



Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme : une étude translationnelle

Thèse

Morgan Gazzola

Doctorat en médecine expérimentale
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme : Une étude translationnelle

Thèse

Morgan Gazzola

Sous la direction de :

Dr Ynuk Bossé, directeur de recherche

Résumé

L'asthme est un désordre respiratoire obstructif qui affecte plus de 330 millions de personnes à travers le monde. Les symptômes de cette pathologie comprennent de l'essoufflement, de l'oppression thoracique, de la sibilance et de la toux, et surviennent suivant l'inhalation de facteurs déclencheurs (virus, allergène, pollution...). La pathologie de l'asthme est caractérisée par une inflammation chronique et variable au sein du système respiratoire, un remodelage des voies aériennes ainsi qu'une hyperréactivité bronchique. L'équipe de recherche du Dr Ynuk Bossé travaille sur la physiologie du muscle lisse des voies aériennes, et plus spécifiquement sur l'augmentation des capacités contractiles du muscle lisse en réponse à un tonus (i.e. contraction soutenue). Ce phénomène nommé le gain de force du muscle lisse a été observé avant mon arrivée dans ce laboratoire sur des trachées de moutons et de souris montées en bain d'organe, ainsi qu'*in vivo* chez la souris. Des travaux antérieurs ont démontré que la présence d'un tonus augmentait la réactivité bronchique de souris en réponse à l'inhalation d'une forte dose de métacholine. Le but de cette thèse était d'explorer dans une dynamique translationnelle, les rouages moléculaires de ce phénomène et d'en définir les impacts sur la fonction respiratoire *in vivo*.

Dans une première étude réalisée au début de mon doctorat, nous avons étudié les conséquences du tonus sur la réactivité bronchique *in vivo* chez l'humain. Nous avons ainsi observé que l'augmentation du tonus, provoquée par l'inhalation répétée de faibles doses de métacholine durant une période de 30 minutes, augmentait la réactivité bronchique en réponse à l'inhalation d'une forte dose de métacholine. De plus, nous avons également observé grâce à l'utilisation de la technique des oscillations forcées que cette augmentation de la réactivité bronchique était liée à une augmentation de la résistance des voies périphériques. Nous avons donc confirmé dans cette étude que **la présence d'un tonus augmente la réactivité bronchique chez de jeunes humains en santé.**

Dans une seconde étude, conduite tout au long de mon doctorat, nous avons étudié les mécanismes moléculaires responsables du gain de force du muscle lisse en réponse à un tonus. Nous avons ainsi observé que ce phénomène n'était pas lié à une potentialisation de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine, mais plutôt provoqué par une augmentation de la filamentogénèse d'actine. Nous avons également déterminé que cette augmentation de la filamentogénèse d'actine était en partie provoquée par une inhibition de la dépolymérisation des filaments d'actine suite à l'inhibition de la protéine cofiline. Nous

avons donc démontré que **le tonus augmente la filamentogénèse d'actine au sein des cellules musculaires lisses, ce qui pourrait contribuer à une augmentation des capacités contractiles.**

Finalement, dans une troisième étude entreprise durant la dernière partie de mon doctorat, nous tentons de comprendre les liens entre le phénomène du gain de force du muscle lisse et l'inflammation présente dans l'asthme. Il semblerait que la présence d'une inflammation provoquée par de la poudre d'acariens chez la souris augmente la réactivité bronchique, mais empêche le développement du gain de force du muscle lisse. En revanche, les résultats obtenus sont encore préliminaires. Il est actuellement impossible de tirer des conclusions fermes. Ainsi, nous nous interrogeons toujours à l'égard du **rôle de l'inflammation sur le gain de force du muscle lisse des voies aériennes.**

Dans sa globalité, cette thèse démontre que le gain de force du muscle lisse des voies aériennes est provoqué par un remodelage du cytosquelette d'actine, et que ce phénomène augmente la réactivité bronchique *in vivo* chez l'humain. De plus, cette thèse ouvre des voies de recherche afin de déterminer si ce phénomène pourrait être impliqué dans l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme.

Abstract

Asthma is an obstructive respiratory disorder affecting more than 330 million people worldwide. The symptoms include breathlessness, chest oppression, wheezing and cough. The symptoms are variable in nature and severity and generally coincide with the inhalation of environmental factors (viruses, allergens, pollution...). The pathology of asthma is characterized by several typical features, such as airway inflammation, airway remodeling and airway hyperresponsiveness. The research team of Dr Ynuk Bossé is specialized in the study of lung physiology and airway smooth muscle mechanics. Of particular interest is a phenomenon called 'force adaptation'. Force adaptation is a time-dependent gain in the contractile capacity of airway smooth muscle in response to tone (i.e., a sustained contraction). This phenomenon was observed *in vitro* in isolated ovine and murine tissues, as well as *in vivo* in mice. Previous work has demonstrated that the presence of tone, provoked by repeated exposures to low doses of methacholine during 20 min, increases airway responsiveness to the inhalation of a high dose of methacholine. The aim of this thesis was to decipher the molecular mechanisms of force adaptation *in vitro* and to explore the impact of this phenomenon on respiratory function *in vivo*.

In a first study, which was conducted at the beginning of my PhD, we assessed the effect of tone on airway responsiveness in young healthy adults. We demonstrated that tone, which was generated by repeated inhalations of low doses of methacholine during 30 min, enhances airway responsiveness to a high dose of methacholine. Moreover, with the use of the force oscillation technique, we demonstrated that this effect was predominant in the peripheral airways. Therefore, this study confirmed that **airway smooth muscle tone increases airway responsiveness in young healthy adults.**

In a second study, conducted over the entire course of my PhD, we investigated the molecular mechanisms responsible for the gain in contractile capacity induced by tone. We observed that force adaptation does not rely on molecular mechanisms enhancing the phosphorylation of the myosin light chain but rather occurs in conjunction with an increase in actin filamentogenesis. We further demonstrated that this increase in actin filamentogenesis may stem not only from actin polymerization but also from the inhibition of actin filament depolymerization via the inhibition of the protein cofilin. Therefore, the results of this study suggested that **tone increase the contractile capacity of airway smooth muscle by fostering actin filamentogenesis.**

Finally, in a third study started at the end of my PhD, we are trying to understand the links between the gain in contractile capacity induced by tone and airway inflammation in asthma. We are using a mouse model of allergic airway inflammation induced by repeated exposures to house dust mite. While allergic inflammation increases airway responsiveness, it seems to diminish the phenomenon of force adaptation. However, the results obtained so far will require further investigations. It is currently impossible to reach authoritative conclusions. We are still left wondering whether **airway inflammation alters the gain in contractile capacity induced by tone.**

Overall, this thesis is demonstrated that force adaptation increases airway responsiveness *in vivo* in human and, at the molecular level, the phenomenon seems to rely on an active remodeling of the actin cytoskeleton. Moreover, this thesis opens new research areas, which will need to be further explored in order to determine whether the gain in contractile capacity induced by tone is implicated in airway hyperresponsiveness in asthma.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XVI
AVANT-PROPOS	XX
INTRODUCTION.....	1
L'ASTHME.....	1
<i>Les mécanismes inflammatoires dans l'asthme :</i>	6
<i>Le remodelage bronchique :</i>	10
<i>L'hyperréactivité bronchique :</i>	13
LE MUSCLE LISSE DES VOIES AÉRIENNES.....	19
<i>Les voies d'activation de la contraction du muscle lisse des voies aériennes</i>	22
<i>La relaxation du muscle lisse des voies aériennes</i>	28
<i>La modulation de la contraction</i>	33
LA MESURE DE LA FONCTION RESPIRATOIRE	37
<i>Mesure de la résistance des voies aériennes par pléthysmographie</i>	39
<i>Mesure de la résistance par la technique des oscillations forcées</i>	42
<i>La mesure de la fonction respiratoire dans les modèles animaux</i>	46
CHAPITRE I : PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	49
1.1 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS RELATIFS AU CHAPITRE II : « AIRWAY SMOOTH MUSCLE TONE INCREASES AIRWAY RESPONSIVENESS IN YOUNG HEALTHY ADULTS »	49
1.2 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS RELATIFS AU CHAPITRE III : « AIRWAY SMOOTH MUSCLE TONE INCREASES ACTIN FILAMENTOGENESIS AND CONTRACTILE CAPACITY »	50
1.3 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS RELATIFS AU CHAPITRE IV : « THE ROLE OF INFLAMMATION IN FORCE ADAPTATION IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA »	51
CHAPITRE II : AIRWAY SMOOTH MUSCLE TONE INCREASES AIRWAY RESPONSIVENESS IN YOUNG HEALTHY ADULTS	52
2.1 RÉSUMÉ.....	53
2.2 ABSTRACT	54
2.3 INTRODUCTION.....	55
2.4 METHODS	56
2.4.1 <i>In vivo study with human subjects</i>	56
2.4.2 <i>In vitro study with human bronchi</i>	57
2.4.3 <i>Data analysis</i>	58
2.5 RESULTS.....	58
2.5.1 <i>In vivo study with human subjects</i>	58
2.5.2 <i>Effect of induced tone on airway responsiveness</i>	59
2.5.3 <i>Effect of induced tone on the response to deep inspiration (DI)</i>	59
2.5.4 <i>In vitro study with human bronchi</i>	60
2.6 DISCUSSION	60

2.6.1	<i>Contractile mechanisms</i>	61
2.6.2	<i>Non-contractile mechanisms</i>	64
2.6.3	<i>Clinical implication</i>	65
2.7	CONCLUSION	66
2.8	ACKNOWLEDGEMENTS	66
2.9	TABLES	67
2.10	FIGURES	73
CHAPITRE III : AIRWAY SMOOTH MUSCLE TONE INCREASES ACTIN FILAMENTOGENESIS AND CONTRACTILE CAPACITY		80
3.1	RÉSUMÉ	81
3.2	ABSTRACT	82
3.3	INTRODUCTION	83
3.4	MATERIALS AND METHODS	84
3.4.1	<i>Mouse tracheas</i>	84
3.4.2	<i>Force measurements</i>	84
3.4.3	<i>Cell culture</i>	85
3.4.4	<i>Traction force microscopy</i>	86
3.4.5	<i>MLC and cofilin phosphorylation</i>	86
3.4.6	<i>Immunofluorescence</i>	87
3.4.7	<i>Statistical Analysis</i>	87
3.5	RESULTS	87
3.5.1	<i>Force adaptation in isolated mouse tracheas</i>	87
3.5.2	<i>Force adaptation with cultured HASMC</i>	88
3.5.3	<i>ROCK and PKC in force adaptation</i>	88
3.5.4	<i>MLC phosphorylation in force adaptation</i>	89
3.5.5	<i>Actin filamentogenesis in force adaptation</i>	89
3.5.6	<i>Actin polymerization in force adaptation</i>	89
3.5.7	<i>Tone and cofilin activation</i>	90
3.6	DISCUSSION	90
3.7	CONCLUSION	94
3.8	FIGURES	95
CHAPITRE IV : THE EFFECT OF INFLAMMATION ON 'FORCE ADAPTATION' IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA		103
4.1	RÉSUMÉ	104
4.2	ABSTRACT	105
4.3	INTRODUCTION	106
4.4	MATERIALS AND METHODS	107
4.4.1	<i>Murine model of asthma</i>	107
4.4.2	<i>Airway responsiveness</i>	107
4.4.3	<i>Airway Inflammation</i>	108
4.4.4	<i>Statistical analysis</i>	109
4.5	RESULTS	109
4.5.1	<i>Changes in respiratory system resistance and tissue damping</i>	109
4.5.2	<i>Changes in respiratory system elastance and tissue elastance</i>	110
4.5.3	<i>Changes in Newtonian resistance</i>	110
4.5.4	<i>HDM sensitization in lung Inflammation</i>	110
4.6	DISCUSSION	111
4.7	CONCLUSION	114
4.8	FIGURES	115
DISCUSSION GÉNÉRALE		121

LE GAIN DE FORCE DU MUSCLE LISSE DES VOIES AÉRIENNES : DE L' <i>IN VITRO</i> À L' <i>IN VIVO</i>	121
LE GAIN DE FORCE DU MUSCLE LISSE DES VOIES AÉRIENNES : UN CYTOSQUELETTE PLASTIQUE	126
LE GAIN DE FORCE DU MUSCLE LISSE DES VOIES AÉRIENNES : UN LIEN DANS L'ASTHME ?.....	131
CONCLUSION	135
RÉFÉRENCES	136
ANNEXES	166
THE UNDERLYING PHYSIOLOGICAL MECHANISMS WHEREBY ANTI CHOLINERGICS ALLEVIATE ASTHMA	166
SMOOTH MUSCLE IN HUMAN BRONCHI IS DISPOSED TO RESIST AIRWAY DISTENSION	181
LES MOLÉCULES EXTRACELLULAIRES QUI RÉGULENT LA CONTRACTILITÉ DES VOIES RESPIRATOIRES	202

