonatopic asthma in epidemiology. *Allergy Asthma Proc*, *30*(1), 55-63. doi:10.2500/aap.2009.30.3197
- Rosado-Pinto, J., & Morais-Almeida, M. (2004). Asthma in developing worlds. *Pediatric Pulmonology*, *37*(S26), 66-68. doi:10.1002/ppul.70055
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356-363. doi:10.1038/nature08144
- Ryan, G., Dolovich, M. B., Roberts, R. S., Frith, P. A., Juniper, E. F., Hargreave, F. E., & Newhouse, M. T. (1981). Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *Am Rev Respir Dis*, *123*(2), 195-199. doi:10.1164/arrd.1981.123.2.195
- Schedel, M., Michel, S., Gaertner, V. D., Toncheva, A. A., Depner, M., Binia, A., . . . Kabesch, M. (2015). Polymorphisms related to ORMDL3 are associated with asthma susceptibility, alterations in transcriptional regulation of ORMDL3, and changes in TH2 cytokine levels. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(4), 893-903.e814. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.014>
- Scichilone, N., Callari, A., Augugliaro, G., Marchese, M., Togias, A., & Bellia, V. (2011). The impact of age on prevalence of positive skin prick tests and specific IgE tests. *Respir Med*, *105*(5), 651-658. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.12.014>
- Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., . . . Martin, J. G. (2008). Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest*, *133*(2), 420-426. doi:10.1378/chest.07-1881
- Shen, H. H., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., Crosby, J. R., Hines, E. M., Borchers, M. T., . . . Lee, J. J. (2003). A Causative Relationship Exists Between Eosinophils and the Development of Allergic Pulmonary Pathologies in the Mouse. *The Journal of Immunology*, *170*(6), 3296-3305. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3296
- Shockley, M. S., Tolbert, L. M., Tobin, A. B., Nahorski, S. R., Sadee, W., & Lameh, J. (1999). Differential regulation of muscarinic M1 and M3 receptors by a putative phosphorylation domain. *Eur J Pharmacol*, *377*(1), 137-146.

- Shore, S., Irvin, C. G., Shenkier, T., & Martin, J. G. (1983). Mechanisms of histamine-induced contraction of canine airway smooth muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 55(1 Pt 1), 22-26. doi:10.1152/jappl.1983.55.1.22
- Sistek, D., Wickens, K., Amstrong, R., D'Souza, W., Town, I., & Crane, J. (2006). Predictive value of respiratory symptoms and bronchial hyperresponsiveness to diagnose asthma in New Zealand. *Respir Med*, 100(12), 2107-2111. doi:10.1016/j.rmed.2006.03.028
- Snetkov, V. A., Hapgood, K. J., McVicker, C. G., Lee, T. H., & Ward, J. P. T. (2001). Mechanisms of leukotriene D(4)-induced constriction in human small bronchioles. *Br J Pharmacol*, 133(2), 243-252. doi:10.1038/sj.bjp.0704076
- Soja, J., Grzanka, P., Sladek, K., Okon, K., Cmiel, A., Mikos, M., . . . Szczeklik, A. (2009). The use of endobronchial ultrasonography in assessment of bronchial wall remodeling in patients with asthma. *Chest*, 136(3), 797-804. doi:10.1378/chest.08-2759
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., . . . Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*, 13(2), 145-149. doi:10.1038/nri3365
- Stocks, J., Godfrey, S., Beardsmore, C., Bar-Yishay, E., & Castile, R. (2001). Plethysmographic measurements of lung volume and airway resistance. *European Respiratory Journal*, 17(2), 302-312.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*, 299(6710), 1259-1260.