Liste des Tableaux

TABLE 2.1: INDIVIDUAL AND MEAN CHARACTERISTICS OF THE SUBJECTS.	67
TABLE 2.2: MEAN SPIROMETRIC AND OSCILLOMETRIC INDICES AT BASELINE BEFORE THE PROTOCOLS....	69
TABLE 2.3: THE DOSES OF METHACHOLINE USED IN THIS STUDY.	70
TABLE 2.4: TIDAL BREATHING PATTERN PRE- AND POST-DEEP INSPIRATION (DI).....	71
TABLE 2.5: CHARACTERISTICS OF THE DEEP INSPIRATION (DI)	72

Liste des figures

Introduction

FIGURE 1.1: ÉVOLUTION DE LA PRÉVALENCE DE L'ASTHME EN FONCTION DU PRODUIT INTÉRIEUR BRUT (PIB).....	1
FIGURE 1.2 : LES DIFFÉRENTES CELLULES INFLAMMATOIRES IMPLIQUÉES DANS L'ASTHME	7
FIGURE 1.3 : LE REMODELAGE BRONCHIQUE DANS L'ASTHME	12
FIGURE 1.4 : L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE DANS L'ASTHME	14
FIGURE 1.5 : LES DIFFÉRENTES CAUSES DE L'HYPERRÉACTIVITÉ DANS L'ASTHME	18
FIGURE 1.6 : LE MUSCLE LISSE DES VOIES AÉRIENNES	20
FIGURE 1.7: LES VOIES INTRACELLULAIRES QUI GOUVERNENT LA CONTRACTILITÉ DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	26
FIGURE 1.8 : VOIES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRES QUI GOUVERNENT LA RELAXATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES PAR LA PKA.....	29
FIGURE 1.9 : ILLUSTRATION DES DIFFÉRENTS TYPES DE FLUX GAZEUX À TRAVERS UN TUBE RIGIDE.....	39
FIGURE 1.10 : L'IMPÉDANCE DU SYSTÈME RESPIRATOIRE	44

Chapitre II

FIGURE 2.1. SCHEMATIC DEPICTING THE PROTOCOLS USED TO TEST THE EFFECT OF TONE ON IN VIVO AIRWAY RESPONSIVENESS IN HUMANS..	73
FIGURE 2.2. REPRESENTATIVE TRACES OF VOLUME (IN GRAY) AND OF AN OSCILLOMETRIC INDICE (IN BLACK; RRS ₅ IN THIS CASE) OVER TIME.....	74
FIGURE 2.3. TONE POTENTIATES THE EFFECT OF METHACHOLINE ON SEVERAL OSCILLOMETRIC INDICES OF RESPIRATORY MECHANICS	75
FIGURE 2.4. THE CHARACTERISTICS OF THE DEEP INSPIRATION (DI) ARE COMPARED BETWEEN PROTOCOLS	76
FIGURE 2.5. THE KINETICS OF CHANGES POST-DI IS COMPARED BETWEEN PROTOCOL 1 (WITHOUT TONE; EMPTY CIRCLES) AND PROTOCOL 2 (WITH TONE; FULL SQUARES) FOR EACH OSCILLOMETRIC INDICE	77
FIGURE 2.6. THE DILATOR EFFECT OF DI AS WELL AS THE ENSUING EXTENT AND RATE OF RENARROWING ARE COMPARED BETWEEN PROTOCOL 1 (WITHOUT TONE; EMPTY CIRCLES) AND PROTOCOL 2 (WITH TONE; FULL SQUARES)	78
FIGURE 2.7. TONE INCREASES THE CONTRACTILE CAPACITY OF HUMAN BRONCHI	79

Chapitre III

FIGURE 3.1. FORCE ADAPTATION IN ORGAN BATHS	95
FIGURE 3.2. FORCE ADAPTATION IN CULTURED CELLS	97
FIGURE 3.3. RHO-ASSOCIATED COILED-COIL CONTAINING PROTEIN KINASE (ROCK) AND PROTEIN KINASE C (PKC) IN FORCE ADAPTATION.....	98
FIGURE 3.4. MYOSIN LIGHT CHAIN PHOSPHORYLATION (P-MLC ₂₀) IN FORCE ADAPTATION	99

FIGURE 3.5. ACTIN FILAMENTOGENESIS IN FORCE ADAPTATION	100
FIGURE 3.6. ACTIN POLYMERIZATION IN FORCE ADAPTATION.....	101
FIGURE 3.7. PREVENTING THE RE-ACTIVATION OF THE ACTIN-SEVERING PROTEIN COFILIN IN FORCE ADAPTATION	102

Chapitre IV

FIGURE 4.1. PROTOCOLS USED TO MEASURE FORCE ADAPTATION IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA	115
FIGURE 4.2. MAXIMAL RESPIRATORY SYSTEM RESISTANCE (RRS) AND TISSUE DAMPING (G) MEASURED IN RESPONSE TO THE FINAL LARGE DOSE OF MCH	117
FIGURE 4.3. MAXIMAL RESPIRATORY SYSTEM ELASTANCE (ERS) AND TISSUE ELASTANCE (H) MEASURED IN RESPONSE TO THE FINAL LARGE DOSE OF MCH	118
FIGURE 4.4. MAXIMAL NEWTONIAN RESISTANCE (RN) MEASURED IN RESPONSE TO THE FINAL LARGE DOSE OF MCH	119
FIGURE 4.5. INFLAMMATORY CELLS IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGES OF MICE TREATED WITH SALINE AND HDM	120

Liste des abréviations

11 β -HSD	Corticostéroïdes 11 beta-déshydrogénase
α -sma	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
AC	Adénylate cyclase
ADF	<i>Actin depolymerizing factor</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AHR	<i>Airway hyperresponsiveness</i>
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARN	Acide ribonucléique
Arp2/3	<i>Actin related protein 2/3</i>
ASM	<i>Airway smooth muscle</i>
ATP	Adénosine triphosphate
ATS	<i>American thoracic society</i>
BAL	<i>Bronchoalveolar lavage</i>
BIM-X	Bisindolymaleimide X
BMI	<i>Body mass index</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Ca.CaM	Complexe Calcium-Calmoduline
Ca ²⁺	Ion calcium
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC-42	<i>Cell division control protein 42</i>
CICR	<i>Calcium induce calcium release</i>
CIHR	<i>Canadian institute of health research</i>
CO	<i>Carbon monoxyde</i>
CPI-17	<i>C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor</i>
CSI	Corticostéroïdes inhalés
CVF	Capacité vitale fonctionnelle
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DAG	Diacylglycérol
DI	<i>Deep inspiration</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle media</i>
DOI	<i>Digital object identifier</i>
DTT	Dithiothréitol
EC30	<i>Effective concentration of 30%</i>
EF50	<i>Expiratory flow at 50%</i>
ERS	<i>European respiratory society</i>
Ers	<i>Elastance of respiratory system</i>

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>Fœtal bovine serum</i>
FEV1	<i>Forced expiratory volume in 1 second</i>
FOT	<i>Forced oscillation technique</i>
FRC	<i>Functional residual capacity</i>
FRQS	Fond de recherche du québec en santé
G	<i>Tissue damping - Amortissement tissulaire</i>
GAP	GTPase-activating protein
Gaw	<i>Airway conductance</i>
GC	Guanylyl cyclase
GINA	<i>Global initiative for Asthma</i>
GIT	<i>GPCR-interacting protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GRK	<i>G protein coupled receptor kinase</i>
GSDMB	<i>Gasdermin-B</i>
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Guanosine triphosphatase
GWAS	<i>Genome wide association study</i>
H	<i>Tissue elastance - elastance tissulaire</i>
HASMC	<i>Human airway smooth muscle cells</i>
HDM	<i>House dust mite</i>
HSP20	<i>Heat shock protein 20</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IC	<i>Inspiratory capacity</i>
IFN γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC2	<i>Type 2 innate lymphoid cells</i>
IP3	<i>Inositol-3-phosphate</i>
IP3R	<i>Inositol-3-phosphate receptor</i>
IQGAP1	<i>GTPase-activating protein</i>
ITS	<i>IQ motif containing GTPase activating protein</i>
IUCPQ	Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
JAK1	Janus kinase 1
LPS	Lipopolysaccharide
LTC $_4$	Leucotriène C4
LTD $_4$	Leucotriène D4
LVGC	<i>L-type voltage gated channel</i>
M3	Récepteur muscarinique de type 3

MBP	<i>Major basic protein</i>
MCh	<i>Métacholine</i>
MLC20	<i>Myosin light chain of 20 Kda</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MPOC	<i>Maladie pulmonaire obstructive chronique</i>
MYPT1	<i>Myosin phosphatase target subunit 1</i>
N-WASP	<i>Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
NMII	<i>Non-muscle myosine II</i>
NO	<i>Nitric oxyde</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAK	<i>P-21 activated kinase</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC20	<i>provocative concentration causing a 20% drop in FEV1</i>
PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
Pfn-1	<i>Profilin-1</i>
PGD ₂	<i>Prostaglandine D2</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandine E2</i>
PhD	<i>Philosophiae Doctor</i>
PI3Ky	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIB	<i>Produit interieur brut</i>
PIP2	<i>Phosphoinositol-2-phosphate</i>
PIX	<i>PAK-interacting exchange factor</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2 A</i>
PP2B	<i>Protein phosphatase 2 B</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
Raw	<i>Résistance des voies aériennes</i>
RCPG	<i>Récepteur couplé aux protéines G</i>
Rn	<i>Résistance Newtonienne</i>
ROCK	<i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase</i>
Rrs	<i>Résistance du système respiratoire</i>
RV	<i>Residual volume</i>
SABA	<i>Short acting beta-2 agonist</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

SE	<i>Standard error</i>
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STIM	<i>Stromal interacting molecules</i>
TAS2R	<i>Taste receptor protein 2</i>
TBS	<i>Tris-buffer saline</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T helper cell</i>
TIMPS	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLC	<i>Total lung capacity</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRITC	<i>Tetramethylrodamine</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
Tyk2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEMS	<i>Volume expiratoire maximal en 1 seconde</i>
VGT	<i>Volume de gaz thoracique</i>
Xrs	<i>Réactance du système respiratoire</i>
Zrs	<i>Impédance du système respiratoire</i>

Remerciements

Déjà 4 ans...

28 Août 2015, aéroport de Toulouse Blagnac, j'ai 26 ans et je quitte ma terre natale. 12 heures plus tard, un peu perdu, je suis au Canada pour la toute première fois. Accueilli par Ynuk, on me donnera 30 minutes plus tard ma première bière et ma première poutine... L'aventure commence.

4 ans plus tard, j'écris une thèse, j'écris ma thèse. Qui l'eu crut ? Électron libre dans mes années lycée (secondaire), je me hisse aujourd'hui à la plus belle des places académiques.

Si j'y arrive aujourd'hui c'est grâce à tous ceux qui m'ont entouré, tous ceux qui m'ont appris, tous ceux qui m'ont aidé.

Avant de remercier tous les humains qui ont compté dans ce voyage, je tiens à remercier plus particulièrement tous les êtres vivants sacrifiés durant cette thèse, merci.

Tout d'abord, je tiens à te remercier Ynuk. Tu as été durant ces 4 années mon directeur de recherche, mon 'boss', mon professeur. Tu as cru en moi, jeune Français qui ne connaissait rien à la physiologie pulmonaire, et tu m'as donné ma chance. Ta porte était toujours ouverte lorsque j'avais une question, un résultat à te montrer ou une hypothèse à te proposer. Tu m'as toujours accordé le temps que je demandais, tu m'as appris à écrire et tu as bien amélioré mon anglais. Tu m'as également permis de voyager en me proposant chaque année de multiples congrès. Je me considère chanceux de t'avoir eu comme professeur durant ce doctorat et je t'en remercie. Je te souhaite énormément de bonheur autant dans ta future carrière de chercheur que dans ton futur rôle de père.

Je tiens ensuite à te remercier Cyndi sans qui ce voyage aurait été bien différent. Tu as toujours été là pour m'écouter et m'épauler quand je n'avais plus le moral et que je trouvais le voyage un peu trop dur. Tu étais toujours là pour me venir en aide quand j'en avais besoin, râler le dimanche soir en pensant au lundi ou partager des moments de rire devant nos bains d'organe. Tu resteras ma flexipartenaire pour la vie, et j'espère que tu amélioreras ces scores de solitaire... Je te souhaite énormément de bonheur dans tes futures années de vie avec ton petit bonhomme.

Sam, que dire de toi ! Je tiens particulièrement à te remercier, toi qui pendant deux ans était mon partenaire de lab. Je resterai à jamais impressionné par ta compréhension de la science et par ce que tu arrives à accomplir. J'ai découvert en toi bien plus qu'un collègue, mais bel et bien un ami. Tu m'as accueilli chez toi à bras ouverts et m'a permis de découvrir toutes les beautés du lac Saint-Jean. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites dans tes futures années, tu deviendras j'en suis sûr un excellent médecin.

Je tiens également à remercier Mathieu Laplante sans qui ce doctorat n'aurait jamais eu lieu. Tu m'as donné la chance d'intégrer cette équipe et de réaliser cette thèse, et je t'en suis grandement reconnaissant.

Je remercie aussi toutes les personnes de l'IUCPQ avec qui j'ai eu la chance de rire et de partager bien plus que de la science durant ces 4 années. Merci Caro, Juju, David, Émilie, Magali, Sofien, JP, Alexandra et bien d'autres.

Une thèse se fait dans un laboratoire, mais également en dehors de l'hôpital. Je tiens à remercier chaleureusement tous mes amis qui ont été là durant ce doctorat.

Loloche, Gaét et MK nous avons partagé bien plus qu'une coloc durant ces 4 années, c'était un petit bout de vie. Malgré toute cette vaisselle, je ne retiendrai que nos plus grands bonheurs. Ces chaudes soirées endiablées nous ont permis, je pense, de nous aider à surmonter les frustrations que nous apporte parfois la science. MK je te souhaite de t'épanouir avec Ricardo, profitez bien de votre tour du monde. Loloche et Gaét je vous souhaite énormément de bonheur dans vos futures vies canadiennes. Vous allez me manquer.

Merci à toi, Mathieu, le Québécois intégré parmi tous ces Français. En me proposant de multiples sorties dans les différents parcs de ce grand territoire, tu m'as fait découvrir quelques joyaux de ton pays. Comme Sam, le cœur sur la main, tu m'as accueilli à bras ouverts au sein de ta famille et je t'en remercie chaleureusement.

Un grand merci à Aurélie, Juju, les deux Romain, Alex, Max, Chloé, Mathilde, Nolwenn, vous êtes autant de personnes qui ont compté pour moi durant ce voyage. Merci à toi aurélie qui a su transformer les anniversaires en jours un peu spéciaux grâce à tes talents de pâtissière. Si loin de nos familles ces attentions sont précieuses, un grand merci. Juju et Romain merci à vous deux pour tout ce temps gâché sur les jeux vidéo. Romain oublie le

kikimeter... J'espère que Julien arrivera un jour M 120... Alex et Max faites attention, je crois que les saucisses végé ne font pas grossir les muscles...

Manu... une découverte et non des moindres. Toujours un sourire, toujours heureuse, tu m'as accompagnée durant toute l'écriture de cette thèse. Tu m'as encouragée, tu m'as soutenue, tu as cru en moi, un immense merci.

Finalement, un grand merci à ma mère qui a toujours cru en moi et qui n'a jamais douté de mes capacités. Juillet 2009 tu étais avec moi quand, m'inscrivant à la fac, je voulais déjà faire un doctorat. Comme tu le dis si bien, telle une rivière, je laisse la vie couler. Faire un enfant, planter un arbre, écrire un livre. Aujourd'hui j'écris mon livre. Soit fière d'avoir été la mère que tu as été. Merci maman, de m'avoir fait devenir ce que je suis.

Un grand merci à mon père qui m'a donné l'envie d'aller plus haut, l'envie d'aller plus loin. Nos 20 premières années de vie commune n'ont pas toujours été faciles, mais notre relation aujourd'hui n'en est que plus belle. Le rôle de père ne doit pas être aisé, surtout quand ton enfant s'appelle Morgan. Aujourd'hui tu peux être fier de toi, j'ai trouvé la place que je voulais avoir. Merci papa de m'avoir fait devenir ce que je suis.

Je terminerai avec un grand merci à mes grands-parents, parents de mes parents vous êtes l'essence de ce que je suis aujourd'hui.

La vie est un théâtre, jouons...

“Les bateaux sont en sécurité lorsqu'ils sont au port, mais ce n'est pas pour ça qu'ils ont été construits.”

Paulo Coelho

À mon grand-père

Avant-propos

Durant ce doctorat j'ai eu la chance de publier 6 articles, 2 articles scientifiques en tant que 1^{er} auteur, un article de revue en tant que 1^{er} auteur et 3 articles en collaboration. Parmi les trois chapitres de résultats que je présente dans cette thèse, le premier a été publié en 2017, le second a été soumis en mai 2019 et se trouve actuellement en révision, et le dernier est en préparation.

Le manuscrit présenté au chapitre III intitulé : '*Airway smooth muscle tone increases airway responsiveness in young healthy adults*' a été publié dans le journal *American Journal of Physiology : Lung Cellular and Molecular Physiology* le 01 mars 2017. J'en suis l'auteur principal et il est coécrit avec Katherine Lortie, Cyndi Henry, Samuel Mailhot-Larouche, David G. Chapman, Christian Couture, Chun Y. Seow, Peter D. Paré, Gregory G. King, Louis-Philippe Boulet et Ynuk Bossé. J'ai effectué l'analyse, l'interprétation des résultats, l'écriture et la révision de ce manuscrit en collaboration avec les co-auteurs. J'ai reçu une bourse du Réseau en Santé Respiratoire du Fond de Recherche du Québec en Santé durant la réalisation de ce projet. Ce projet a été réalisé grâce à un financement de Merck Sharpe & Dohme, ainsi que par un financement du Réseau en Santé Respiratoire du Fond de Recherche Québécois en Santé. Le bien être des participants a été garanti tout au long de l'étude suite à l'approbation du protocole par le Comité d'Éthique de la Recherche sur les êtres humains de l'Université Laval (CÉRUL #21001). La banque de tissu du Réseau en Santé Respiratoire a été remerciée pour nous avoir fourni des tissus humains afin de réaliser les expériences en bain d'organe. Des modifications mineures du manuscrit ont été réalisées, et la numérotation des chapitres et des figures a été adaptée. DOI : 10.1152/ajplung.00400.2016.

Le manuscrit présenté au chapitre IV intitulé : '*Airway smooth muscle tone increases actin filamentogenesis and contractile capacity*' a été soumis pour révision dans le journal *American Journal of Physiology : Lung Cellular and Molecular Physiology* le 14 mai 2019. Une évaluation par nos pairs a été réalisée, et certaines modifications sont à prévoir. J'en suis l'auteur principal et il est coécrit avec Cyndi Henry, Katherine Lortie, Fatemeh Khadangi, Chan Young Park, Jeffrey J. Fredberg et Ynuk Bossé. J'ai effectué l'ensemble des expériences, l'analyse, l'interprétation des résultats, l'écriture et la révision de ce manuscrit en collaboration avec les co-auteurs. J'ai reçu une bourse du Réseau en Santé Respiratoire et du Fond de Recherche du Québec en Santé pour l'ensemble de ma

formation de doctorat durant la réalisation de ce projet. Ce projet a été financé par le Conseil de Recherche en Science Naturelles et en Génie du Canada, la fondation de l'IUCPQ, la Fondation canadienne pour l'Innovation et les Institut de Recherche en Santé du Canada. Les expérimentations, l'hébergement et les soins des animaux ont été approuvés par le Comité de protection des animaux de l'Université Laval en concordance avec les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux (protocoles #2014-016 & #2018-005). Des modifications mineures du manuscrit ont été réalisées, et la numérotation des chapitres et des figures a été adaptée.

Le manuscrit présenté au chapitre V intitulé : '*The effect of inflammation on 'Force adaptation' in a mouse model of allergic asthma*' est toujours en cours d'écriture et sera soumis dans un journal scientifique lorsque les conditions contrôles auront été améliorées. J'en suis l'auteur principal, il est coécrit avec Cyndi Henry, Magali Boucher, Katherine Lortie, Fatemeh Khadangi, David Marsolais et Ynuke Bossé. J'ai effectué l'ensemble des expériences, l'analyse, l'interprétation des résultats et l'écriture de ce manuscrit en collaboration avec les co-auteurs. Les expérimentations, l'hébergement et les soins ont été approuvés par le comité de protection des animaux de l'Université Laval en concordance avec les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux (protocoles #2014-016 & #2018-005).

Candidats à la maîtrise : Samuel Mailhot-Larouche

Candidats au PhD : Katherine Lortie, Fatemeh Khadangi

Professionnels de recherche : Cyndi Henri, Magali Boucher

Chercheur associé à l'université Laval : David Marsolais

Pneumologue à l'IUCPQ : Louis Philippe Boulet

Pathologiste à l'IUCPQ : Christian Couture

Chercheurs associés à l'université de Sydney : Gregory G. King, David D. Chapman

Chercheurs associés à l'université de Vancouver : Chun Y. Seow, Peter D. Paré.

Chercheurs associés à l'université de Harvard : Chan Y. Park, Jeffrey J. Fredberg

Introduction

L'asthme

Le terme asthme provient du mot grec « ásthma », signifiant respiration difficile. Ce désordre respiratoire décrit pour la première fois par le Dr Henry Hyde Salter dans les années 1860, affecte aujourd'hui plus de 330 millions de personnes à travers le monde [1, 2]. On estime que 10% des adultes de la population mondiale, 8% de la population canadienne, et une proportion encore plus élevée d'enfants souffriraient d'asthme [3]. Aujourd'hui, la prévalence des personnes atteintes d'asthme est beaucoup plus importante dans les pays industrialisés que dans les pays en cours d'industrialisation ou en développement (Figure 1.1) [2]. Cette pathologie touche majoritairement les individus de sexe masculin durant l'enfance, mais cette tendance s'inverse lorsque les personnes passent à l'âge adulte [4]. Au Canada, on estime à plus de 3 millions le nombre d'individus atteints d'asthme aujourd'hui, dont 600 000 sont des enfants âgés de 12 ans ou moins [5]. Même si cette pathologie n'est que très rarement mortelle, les coûts directs qu'elle engendre incluant les coûts d'hospitalisation, de médicaments et de baisse de productivité s'élèvent à plus de 2.1 milliards de dollars par an [5]. De plus, 10% des patients asthmatiques sont réfractaires aux traitements commercialisés et demeurent toujours mal contrôlés malgré une prise bijournalière de corticostéroïdes et de bronchodilatateurs à longue durée d'action [6, 7]. Ainsi, la pathologie de l'asthme représente un fléau de santé majeur avec un impact socioéconomique important. Elle se classe parmi les maladies chroniques les plus importantes à travers le monde.

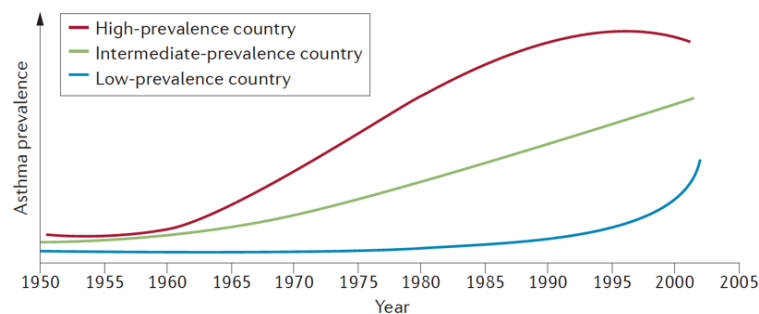


Figure 1.1: Évolution de la prévalence de l'asthme en fonction du produit intérieur brut (PIB). D'après *Bulletin of World Health Organisation*, 83, Bousquet J., Bousquet P.J., Godart P., & Dyres J-P. (2005).

L'asthme est un terme « parapluie ». C'est une pathologie complexe regroupant différents phénotypes menant à des symptômes similaires. L'ensemble de ces symptômes est provoqué par une baisse importante de la fonction respiratoire, résultant en partie d'une contraction excessive du muscle lisse des voies aériennes [2]. Malgré de nombreuses études visant à comprendre les différents facteurs de risque menant au développement de cette pathologie, les causes de l'asthme sont toujours mal comprises. Différents phénotypes et sévérités d'asthme existent, correspondant à autant de formes de cette pathologie. L'asthme allergique chez l'enfant est un asthme bien corrélé avec la présence d'allergies, des périodes de toux et d'obstructions respiratoires épisodiques. Il est souvent associé à un historique familial. Cette forme d'asthme est en fait fortement liée à une hérédité génétique [8]. L'asthme allergique est également retrouvé chez l'adulte, en grande majorité chez les femmes. L'asthme non allergique est un asthme que l'on retrouve dans différentes tranches d'âge. Cette forme d'asthme est corrélée à l'exposition à différents irritants tels que la fumée de cigarette, les polluants, les moisissures, ou encore liée à l'obésité chez l'adulte [4]. L'asthme à l'effort est un asthme provoqué par les exercices d'aérobic de forte intensité, suivant une exposition à de l'air froid ou sec, ou encore suivant l'exposition répétée au chlore présent dans l'environnement de certains athlètes [9]. Une certaine forme d'asthme non atopique peut apparaître tardivement chez des individus plus âgés. Il est associé à de rapides et importantes baisses de la fonction respiratoire, il est très souvent sous-diagnostiqué et mal compris [10]. L'asthme professionnel est causé par l'exposition répétée à un allergène ou un irritant sur le lieu de travail, et représente environ 20% des asthmes chez l'adulte [11]. Enfin, l'asthme sévère, est un asthme défini par des exacerbations graves et récurrentes, une perte importante de la fonction respiratoire lors de ces exacerbations, et une très faible réponse à la médication [12]. Ces différents phénotypes et sévérités d'asthme sont néanmoins caractérisés par trois grandes caractéristiques communes soit l'inflammation chronique des voies respiratoires, le remodelage bronchique et l'hyperréactivité bronchique.