- Strunk, R. C., & Bloomberg, G. R. (2006). Omalizumab for Asthma. *New England Journal of Medicine*, 354(25), 2689-2695. doi:10.1056/NEJMc055184
- Suissa, S., & Ernst, P. (2001). Inhaled corticosteroids: impact on asthma morbidity and mortality. *J Allergy Clin Immunol*, 107(6), 937-944. doi:10.1067/mai.2001.115653
- Svenningsen, S., Guo, F., Kirby, M., Choy, S., Wheatley, A., McCormack, D. G., & Parraga, G. (2014). Pulmonary functional magnetic resonance imaging: asthma temporal-spatial maps. *Acad Radiol*, 21(11), 1402-1410. doi:10.1016/j.acra.2014.08.002
- Swartz, M. A., Tschumperlin, D. J., Kamm, R. D., & Drazen, J. M. (2001). Mechanical stress is communicated between different cell types to elicit matrix remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11), 6180-6185. doi:10.1073/pnas.111133298
- Sykes, D. A., & Charlton, S. J. (2012). Slow receptor dissociation is not a key factor in the duration of action of inhaled long-acting $\beta(2)$ -adrenoceptor agonists. *Br J Pharmacol*, 165(8), 2672-2683. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01639.x
- Szefer, S. J. (1991). Glucocorticoid therapy for asthma: Clinical pharmacology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(2), 147-165. doi:[https://doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90323-G](https://doi.org/10.1016/0091-6749(91)90323-G)
- Tanaka, H., Yamada, G., Saikai, T., Hashimoto, M., Tanaka, S., Suzuki, K., . . . Abe, S. (2003). Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med*, 168(12), 1495-1499. doi:10.1164/rccm.200306-727OC
- Tang, D. D. (2015). Critical role of actin-associated proteins in smooth muscle contraction, cell proliferation, airway hyperresponsiveness and airway remodeling. *Respir Res*, 16. doi:10.1186/s12931-015-0296-1

- Tarasidis, G. S., & Wilson, K. F. (2015). Diagnosis of asthma: clinical assessment. *Int Forum Allergy Rhinol*, 5 Suppl 1, S23-26. doi:10.1002/alr.21518
- Tarlo, S. M., & Lemiere, C. (2014). Occupational Asthma. *New England Journal of Medicine*, 370(7), 640-649. doi:10.1056/NEJMra1301758
- Tatler, A. L., John, A. E., Jolly, L., Habgood, A., Porte, J., Brightling, C., . . . Jenkins, G. (2011). Integrin alphavbeta5-mediated TGF-beta activation by airway smooth muscle cells in asthma. *J Immunol*, 187(11), 6094-6107. doi:10.4049/jimmunol.1003507
- Tgavalekos, N. T., Musch, G., Harris, R. S., Vidal Melo, M. F., Winkler, T., Schroeder, T., . . . Venegas, J. G. (2007). Relationship between airway narrowing, patchy ventilation and lung mechanics in asthmatics. *Eur Respir J*, 29(6), 1174-1181. doi:10.1183/09031936.00113606
- Townley, R. G. (1996). Beta-Adrenergic Receptors and Mechanisms in Asthma: The New Long-Acting Beta-Agonists. *Allergology International*, 45(1), 13-22. doi:<https://doi.org/10.2332/allergolint.45.13>
- Trautmann, A., Kruger, K., Akdis, M., Muller-Wening, D., Akkaya, A., Brocker, E. B., . . . Akdis, C. A. (2005). Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 138(2), 142-150. doi:10.1159/000088436
- Trejo Bittar, H. E., Yousem, S. A., & Wenzel, S. E. (2015). Pathobiology of severe asthma. *Annu Rev Pathol*, 10, 511-545. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040343
- Tschumperlin, D. J., & Drazen, J. M. (2001). Mechanical stimuli to airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(10 Pt 2), S90-94. doi:10.1164/ajrccm.164.supplement_2.2106060
- Tschumperlin, D. J., Shively, J. D., Swartz, M. A., Silverman, E. S., Haley, K. J., Raab, G., & Drazen, J. M. (2002). Bronchial epithelial compression regulates MAP kinase signaling and HB-EGF-like growth factor expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282(5), L904-911. doi:10.1152/ajplung.00270.2001
- Tzeng, Y. S., Lutchen, K., & Albert, M. (2009). The difference in ventilation heterogeneity between asthmatic and healthy subjects quantified using hyperpolarized ³He MRI. *J Appl Physiol*, 106(3), 813-822. doi:01133.2007 [pii] 10.1152/jappphysiol.01133.2007
- van der Velden, V. H. J. (1998). Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators of Inflammation*, 7(4), 229-237. doi:10.1080/09629359890910
- van Grunsven, P. M., van Schayck, C. P., Molema, J., Akkermans, R. P., & van Weel, C. (1999). Effect of inhaled corticosteroids on bronchial responsiveness in patients with "corticosteroid naive" mild asthma: a meta-analysis. *Thorax*, 54(4), 316-322.
- van Helden, M. J., & Lambrecht, B. N. (2013). Dendritic cells in asthma. *Current Opinion in Immunology*, 25(6), 745-754. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.10.002>
- van Rijt, L. S., & Lambrecht, B. N. (2005). Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy*, 35(9), 1125-1134. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02321.x
- Venegas, J. G., Winkler, T., Musch, G., Vidal Melo, M. F., Layfield, D., Tgavalekos, N., . . . Harris, R. S. (2005). Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts. *Nature*, 434(7034), 777-782. doi:10.1038/nature03490

- Violin, J. D., Crombie, A. L., Soergel, D. G., & Lark, M. W. (2014). Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci*, 35(7), 308-316. doi:10.1016/j.tips.2014.04.007
- Violin, J. D., Soergel, D. G., Boerrigter, G., Burnett, J. C., Jr., & Lark, M. W. (2013). GPCR biased ligands as novel heart failure therapeutics. *Trends Cardiovasc Med*, 23(7), 242-249. doi:10.1016/j.tcm.2013.01.002
- von Mutius, E., Nicolai, T., & Martinez, F. D. (1993). Prematurity as a risk factor for asthma in preadolescent children. *J Pediatr*, 123(2), 223-229.