Les différents facteurs de risque menant aux multiples phénotypes d'asthme mentionnés précédemment peuvent être séparés en deux grandes catégories : les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Depuis plusieurs années, différentes études génétiques ont été entreprises sur des cohortes comprenant des milliers de patients appelées *Genome-Wide Association Studies*, ou GWAS. Il a été estimé qu'entre 54 et 74% des asthmes retrouvés chez l'adulte et plus de 90% des asthmes retrouvés chez l'enfant seraient liés à

certaines facteurs génétiques [13, 14]. Les différentes études qui ont été mises en place cherchaient à mettre en évidence des mutations ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) présentes sur le génome de patients asthmatiques. Plus de 120 gènes de susceptibilités ont ainsi été identifiés dans les différents GWAS réalisés [15-17]. Parmi ces gènes, certains ont été identifiés à plusieurs reprises, tels que ceux codant pour les protéines ORMDL3, GSDMB, TLSP, IL-33 ou encore IL-13. Des mutations au niveau de ces gènes sembleraient alors conférer une certaine prédisposition au développement de l'asthme [13, 14, 16]. En plus des prédispositions génétiques, l'exposition à certains facteurs environnementaux comme les allergènes, les polluants ou les irritants sont nécessaires pour le développement de l'asthme chez l'enfant et chez l'adulte. Différentes études ont démontré que l'exposition répétée à des acariens, à des moisissures ou encore à des cafards menait au développement de l'asthme allergique [18]. L'induction allergénique correspond à la première rencontre avec un allergène. Cette première exposition sensibilise le système immunitaire à l'allergène en question, et va permettre une réponse exacerbée lors de rencontres futures. La mise en place de cette réponse immunitaire est souvent la cause principale de l'inflammation chronique dans les voies respiratoires de patients asthmatiques [19]. De plus, l'exposition à d'autres facteurs environnementaux tels que la fumée de cigarette ou encore la pollution contribue également au développement de l'asthme sévère. Certaines études ont démontré que les patients asthmatiques exposés à la fumée de cigarette font des exacerbations plus régulières et beaucoup plus sévères en comparaison à des patients asthmatiques non exposés [20, 21]. Finalement, différentes infections respiratoires virales et bactériennes peuvent également déclencher et/ou exacerber certaines formes d'asthme [22, 23].

Le diagnostic de cette pathologie est le plus souvent effectué en mesurant les fonctions respiratoires par spirométrie. Le ratio du volume expiratoire maximal en 1 seconde ou VEMS sur la capacité vitale forcée ou CVF est un indicateur utilisé pour quantifier l'obstruction bronchique. Généralement, un ratio inférieur à 70% est considéré comme un signe d'obstruction. Le niveau de réversibilité de l'obstruction bronchique en réponse à l'inhalation d'un bronchodilatateur, tel que le salbutamol, fait également partie des tests classiques dans le diagnostic de l'asthme. Une réversibilité de plus de 12% du ratio VEMS/CVF et 200ml du volume expiratoire correspond au diagnostic de la pathologie. Finalement, la mesure de la réactivité bronchique en réponse à l'inhalation d'un bronchoconstricteur tel que l'histamine ou la métacholine (MCh) fait également partie des tests étalons pour diagnostiquer l'asthme.

Selon les recommandations du *Global Initiative for Asthma* (GINA), une mesure de CP20 (c.-à-d. la concentration de MCh qui entraîne une diminution de 20% du VEMS) inférieure à 4mg/ml est un indicateur d'hyperréactivité bronchique. Ce dernier est un trait typique de l'asthme, et son absence exclue généralement le diagnostic de cette pathologie [24, 25].

Les traitements utilisés en clinique pour le traitement de l'asthme sont nombreux et diversifiés. Les traitements de première ligne pour les formes légères d'asthme sont les agonistes spécifiques des récepteurs β_2 adrénergiques tels que le salbutamol ou la terbutaline. Ces bronchodilatateurs à courte durée d'action, également appelés *short acting β_2 agonist* ou SABA, permettent une bronchodilatation rapide en stimulant directement la relaxation du muscle lisse des voies aériennes [26]. En plus du traitement par des bronchodilatateurs à courte durée d'action, le traitement utilisé dans les formes d'asthme un peu plus sévères inclut également la prise de corticostéroïdes inhalés (CSI) tels que la bécloéthasone, le budésonide ou encore la fluticasone. Ces traitements ont pour but principal de diminuer et de réguler le niveau d'inflammation présent au niveau des voies respiratoires [27]. Enfin, pour les formes d'asthme encore plus sévères, ces traitements sont souvent combinés avec des agonistes des récepteurs β_2 adrénergiques à longue durée d'action tel que le formotérol ou l'indacatérol [27]. Récemment, certaines molécules visant à bloquer l'activation des récepteurs cholinergiques, les anti-muscariniques tels que le tiotropium bromide, ont été approuvés par les organismes de santé publique pour le traitement de l'asthme [28]. Durant mon doctorat, nous avons réalisé une revue de littérature afin d'expliquer les mécanismes physiologiques par lesquels la prise d'anticholinergiques s'avère utile dans l'asthme (Annexe 8.1) [29]. Finalement, de nouveaux médicaments appelés « biologiques » ont récemment fait leur apparition, visant des phénotypes d'asthme sévères très spécifiques. Leurs mécanismes d'action passent par l'inhibition d'une molécule ou d'un récepteur spécifique, par exemple, le lebrikizumab cible spécifiquement l'IL-13, ou encore le benralizumab cible le récepteur de l'IL-5 présent sur les éosinophiles. La ségrégation des cytokines par ces anticorps monoclonaux ou l'inhibition des récepteurs par des antagonistes spécifiques permet d'inhiber la cascade de signalisation en aval, ou encore le recrutement des acteurs de l'immunité impliqués [30, 31]. En revanche, ces nouveaux moyens thérapeutiques ne sont efficaces que pour certaines formes très spécifiques d'asthme. Ils représentent alors des thérapies avec un potentiel intéressant dans une optique de médecine personnalisée [32]. Cependant, les bénéfices qu'ils apportent à ce jour, exprimés en matière de capacité respiratoire, restent encore

relativement faibles. Un autre désavantage de ce type de médication est leurs prix très élevés. Récemment, une nouvelle technique endobronchique a été développée dans le traitement de l'asthme sévère, la thermoplastie bronchique. Cette technique consiste à délivrer dans les voies aériennes supérieures à 3 mm de diamètre une énergie thermique afin de diminuer la masse de muscle lisse [33, 34]. Une augmentation de la qualité de vie des patients a été observée à la suite d'un traitement par la thermoplastie, mais les mécanismes d'action de ce traitement demeurent toujours mal compris [35]. Ainsi, la recherche de nouveaux traitements et de nouvelles avenues thérapeutiques afin de combattre la pathologie de l'asthme demeure aujourd'hui une priorité internationale [29, 32].

Les mécanismes inflammatoires dans l'asthme

La réponse inflammatoire dans l'asthme est extrêmement hétérogène. Elle est caractérisée par la présence d'un grand nombre de molécules signalisantes dans les voies aériennes contribuant à la mise en place et au maintiens de l'inflammation [31]. Cette hétérogénéité, mise en évidence pour la première fois dans les années 1920 par Huber et Koessler est la cause principale de la variabilité dans la réponse des patients aux traitements par des corticostéroïdes inhalés [36]. En plus du nombre élevé de molécules signalisantes, un nombre important d'acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative sont présents dans la pathologie de l'asthme allergique. On retrouve principalement les acteurs de l'immunité adaptative de type 2 (réponse Th2) tels que des lymphocytes Th2, des éosinophiles et des mastocytes (Figure 1.2).

Les cytokines et les différents acteurs de l'inflammation jouent un rôle majeur dans le déclenchement et le maintien de l'inflammation chronique dans l'asthme allergique. Durant la première phase de rencontre avec un allergène, ou phase de sensibilisation, les allergènes pénètrent dans le tractus respiratoire par la respiration et entrent en contact avec l'épithélium bronchique. Le contact entre les allergènes et les cellules épithéliales bronchiques par l'interaction avec certains récepteurs, comme les *Toll Like Receptor* (TLR), provoque la sécrétion de différentes molécules. Parmi ces molécules sécrétées, on retrouve : 1- des alarmines telle que l'IL-33, l'IL-25 et le TSLP ; 2- des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α et le GM-CSF ; et 3- des chimiokines telles que le CCL2 (Figure 1.2) [31, 37]. La sécrétion de l'ensemble de ces molécules recrute les cellules lymphoïdes innées de types 2 (ILC2) et les macrophages alvéolaires qui permettent ensuite la mise en place d'une surveillance allergénique par le réseau de cellules dendritiques [38, 39]. L'activation des cellules dendritiques présentes au niveau de l'épithélium bronchique provoque leurs migrations dans les ganglions lymphatiques. Ces cellules peuvent alors activer les lymphocytes T qui possèdent un TCR (*T-cell receptor*) compatible avec les peptides antigéniques présentés par les cellules dendritiques par l'entremise de leurs complexes majeurs d'histocompatibilité. Cette présentation antigénique va non seulement causer l'expansion clonale des lymphocytes compatibles, mais, en présence de certaines cytokines comme l'IL-4, va favoriser la différenciation de ces lymphocytes en lymphocytes Th2 et Th17 [37, 38]. Les cellules dendritiques possèdent également un rôle majeur dans le recrutement des acteurs de l'inflammation grâce à la sécrétion de chimiokines telles que CCL17 et CCL22 [40]. Lors de la seconde rencontre avec un allergène, la stimulation des

cellules ILC2 provoque une sécrétion élevée d'IL-4 ayant pour rôle d'activer les lymphocytes Th2 présents dans les voies respiratoires et stimulant ainsi une production élevée d'IL-13. La sécrétion d'IL-4 permet également la production d'IL-5 par les cellules Th2 qui stimulent le recrutement d'éosinophiles.

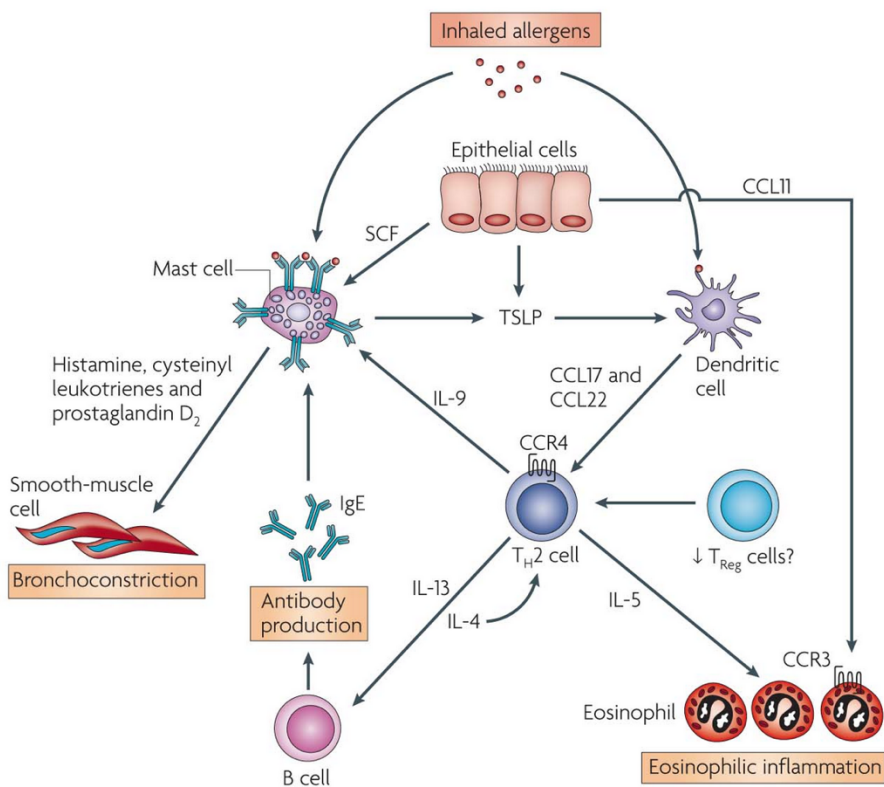


Figure 1.2 : Les différentes cellules inflammatoires impliquées dans l’asthme. Les allergènes inhalés stimulent les mastocytes sensibilisés grâce à l’interaction avec leurs IgE de surface, provoquant la sécrétion de molécules bronchoconstrictrices. Les cellules épithéliales libèrent du *stem cell factor* (SCF) afin de maintenir les mastocytes proches de la lumière bronchique. Les allergènes présents sont également reconnus par les cellules dendritiques qui sécrètent à leurs tours des molécules telles que les chimiokines CCL17 et CCL22 afin de recruter les lymphocytes *helper* de type Th2. Les lymphocytes Th2 libèrent : 1- de l’IL-4 et de l’IL-13 qui favorise la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui sécrètent des IgE ; 2- de l’IL-5 afin de stimuler le recrutement, l’activation et la survie des éosinophiles ; et 3- de l’IL-9 qui provoque la prolifération des mastocytes. Les cellules épithéliales jouent également un rôle dans l’inflammation par la sécrétion d’alarmines comme le *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), l’IL-33 et l’IL-25 qui sont nécessaires au recrutement des cellules dendritiques, ainsi que par la sécrétion de CCL11 nécessaire pour le recrutement des éosinophiles. D’après Barnes PJ., *Nature review immunol*, 2008.

La présence d'IL-4 lors de la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmocytaires provoque aussi une commutation isotypique des immunoglobulines de type M (IgM) en immunoglobuline de type E (IgE). Ces nouvelles IgE sont ensuite sécrétées par les plasmocytes et se fixent sur les récepteurs FcεRI présents sur la membrane des mastocytes. Ces mastocytes sont alors dits 'sensibilisés'. Ainsi, lorsqu'ils rencontrent à nouveau l'allergène spécifique aux IgE présentes à leurs surfaces, ils dégranulent et libèrent différentes molécules telles que l'histamine, le thromboxane A₂, la prostaglandine D₂ (PGD₂) et le leucotriène C₄ (LTC₄). L'ensemble de ces molécules agit sur les différentes cellules structurales bronchiques telles que les cellules musculaires lisses, provoquant ainsi une contraction du muscle lisse des voies aériennes [41-45].

Les rencontres subséquentes avec un allergène pour lequel les mastocytes sont sensibilisés provoquent une réponse immédiate, ou *early asthmatic response* [46]. Cette réponse rapide est suivie par une réponse tardive, entre 3h et 12h suivant la première, et correspond à la migration des cellules inflammatoires dans le tissu cible. Pour la plupart des allergènes, la présence d'autres cellules inflammatoires telles que les basophiles et les cellules ILC2 entre en jeu à différent temps dans la réponse allergénique [47].

Les éosinophiles sont les cellules principalement retrouvées dans une réponse inflammatoire de types Th2. Ils constituent entre 1 et 3% des globules blancs totaux de l'organisme, et contribuent à une grande partie des processus inflammatoires [48]. Dans l'asthme, ils contribuent à l'inflammation par le relargage de nombreux médiateurs tels que la protéine MBP (*major basic protein*), des espèces réactives de l'oxygène, des cytokines telles que le TGFβ, des chimiokines ou encore des leucotriènes tels que les leucotriènes C₄ et D₄ (LTC₄, LTD₄) [48]. L'IL-5 joue un rôle important dans le recrutement des éosinophiles circulants jusqu'au site de l'inflammation, leur activation et leur différenciation. La présence d'éosinophiles dans les poumons ainsi que dans les lavages bronchoalvéolaires est fortement représentative d'une inflammation asthmatique autant dans les modèles animaux que chez les êtres humains [49]. De plus, la présence d'éosinophiles dans les expectorations induites de patients est un indicateur de la sévérité de l'asthme [50].

Plusieurs études chez l'humain ont aussi montré que la présence de neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires de patients asthmatiques était bien corrélée avec la sévérité de la pathologie [51, 52]. Différents des asthmes éosinophiliques, les asthmes neutrophiliques sont pour la grande majorité liés à une exposition au LPS (lipopolysaccharide)

environnemental comme celui retrouvé dans les champignons ou les bactéries [52]. La présence de LPS active une polarisation des macrophages vers le type M1, ce qui entraîne une production de chimiokines telles que l'IL-8, CXCL1 et CXCL2 qui stimulent le recrutement des neutrophiles [53].

Finalement, les macrophages alvéolaires sont décrits pour exercer des effets protecteurs et anti-inflammatoires, mais leurs rôles dans l'asthme restent controversés [54]. Ces monocytes circulants pourraient avoir un rôle à jouer dans le maintien de l'inflammation en se différenciant en cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques [55]. Les monocytes/macrophages ont largement été caractérisés pour présenter deux types de phénotypes : un phénotype classique d'activation, le phénotype M1, et un phénotype alternatif, le phénotype M2 [54]. La différenciation vers un phénotype M1 ou M2 semble être déterminée par la présence de LPS et d'IFN γ (interféron γ) ou d'IL-4 et d'IL-13, respectivement [46]. Certaines équipes de recherche démontrent clairement l'absence de phénotypes M2 dans les voies respiratoires de patients asthmatiques, tandis que d'autres démontrent une polarisation vers le phénotype M2 [56, 57]. La présence de l'un ou de l'autre type de macrophage dans l'asthme est toujours mal définie et reste à étudier.

Le remodelage bronchique

Le remodelage bronchique dans l'asthme est souvent corrélé au degré de sévérité de la pathologie [58, 59]. Ce remodelage inclus : 1- une détérioration de l'épithélium bronchique ; 2- une hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus et des glandes sous-épithéliales ; 3- un épaississement de la lamina propria (c.-à-d. couche sous l'épithélium) ; 4- une hypertrophie et une hyperplasie des cellules musculaires lisses et 5- une augmentation de la vascularisation [60-62]. L'ensemble de ces modifications structurales contribue à un épaississement de la paroi bronchique, à une diminution du flux respiratoire, et par conséquent à une augmentation de la réactivité bronchique [63].

La détérioration de l'épithélium bronchique comprend : 1- une desquamation des cellules épithéliales et une diminution de l'intégrité de cette barrière protectrice [64] ; 2- une destruction des cellules ciliées responsables de l'excrétion de mucus [65] et 3- une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance [66]. Ces changements sont provoqués par la présence répétée de cytokines et chimiokines inflammatoires telles que l' $\text{IFN}\gamma$, le $\text{TGF}\beta$ ainsi que par les sécrétions éosinophiliques telles que les espèces réactives de l'oxygène, ou les différents éicosanoïdes [19]. La perte de cette intégrité épithéliale entraîne une augmentation de l'infiltration des allergènes, des pathogènes et des irritants [62]. De plus, l'exposition répétée à des facteurs environnementaux tels que la fumée de cigarette, certains polluants, ainsi que l'exposition à des stress mécaniques tels que des bronchoconstrictions répétées ou de la toux pourrait également entraîner une perte de cette intégrité épithéliale [62]. Il a récemment été démontré que le stress mécanique sur l'épithélium bronchique provoqué par une bronchoconstriction pourrait engendrer une fluidisation des cellules épithéliales, passant d'un stade bloqué à un stade mobile [67]. L'hypothèse a été émise que cette transition pourrait contribuer à une perte d'intégrité telle que celle observée dans l'asthme [67].

L'hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus et des glandes sous épithéliales est un phénotype souvent retrouvé dans l'asthme fatal [68]. Ces glandes exocrines sont la source de production de différentes glycoprotéines présentes dans le mucus. Ce sont ces protéines qui confèrent au mucus ses propriétés adhésives et viscoélastiques [69]. Une hypersécrétion liée à une hyperplasie de ces glandes peut entraîner la formation de bouchons de mucus dans les cas les plus graves et entraîner la mort de la personne [70]. Les mécanismes qui gouvernent cette hypersécrétion de mucus sont encore mal compris,

mais l'augmentation du nombre de vaisseaux sanguins et du nombre de médiateurs inflammatoires pourrait provoquer une augmentation de la perméabilité vasculaire et provoquer ces épisodes d'hypersécrétion [69].

La fibrose sous-épithéliale observée dans le remodelage chez les personnes asthmatiques contribue également à une diminution du flux respiratoire et donc à l'obstruction thoracique [71]. Cette sécrétion de matrice constituée de collagène de type I, de type III et de type V, de glycosaminoglycanes et de fibronectine est provoquée par les cellules fibroblastiques présentes dans l'espace interstitiel [72]. La synthèse ainsi que la dégradation de la matrice extracellulaire sont des processus extrêmement dynamiques régis par un équilibre entre la sécrétion de collagène par les fibroblastes, la dégradation de matrice par les protéines matrice métalloprotéinases (MMP) ainsi que par l'inhibition de ces MMP par des inhibiteurs présents dans les tissus, les TIMPS [73]. Un déséquilibre de cette balance provoqué par une augmentation de la sécrétion de matrice extracellulaire provoque ainsi la formation de fibrose [73]. De plus, une structuration anormale de la matrice engendre une altération des propriétés élastiques et mécaniques du tissu [74]. Une sécrétion de TGF- β par les cellules épithéliales serait l'un des principaux facteurs entraînant une hypersécrétion de matrice par les cellules fibroblastiques et myofibroblastiques [75]. En revanche, les causes menant à cette hypersécrétion demeurent mal comprises.

Enfin, l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses représentent l'un des principaux changements des éléments structuraux impliqués dans le phénotype du remodelage bronchique. Il est documenté que la taille de la couche de muscle lisse peut être augmentée de 25 à 55% dans l'asthme non fatal et de 50 à 200% dans l'asthme fatal en comparaison à des sujets contrôles [76]. De plus, il a été démontré que le muscle lisse des voies aériennes contribue également à l'inflammation par la sécrétion de : 1- diverses molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 α , CCL11 ou l'IL-8 ; 2- des facteurs de croissance tels que le PDGF (*platelet-derived growth factor*) ou le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ; et 3- des médiateurs lipidiques tels que la prostaglandine E₂ (PGE₂) [77].

Enfin, certaines études suggèrent que différents effets du remodelage pourraient être expliqués par une bronchoconstriction répétée [78, 79]. Une étude réalisée chez des patients asthmatiques démontre que la répétition successive de bronchoconstrictions, provoquées par l'inhalation de MCh à plusieurs jours d'intervalle, provoque une

augmentation du nombre de cellules sécrétrices de mucus ainsi qu'une augmentation de la fibrose sous épithéliale [78]. En revanche, les fonctions respiratoires des patients n'ont pas été mesurées dans cette étude [78]. Une autre étude réalisée dans notre laboratoire a démontré qu'une bronchoconstriction répétée chez des souris provoque bien une augmentation du nombre de cellules sécrétrices de mucus, mais que cet effet n'a aucun impact sur les fonctions respiratoires des animaux [79]. Une des hypothèses permettant d'expliquer l'hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus serait qu'une contraction du muscle lisse des voies aériennes chez l'humain provoquerait l'activation de TGF- β latent présent dans la matrice extracellulaire et qui serait libéré lors d'une bronchoconstriction [80].

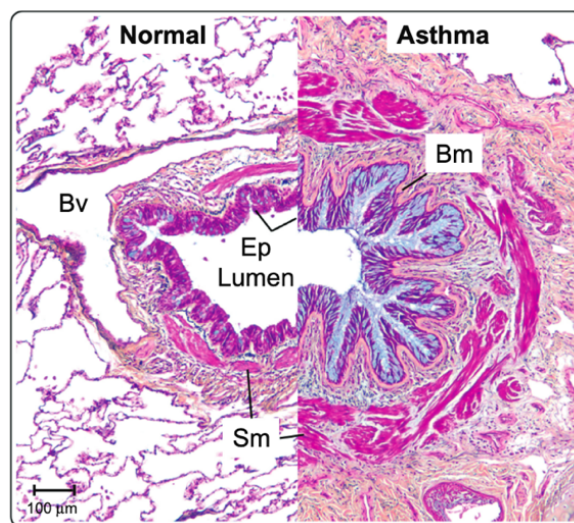


Figure 1.3 : Le remodelage bronchique dans l'asthme. Les voies respiratoires dans l'asthme subissent parfois un remodelage important. Section de voies respiratoires de taille moyenne provenant d'un individu sain (gauche) et d'un individu asthmatique sévère (droite). Coloration de Movat à cinq couleurs. Dans l'asthme, il y a une augmentation des glandes sécrétrices de mucus (bleu), et un épaississement de la membrane basale (Bm). On observe également une augmentation de la masse de muscle lisse (Sm). Bv, vaisseau sanguin ; Ep, épithélium ; Bm, membrane basale ; Sm, muscle lisse. D'après *Wadsworth SJ et al, 2010* [60].