- Voraphani, N., Gladwin, M. T., Contreras, A. U., Kaminski, N., Tedrow, J. R., Milosevic, J., . . . Wenzel, S. E. (2014). An airway epithelial iNOS-DUOX2-thyroid peroxidase metabolome drives Th1/Th2 nitrative stress in human severe asthma. *Mucosal Immunol*, 7(5), 1175-1185. doi:10.1038/mi.2014.6
- Wagers, S., Lundblad, L. K., Ekman, M., Irvin, C. G., & Bates, J. H. (2004). The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? *J Appl Physiol*, 96(6), 2019-2027.
- Wagner, E. M., & Mitzner, W. (1996). Effects of bronchial vascular engorgement on airway dimensions. *J Appl Physiol* (1985), 81(1), 293-301. doi:10.1152/jappl.1996.81.1.293
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Cannell, M. B., . . . Robinson, C. (2000). Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy*, 30(5), 685-698.
- Ward, C., Pais, M., Bish, R., Reid, D., Feltis, B., Johns, D., & Walters, E. H. (2002). Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax*, 57(4), 309-316.
- Wechsler, M. E., Laviolette, M., Rubin, A. S., Fiterman, J., Lapa e Silva, J. R., Shah, P. L., . . . Castro, M. (2013). Bronchial thermoplasty: Long-term safety and effectiveness in patients with severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 132(6), 1295-1302. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.009
- Weinberger, S. E., Cockrill, B. A., & Mandel, J. (2014). *Principles of pulmonary medicine*. In. Retrieved from Accès via ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/science/book/9781455725328>
<http://ariane.ulaval.ca/cgi-bin/recherche.cgi?qu=a2251496>
- Weiss, K. B., & Sullivan, S. D. (2001). The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. *J Allergy Clin Immunol*, 107(1), 3-8. doi:10.1067/mai.2001.112262
- Wenzel, S. E. (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*, 368(9537), 804-813. doi:10.1016/s0140-6736(06)69290-8
- Wenzel, S. E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*, 18(5), 716-725. doi:10.1038/nm.2678
- Westergren-Thorsson, G., Chakir, J., Lafreniere-Allard, M. J., Boulet, L. P., & Tremblay, G. M. (2002). Correlation between airway responsiveness and proteoglycan production by bronchial fibroblasts from normal and asthmatic subjects. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(10), 1256-1267.

- Whicker, S. D., Armour, C. L., & Black, J. L. (1988). Responsiveness of bronchial smooth muscle from asthmatic patients to relaxant and contractile agonists. *Pulm Pharmacol*, 1(1), 25-31.
- Willets, J. M., Challiss, R. A., Kelly, E., & Nahorski, S. R. (2001). G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*, 60(2), 321-330.
- Willets, J. M., Challiss, R. A., & Nahorski, S. R. (2002). Endogenous G protein-coupled receptor kinase 6 Regulates M3 muscarinic acetylcholine receptor phosphorylation and desensitization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277(18), 15523-15529. doi:10.1074/jbc.M111217200
- Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*, 17, 255-281. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.255
- Wilson, J. W., & Li, X. (1997). The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*, 27(4), 363-371.
- Witt-Enderby, P. A., Yamamura, H. I., Halonen, M., Lai, J., Palmer, J. D., & Bloom, J. W. (1995). Regulation of airway muscarinic cholinergic receptor subtypes by chronic anticholinergic treatment. *Mol Pharmacol*, 47(3), 485-490.
- Woodruff, P. G., Dolganov, G. M., Ferrando, R. E., Donnelly, S., Hays, S. R., Solberg, O. D., . . . Fahy, J. V. (2004). Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(9), 1001-1006. doi:10.1164/rccm.200311-1529OC
- Woolcock, A. J., Rebuck, A. S., Cade, J. F., & Read, J. (1971). Lung Volume Changes in Asthma Measured Concurrently by Two Methods. *American Review of Respiratory Disease*, 104(5), 703-709. doi:10.1164/arrd.1971.104.5.703
- Wu, L. C., & Zarrin, A. A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol*, 14(4), 247-259. doi:10.1038/nri3632
- Yang, J., Logsdon, C. D., Johansen, T. E., & Williams, J. A. (1993). Human m3 muscarinic acetylcholine receptor carboxyl-terminal threonine residues are required for agonist-induced receptor down-regulation. *Mol Pharmacol*, 44(6), 1158-1164.
- Zafari, Z., Sadatsafavi, M., Marra, C. A., Chen, W., & FitzGerald, J. M. (2016). Cost-Effectiveness of Bronchial Thermoplasty, Omalizumab, and Standard Therapy for Moderate-to-Severe Allergic Asthma. *PLoS One*, 11(1). doi:10.1371/journal.pone.0146003
- Zhang, W., Du, L., & Gunst, S. J. (2010). The effects of the small GTPase RhoA on the muscarinic contraction of airway smooth muscle result from its role in regulating actin polymerization. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(2), C298-306. doi:10.1152/ajpcell.00118.2010