L'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique est définie par une diminution excessive des fonctions respiratoires en réponse à une bronchoprovocation par un ou divers stimuli (Figure 1.4). En clinique, la réactivité bronchique est mesurée par la diminution du VEMS en réponse à l'inhalation de doses croissantes de MCh. Comme décrit plus haut dans cette partie, une PC20 en réponse à l'inhalation de concentrations inférieures à 4 mg/ml de MCh est la valeur seuil du diagnostic de l'hyperréactivité bronchique [25]. Cette baisse excessive des fonctions respiratoires est liée à une diminution de la lumière bronchique entraînant une augmentation de la résistance du flux d'air. La résistance du flux d'air dans les voies respiratoires peut être comparée à la résistance d'un gaz dans un tube. Elle est inversement proportionnelle au rayon des voies respiratoires à la puissance 4 selon la loi de Hagen - Poiseuille :

$$R = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$$

Où R est la résistance η la viscosité de l'air, l la longueur du tube et r le rayon du tube. Ainsi, de faibles changements du calibre bronchique peuvent grandement affecter la résistance du flux d'air et donc les fonctions respiratoires. Une diminution excessive du calibre des voies respiratoires peut être provoquée par différents facteurs que l'on peut regrouper en deux grandes sous-catégories : 1 - les facteurs liés aux éléments structuraux non contractiles et 2 - les facteurs liés à l'élément contractile du système respiratoire, le muscle lisse des voies aériennes. Parmi les facteurs non contractiles qui affectent le calibre des voies respiratoires, on retrouve : 1- un épaissement de la lamina propria et de la membrane basale provoquée par une hypersécrétion de collagène, de fibronectine et de glycosaminoglycanes qui composent la matrice extracellulaire ; 2- une hypersécrétion de mucus causée par l'hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus tel que décrit dans la partie précédente [81, 82] et 3- une présence exagérée de cellules inflammatoires qui peut provoquer la formation d'œdèmes.

La présence de l'un ou plusieurs de ces phénomènes engendre un rétrécissement excessif du calibre des voies respiratoires et peut mener à une hétérogénéité pulmonaire. L'hétérogénéité pulmonaire est définie par une ventilation inégale au sein de l'arbre respiratoire provoqué par un rétrécissement ou une obstruction de certaines voies aériennes [83, 84]. Cette hétérogénéité se traduit généralement par une augmentation globale de la

résistance des voies aériennes et par une forte augmentation de la réactivité bronchique [85].

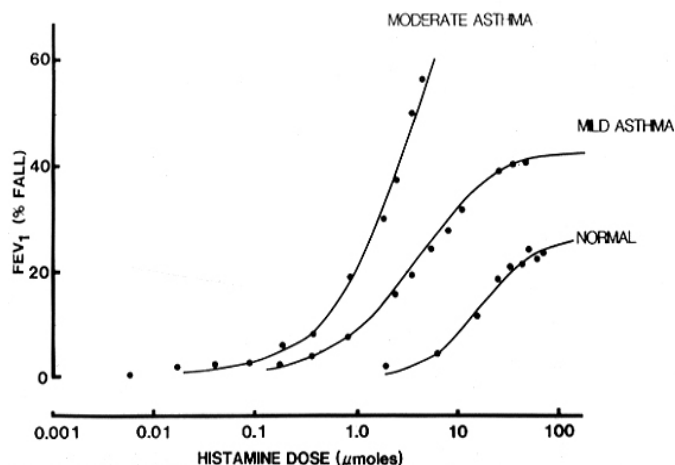


Figure 1.4 : L'hyperréactivité bronchique dans l'asthme. Diminution des fonctions respiratoires mesurées par spirométrie en réponse à l'inhalation de différentes doses d'un bronchoconstricteur, ici l'histamine. FEV₁, Volume expiratoire maximal en 1 seconde. D'après Woolcock et al, *Am Rev Respir Dis*, 1984.

En plus de l'augmentation de la réactivité bronchique provoquée par le remodelage des éléments structuraux, la majeure partie de la réactivité bronchique mesurée en réponse à l'inhalation de MCh est liée à l'élément contractile des voies respiratoires : le muscle lisse des voies aériennes. Ainsi, de nombreuses études visant à comparer la capacité contractile de muscles lisses provenant de patients asthmatiques et de sujets contrôles ont été réalisées dans les dernières décennies. Parmi les études réalisées, certaines démontrent des augmentations de contractilités du muscle lisse chez les sujets asthmatiques, d'autres ne démontrent aucune différence, et certaines démontrent même des diminutions de force mesurée [86-91]. Étonnamment, une étude réalisée dans l'asthme équin (le souffle) démontre que la vitesse de raccourcissement (V_{\max}) de muscles lisses provenant de voies aériennes périphériques de chevaux asthmatiques est plus importante que la vitesse maximale de raccourcissement de muscles lisses provenant de chevaux contrôle [92]. Ces résultats laissent sous-entendre que le muscle lisse dans l'asthme ne serait peut-être pas plus fort, mais se contracterait plus vite. Cependant, malgré le nombre important d'études réalisées dans ce domaine, une hypercontractilité intrinsèque du muscle lisse des voies

aériennes dans l'asthme est toujours aujourd'hui le sujet de nombreuses études et le propos de nombreux débats [93-95].

Contrairement aux mesures de force, de stress ou encore de vitesse de raccourcissement générée par le muscle lisse des voies aériennes, des différences de réponse à l'effet bronchodilatateur provoqué par les inspirations profondes serait une des causes de l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme [96]. Chez les individus sains, les inspirations profondes diminuent la constriction bronchique et protègent également les voies respiratoires des bronchoconstrictions subséquentes. Ces inspirations profondes provoquent des variations de pressions et de volumes au sein des voies respiratoires, provoquant ainsi un étirement du muscle lisse. Une étude a démontré qu'une excursion de longueur du muscle lisse des voies aériennes de plus de 3.3% de sa longueur initiale (L_{ref}) était nécessaire afin de créer un effet bronchodilatateur provoqué par son étirement [97]. L'hypothèse a été émise que ce seuil du niveau d'étirement était donc nécessaire au détachement des unités motrices contractiles entre elles afin de produire une diminution de force [97]. Ces effets bronchodilatateurs provoqués par les inspirations profondes ont été démontrés comme étant atténués, voire inexistant, chez certains patients asthmatiques [98, 99]. Différentes causes pourraient mener à une diminution de l'effet bronchodilatateur provoqué par l'inspiration profonde tel que : 1- une augmentation de la rigidité du muscle lisse provoqué par un tonus élevé et 2- une augmentation de la rigidité bronchique provoquée par les différentes conséquences du remodelage [96].

Finalement, un des aspects majeurs du muscle lisse des voies aériennes qui contribuerait au développement de l'hyperréactivité bronchique est sa plasticité. Plus particulièrement, la plasticité des éléments contractiles qui constituent le cytosquelette des cellules musculaires lisses. Le muscle lisse des voies aériennes a été décrit comme ayant la capacité de s'adapter à différentes longueurs selon un phénomène appelé l'adaptation à la longueur, ou '*length adaptation*'. Ce phénomène réfère au fait que les cellules musculaires lisses sont capables de réorganiser leur appareil contractile afin d'optimiser la force générée par le muscle lisse des voies aériennes peu de temps après un changement de longueur (c.-à-d. 30 minutes) [100-102]. Afin que ce phénomène se produise de façon optimale, le muscle lisse doit se trouver dans un environnement statique, découplé des perturbations liées aux oscillations qui interviennent durant la respiration [100-102]. Une augmentation de la rigidité bronchique contribuerait à la mise en place de ce phénomène en diminuant les changements de longueurs effectués par le muscle lisse lors des variations de volumes et

de pressions transpulmonaires qui ont lieu pendant la respiration courante. Une diminution des changements de longueurs subis par le muscle lisse le laisserait donc dans un état statique, permettant le développement du phénomène d'adaptation à la longueur. Ce mécanisme pourrait contribuer à une augmentation des capacités contractiles du muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme, et ainsi contribuer à une augmentation de la réactivité bronchique.

Enfin, la propriété du muscle lisse des voies aériennes découverte dans les dernières années, qui constitue le sujet principal de cette thèse, est son aptitude à augmenter ses capacités contractiles suivant une période de tonus (c.-à-d. une contraction soutenue) [103]. Ce phénomène a été nommé le gain de force du muscle lisse en réponse à un tonus, ou "*force adaptation*". Une augmentation de la force générée par le muscle lisse suivant une exposition de 30 minutes de tonus a tout d'abord été démontrée avec des faisceaux isolés de muscle lisse trachéal de moutons et des trachées de souris [103, 104]. Il a également été démontré que ce phénomène n'était pas atténué lorsque le muscle lisse était placé dans des conditions oscillatoires, suggérant que ce phénomène pourrait être impliqué dans une élévation de la réactivité bronchique *in vivo* durant la respiration [105]. De plus, il a été montré qu'une diminution du tonus provoque une rapide disparition (c.-à-d. quelques minutes) de ce phénomène [104, 106]. Ainsi, ces résultats suggèrent que le gain de force du muscle lisse est un phénomène labile, provoqué par la plasticité des éléments contractiles du muscle lisse des voies aériennes [104, 106].

Une étude a démontré qu'une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes est bien corrélée avec l'augmentation de la réactivité bronchique chez l'humain [107]. Il a également été démontré à différentes reprises que le tonus du muscle lisse serait plus élevé chez les individus asthmatiques [108-110]. De plus, lorsque le muscle n'est pas suffisamment étiré régulièrement, le tonus musculaire peut également augmenter de façon importante [111]. Ainsi, ce phénomène pourrait être un élément majeur impliqué dans le développement de l'hyperréactivité bronchique dans la pathologie de l'asthme. Basé sur une étude réalisée grâce à des modèles informatiques, le phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes pourrait augmenter la réactivité bronchique entre 39 et 274% en fonction de la taille et de la génération des bronches dans lesquelles ce phénomène interviendrait [106].

Récemment, notre équipe de recherche a démontré que l'élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes augmente la réactivité bronchique en réponse à une forte dose de MCh *in vivo* chez la souris [104]. Comme décrit par les modèles informatiques, cette étude a démontré qu'une préexposition à un tonus augmentait la résistance du système respiratoire en réponse à une forte dose de MCh de 126% [104].

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'une augmentation de la force générée par le muscle lisse suivant une période de tonus *in vitro* est capable d'augmenter la réactivité bronchique *in vivo* de plus de 100% [104]. De plus, la labilité de ce phénomène démontre également qu'une élévation du tonus serait consistante avec la variabilité de l'inflammation présente dans la pathologie de l'asthme [112]. Ainsi, les données obtenues *in vitro* sur des tissus isolés et *in vivo* sur des souris démontrent bien la pertinence de ces recherches dans la compréhension de l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme.

Les travaux de ce projet de doctorat visaient à comprendre : 1- quels étaient les impacts du phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes *in vivo* chez l'humain ; 2- quels étaient les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation des capacités contractiles suivant une période de tonus et 3- quels étaient les liens potentiels de cause à effet qui existent entre l'inflammation allergique dans l'asthme et le phénomène du gain de force du muscle lisse *in vivo* dans un modèle d'asthme murin.

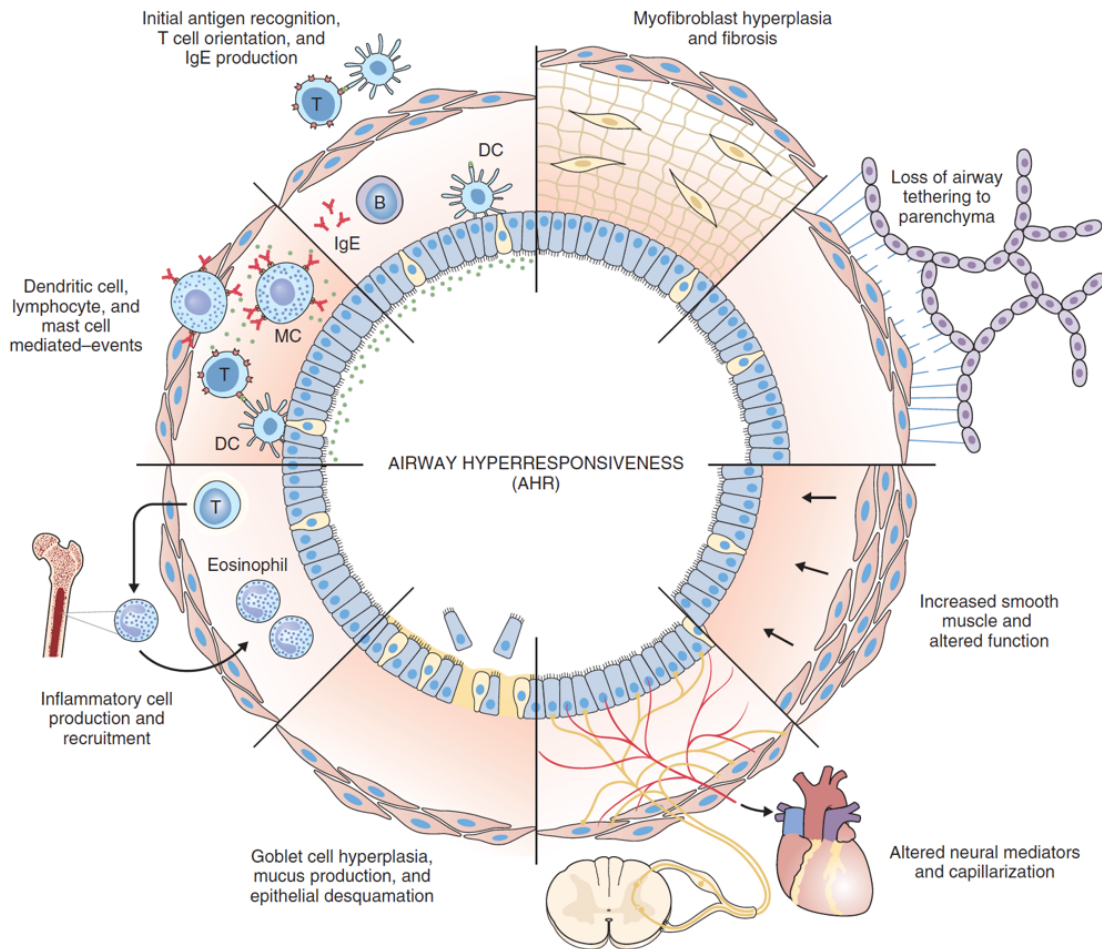


Figure 1.5 : Les différentes causes de l'hyperréactivité dans l'asthme. Parmi les différentes causes qui peuvent mener à l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme, on retrouve une augmentation du nombre de cellules inflammatoires présentes dans le parenchyme pulmonaire et dans les voies aériennes, une augmentation de la production et de la sécrétion de mucus par les cellules de gobelets, une altération des réponses nerveuses, un épaississement de la matrice sous épithéliale provoquée par une hypersécrétion des cellules fibroblastiques et enfin une hypertrophie, une hyperplasie ainsi qu'une altération des comportements contractiles du muscle lisse des voies respiratoires. D'après Pavord ID. et al, *Diagnosis and management of asthma in adults*.

Le muscle lisse des voies aériennes

Le muscle lisse des voies aériennes (Figure 1.6) a été décrit pour la première fois en 1804 par Franz Daniel Reisseisen [113]. Il est présent sous la forme de fibres hélicoïdales sur l'ensemble de l'arbre bronchique, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales [114, 115]. Depuis sa découverte, différentes hypothèses concernant son rôle ont été émises au cours du temps. Un des rôles majeurs qui lui a été attribué concerne sa fonction dans l'optimisation de la distribution de l'air au travers des poumons. En 1909, Keith affirme que le muscle lisse bronchique, en se contractant ou en se relaxant, permet de réguler la distribution de l'air dans les poumons [113]. Il suggère également qu'une pression intra-alvéolaire suffisante permet une bonne distribution du sang dans l'ensemble des poumons [113]. Selon Douglas et Haldane en 1911, la contraction du muscle lisse serait nécessaire afin de créer une résistance suffisante pour la bonne conduction de l'air dans l'arbre bronchique [116]. Ils suggèrent également que le maintien d'une résistance dans les petites bronches respiratoires serait nécessaire pour permettre la conduction de l'air dans les alvéoles et maintenir ainsi un bon ratio ventilation sur perfusion (V/Q) [116]. Cette hypothèse a également été soutenue en 1961 par Howell et Permutt [117, 118]. En plus de la fonction suggérée pour la conduction de l'air, différentes hypothèses ont été proposées concernant son mouvement péristaltique. En 1929, Macklin propose qu'un péristaltisme du muscle lisse permette d'aider à expirer l'air présent dans les poumons [119]. Une contraction de la partie distale vers la partie proximale permettrait le rejet de l'air. Une autre proposition faite par Fleischner en 1949 était que la fonction de ce mouvement péristaltique du muscle permettrait de faciliter la clairance du mucus présent dans les voies respiratoires [120]. Enfin, la dernière hypothèse concernant les mouvements péristaltiques a été faite par Schittny et collaborateurs en 2000, et concerne le développement des voies aériennes durant l'embryogenèse. Les mouvements allant de la partie proximale vers la partie distale joueraient un rôle dans le déplacement du liquide pulmonaire, permettant ainsi d'étirer les bronches pour leur permettre de se développer [121]. Tous les arguments évoqués pendant plus d'un siècle ont tous été contestés par Mitzner en 2004, dans un article de synthèse où il affirme que le muscle lisse respiratoire est un organe conservé de l'évolution, mais inutile aujourd'hui [122]. En 2007, Fredberg émet l'hypothèse que le muscle lisse pourrait être utile afin d'économiser de l'énergie [123]. En transformant une énergie chimique en énergie mécanique, il permettrait de maintenir la forme d'un organe grâce à la mise en place d'un

tonus musculaire [123]. En 2016, nous émettons l'hypothèse que le muscle lisse dans sa physiologie normale semble beaucoup plus disposé à résister à la dilatation bronchique provoquée par l'inspiration qu'à diminuer la lumière des voies respiratoires provoquée par sa contraction (Annexe 8.2) [124]. Cette étude publiée durant mon doctorat démontre que la force générée par des bronches humaines pendant leurs étirements est beaucoup plus importante que la force générée durant leurs raccourcissements. À une même longueur, la concentration de MCh requise pour que la bronche génère la même quantité de force durant son raccourcissement que durant son étirement doit être 1000 fois plus importante durant son raccourcissement [124].

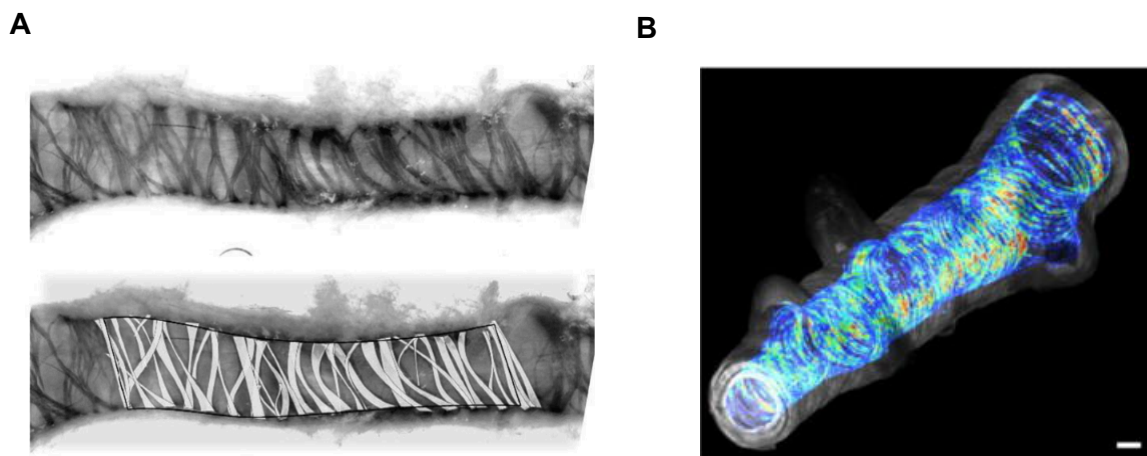


Figure 1.6 : Le muscle lisse des voies aériennes. A – Bronche humaine périphérique marquée à la phalloïdine conjuguée au TRITC, et observée en microscopie. Le muscle lisse des voies respiratoires apparaît en couleur foncée sur les photos, on observe qu'il est disposé de façon hélicoïdale autour de la bronche. Les bandes blanches de la seconde image correspondent aux bandes de muscles lisses marquées par un logiciel sur le même échantillon. B – Segment d'une bronche de porc *ex vivo*. Le muscle lisse des voies aériennes apparaît grâce à sa biréfringence. D'après *Ijima et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, et Adams DC. et al, Sci Transl Med, 2016.*

Le muscle lisse des voies aériennes possède une grande plasticité compte tenu de ses capacités à s'adapter à une certaine longueur, à augmenter ses capacités contractiles suivant une exposition à un tonus et de sa capacité à se relaxer lorsqu'il subit des excursions de longueurs. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires qui gouvernent le phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes, recenser les différents processus

intracellulaires qui gouvernent la contraction, la relaxation et la modulation de ce muscle est indispensable.

Lors de l'activation du muscle lisse par le signal d'un agoniste contractile sur son récepteur spécifique, le nombre de molécules qui assurent la transmission du signal du récepteur vers l'appareil contractile est extrêmement élevé. De plus, les processus intracellulaires qui contrôlent la contractilité dans le muscle lisse sont d'autant plus complexes que l'appareil contractile est évanescent. Ainsi, en plus des voies de signalisations impliquées dans l'activation de l'appareil contractile, d'autres voies de signalisation sont également activées en parallèle et jouent un rôle dans la réorganisation de l'appareil contractile lui-même.

Cet appareil contractile peut être comparé à un véhicule en déplacement dans lequel les chaînes de myosine jouent le rôle du moteur, et le cytosquelette d'actine joue le rôle de la transmission [125]. Différents processus intracellulaires sont donc nécessaires afin que le muscle lisse puisse se contracter : 1- la polymérisation des chaînes lourdes de myosines musculaire de type II, 2- l'activation de la chaîne lourde de myosine musculaire de type II et 3- la polymérisation et la réorganisation des filaments d'actine. La polymérisation d'actine globulaire (G-actine) en actine filamenteuse (F-actine) permet d'augmenter la transmission mécanique (mécanotransmission) entre les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire grâce à l'interaction avec les intégrines présentes dans la membrane plasmique [126]. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC₂₀) active les têtes globulaires de myosine, qui, une fois activées, provoquent le glissement des têtes de myosine sur les filaments d'actine, entraînent le rapprochement des régions corticales des cellules et permettent ainsi la génération de force.

Les voies d'activation de la contraction du muscle lisse des voies aériennes

Les récepteurs muscariniques de type 3 (M3) sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de type $G_{\alpha q}$. Lors de l'activation de ces récepteurs par la MCh, la sous-unité $G_{\alpha q}$ active la phospholipase C par l'activation de la protéine Rac1 [127]. Une fois activée, la phospholipase C clive les phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) présents dans la membrane lipidique des cellules musculaires lisses [128]. Le clivage des molécules de PIP2 libère des molécules d'inositol-3-phosphate (IP3) ainsi que des molécules de diacylglycérol (DAG) [129].

D'une part, le DAG formé par le clivage des molécules de PIP2 active les protéines kinase C (PKC) présentes dans le compartiment cytoplasmique. Il a été démontré que l'activation des PKC engendre la phosphorylation des canaux calciques de type L dépendant du voltage (LVGC), favorisant ainsi l'ouverture de ces canaux, et provoquant un flux d'ions calcium (Ca^{2+}) du compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire [130]. Les PKC ont également été décrites pour potentialiser l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire par la phosphorylation des canaux potassiques Kv7.5, en provoquant leurs inactivations [131]. Cette inactivation provoque une dépolarisation de la membrane et génère ainsi une augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique [131]. Les PKC activées phosphorylent également la protéine cytoplasmique CPI-17 (*protein kinase C-potentiated protein phosphatase-1 inhibitor*). Une fois phosphorylée, la protéine CPI-17 inhibe la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) [132].

D'autre part, en parallèle de la signalisation du DAG, l'IP3 libéré par le clivage des molécules de PIP2 active les récepteurs à l'IP3 (IP3R) présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. L'activation de ces récepteurs provoque ainsi la libération des ions Ca^{2+} présents dans le réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme des cellules musculaires [133]. Lorsque le réticulum sarcoplasmique se vide d'ions Ca^{2+} , les protéines *stromal interacting molecules* (STIM) présentes sur la partie interne de la membrane du réticulum sarcoplasmique sondent la baisse de concentration calcique au sein de l'organite [134]. En réponse à cette baisse de concentration, les protéines STIM vont alors former des agrégats sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et interagir avec les protéines Orai1 présentes sur la membrane plasmique des cellules [135]. Cette interaction active l'ouverture des canaux Orai1, ce qui provoque un flux d'ions Ca^{2+} du compartiment extracellulaire vers

le compartiment intracellulaire [135]. La baisse de concentration calcique au sein du réticulum sarcoplasmique active également les protéines canaux *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase (SERCA), possédant une activité ATPasique afin de fournir l'énergie nécessaire pour pomper les ions Ca^{2+} du compartiment cytoplasmique vers le réticulum sarcoplasmique [136]. Les échanges d'ions Ca^{2+} entre le réticulum sarcoplasmique et le cytoplasme des cellules provoquent la formation d'oscillations calciques. Il a été décrit que la fréquence et l'intensité de ces oscillations calciques sont directement corrélées au niveau d'activation de la chaîne légère de myosine [136, 137]. La formation de ces oscillations calciques requiert également l'activation de la protéine phosphoinositide-3-kinase γ (PI3K γ) [138], une PI3K qui possède la sous-unité catalytique p110 de classe I γ et qui semble activée par les RCPG grâce aux sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G.

En plus des oscillations provoquées par ces divers mécanismes, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique liée à l'ouverture des canaux LVGC provoque l'ouverture des canaux ryanodine présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique [130]. L'ouverture de ces canaux provoque de nouveau la sortie d'autres ions Ca^{2+} , et élève davantage la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique [132, 136]. Ce mécanisme nommé libération de calcium provoquée par le calcium (i.e., *calcium-induced calcium release* ou CICR) permet d'augmenter la fréquence des oscillations calciques au niveau du cytoplasme [139]. Une des voies également importantes dans la mise en place d'oscillations calciques au sein des cellules musculaires lisses est la voie *CD38-cyclic ADP ribose* (CD38/cADPr) [140]. Le *cyclic ADP ribose* (cADPr) est un dérivé des molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). La formation de cADPr par les protéines membranaires CD38 provoque également l'entrée de ce métabolite à l'intérieur des cellules, possiblement par les protéines CD38, mais le mode d'entrée du cADPr n'est toujours pas connu. Une fois dans la partie cytoplasmique, le cADPr va alors activer les canaux ryanodine présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et contribuer ainsi à la mise en place de CICR [141].

La présence d'oscillations calciques, mises en place par l'ensemble de ces mécanismes, contribuent à la formation de complexes entre des ions Ca^{2+} et la protéine calmoduline [142]. Les complexes Ca^{2+} - calmoduline (CaCaM) formés s'associent aux protéines kinases de la chaîne légère de myosine (MLCK) et provoquent leurs activations. Une fois activées, les protéines MLCK vont alors phosphoryler les résidus sérine 19 des chaînes légères de myosine de 20 kDa (MLC₂₀) [142].

Ainsi, l'activation des protéines MLCK par les complexes Ca²⁺/CaM, et l'inhibition des protéines MLCP par les protéines CPI-17, provoque une augmentation de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (P-MLC₂₀), augmentant le ratio P-MLC₂₀/MLC₂₀. L'augmentation de ce ratio en faveur de la forme phosphorylée des MLC₂₀ active alors l'interaction des têtes globulaires de myosine avec les filaments d'actine, permet le glissement des têtes de myosines sur les filaments d'actine (i.e., *crossbridge cycling*), provoquant ainsi la contraction des cellules musculaires lisses [143-145]. En plus de son rôle dans l'activation des têtes de myosine, une étude a démontré que la phosphorylation de la MLC₂₀ pourrait également contribuer à la contraction en favorisant la formation de filaments de myosine et en augmentant leurs stabilités [146]. Étonnamment, la nécessité du calcium dans la contractilité du muscle lisse a récemment été remise en question [147]. Une étude a démontré que l'inhibition de la signalisation calcique par un inhibiteur de signalisation G_q (c.-à-d. FR900359) n'affectait pas la phosphorylation de la chaîne légère de myosine, ni les capacités contractiles de coupes minces de poumons [147]. *A contrario*, l'utilisation de FR900359 par une autre équipe de recherche a démontré une diminution de la contractilité de coupes de poumons [148].

En parallèle de l'activation des chaînes de myosines, les filaments d'actine se remodelent et se structurent. La famille des protéines d'actine est composée de 6 isoformes et représente 15% des protéines totales des cellules musculaires lisses [149]. Durant les dix dernières années, de nombreuses recherches ont été entreprises afin de comprendre les mécanismes moléculaires de la polymérisation d'actine et de la réorganisation des filaments d'actine au sein des cellules musculaires lisses.

Lors de l'activation du récepteur M3 par la MCh, un pool de G-actine se polymérise afin de former des filaments d'actine (F-actine). Il a récemment été décrit que l'augmentation du nombre de filaments d'actine (filamentogénèse) est médiée grâce à l'activation des protéines RhoA GTPase impliquées dans la phosphorylation des chaînes légères de myosine non-musculaire de type II (NMII) [150]. Ce mécanisme serait en amont de la succession d'événements complexes qui aboutissent à la polymérisation d'actine [151-157]. Une fois phosphorylées, les protéines NMII adoptent une conformation qui leur permet de se dimériser afin de former des filaments fonctionnels [150]. Les filaments de NMII fonctionnels se fixent alors sur les filaments d'actine afin de permettre le recrutement des protéines paxiline, vinculine, *focal adhesion kinase* (FAK) et *P21-activated kinase* (PAK). Ces protéines vont être transportées jusqu'aux intégrines présentes à la membrane

plasmique, et permettre la formation des complexes adhésomes par la fixation de la vinculine sur la taline liée aux intégrines membranaires [150]. Le recrutement de ces protéines active la phosphorylation de deux résidus tyrosine de la paxiline par la protéine kinase FAK [156]. La phosphorylation de ces deux sites permet alors la phosphorylation d'un troisième site de la paxiline par PAK [156]. Cette phosphorylation active le recrutement des protéines *GPCR-interacting proteins* (GIT), et *PAK-interacting exchange factor* (PIX) [156]. Le recrutement de ces protéines permet ensuite l'activation de la GTPase membranaire *cell division control protein 42* (CDC-42). L'hydrolyse de molécules de GTP en GDP par les protéines CDC-42 active les protéines *Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome proteins* (N-WASP) [152]. Une fois activés, les complexes N-WASP recrutent la cortactine, activant ainsi le complexe protéique *actin related protein 2 & 3* (Arp2/3) qui initie l'élongation des filaments existants [151]. La formation de ces complexes adhésomes ainsi que l'élongation des filaments existants permettent de renforcer les liens physiques entre le cytosquelette intracellulaire et la matrice extracellulaire (Figure 1.7).

L'activation des récepteurs M3 provoque également la phosphorylation des protéines *Abelson tyrosine kinase* (c-Abl), qui vont à leur tour phosphoryler *Crk-associated substrate* (CAS) ainsi que la cortactine. Les protéines CAS et cortactine une fois phosphorylées vont alors s'associer avec la profilin-1 (Pfn-1) afin de générer un complexe protéique qui va s'associer à N-WASP et au complexe Arp2/3. Ici aussi, la formation de complexes N-WASP-cortactine-Arp2/3 active la nucléation de nouveaux filaments d'actine ainsi que l'élongation des filaments déjà existants [151-153] (Figure 1.7).

Afin de générer une contraction optimale du muscle lisse, les protéines impliquées dans la dépolymérisation d'actine sont également requises. En effet, afin de permettre la réorganisation du cytosquelette contractile, les cellules musculaires lisses doivent impérativement passer par un stade de désorganisation du cytosquelette. Parmi les protéines impliquées dans la déstabilisation des filaments d'actine, l'ADF (*actin-depolymerizing factor*) et la cofiline sont des protéines qui clivent les filaments d'actine et qui sont activées par des mécanismes de déphosphorylation lors d'une stimulation avec un bronchoconstricteur [158].

Ces résultats suggèrent que le remodelage d'actine lors de la contraction implique à la fois de la polymérisation et de la dépolymérisation. La phosphatase responsable de l'activation de l'ADF et de la cofiline lors d'une stimulation contractile dans le muscle lisse des voies

aériennes pourrait être la calcineurine (PP2B), mais des études plus approfondies seront nécessaires afin de confirmer ces résultats [158]. La cofiline lorsqu'elle est déphosphorylée a pour fonction de cliver les filaments d'actine existants, permettant de générer de nouvelles extrémités libres polymérisables afin que les filaments existants puissent être allongés à nouveau ou ramifiés [159]. Cette fonction contribue ainsi à un processus dynamique de la réorganisation du cytosquelette contractile [159].

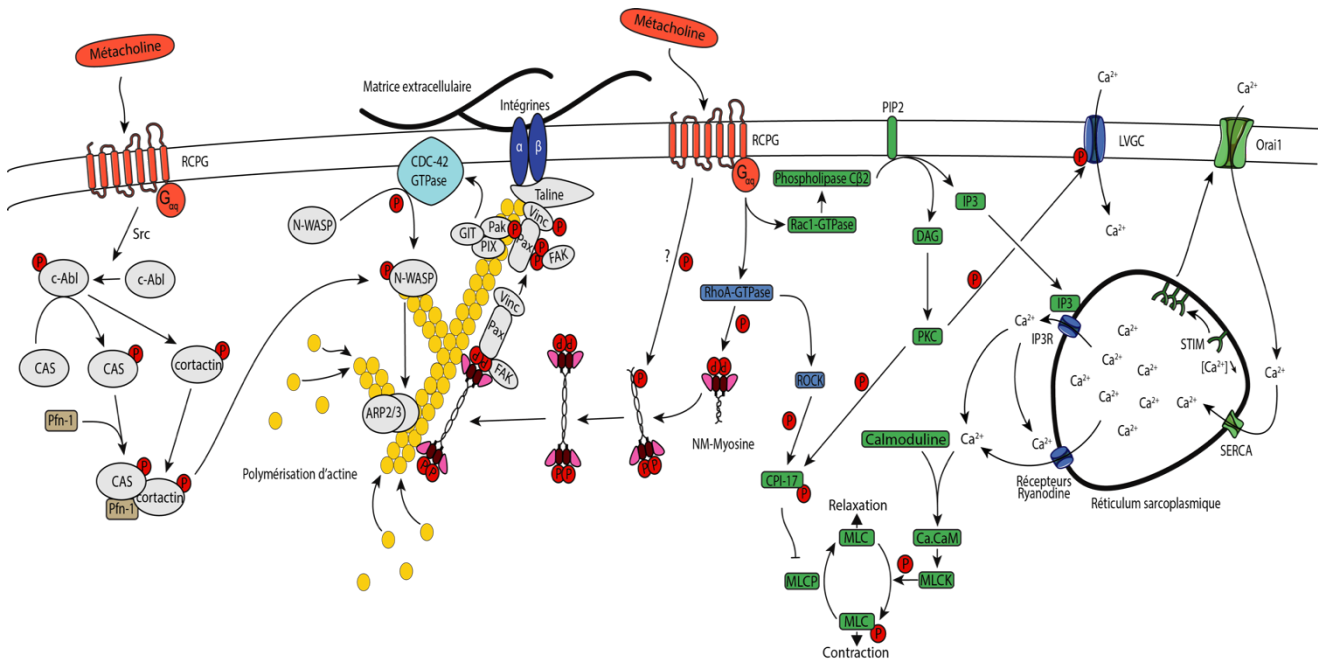


Figure 1.7 : Les voies intracellulaires qui gouvernent la contractilité des cellules musculaires lisses. RCPG, récepteur couplé aux protéines G; c-Abl, *Abelson tyrosine kinase*; CAS, *Crk-associated substrate*; Pfn-1, *Profilin-1*; N-WASP, *Neuronal Wiskott-Aldrich syndrom protein*; ARP2/3, *actin related protein 2/3*; GIT, *GPCR-interacting proteins*; PAK, *P-21 activated kinase*; PIX, *PAK-interacting exchange factor*; Pax, *Paxiline*; Vinc, *Vinculine*; FAK, *Focal adhesion kinase*; NM-Myosine, non-muscle myosine de type II; DAG, *Diacylglycérol*; IP3, *Inositol-3-phosphate*; PKC, *Protein kinase C*; ROCK, *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*; CPI-17, *protein kinase C-potentiated protein phosphatase-1 inhibitor*; MLCP, *Myosin light chain phosphatase*; MLC₂₀, *Myosin light chain*; MLCK, *Myosin light chain kinase*; Ca.Cam, complexe calcium calmoduline; IP3R, *IP3 Receptor*; LVGC, *L-type voltage gated channel*; SERCA, *Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*; STIM, *Stromal interacting molecules*.

Une augmentation du nombre de filaments d'actine accroît le nombre d'unités motrices qui peuvent être impliquées dans le glissement des filaments de myosines sur les filaments d'actine, renforçant alors les capacités contractiles des cellules musculaires lisses [160]. De plus, la formation de complexes adhésomes fonctionnels au niveau de la membrane plasmique de ces cellules permet la transmission de force entre le cytosquelette contractile et la matrice extracellulaire. Parallèlement, l'élongation des filaments existants augmente également la force de traction pouvant être déployée par les interactions entre les filaments d'actine et de myosine. L'ensemble de ces mécanismes intracellulaires est donc requis pour le déploiement optimal de force par le muscle lisse des voies aériennes et aboutir à son raccourcissement.

La relaxation du muscle lisse des voies aériennes

La relaxation du muscle lisse des voies aériennes est également un processus actif. Les différents mécanismes intracellulaires qui permettent au muscle lisse de se relaxer ont fortement été étudiés dans les dernières années, notamment afin de développer de nouvelles molécules bronchorelaxantes dans le traitement de l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme [1]. Bien que les mécanismes impliqués dans la relaxation diffèrent selon l'agoniste relaxant, les voies activées interfèrent ultimement avec les processus intracellulaires de la contraction, tels que l'activation des chaînes de myosine et la polymérisation d'actine.

Les voies de signalisations les mieux décrites dans la relaxation du muscle lisse sont celles en aval des RCPG couplés aux protéines $G_{\alpha s}$. L'activation de ces récepteurs entraîne la synthèse d'AMP cyclique (AMPc) grâce à l'hydrolyse d'ATP par les protéines membranaires *adenylate cyclases* (AC) [161]. Une fois synthétisée, les cibles moléculaires de l'AMPc sont multiples, mais sa cible principale est la protéine kinase A (PKA ou *cAMP-dependent protein kinase*) [162]. Les mécanismes moléculaires par lesquels la PKA relaxe le muscle lisse sont ici aussi très nombreux, et ont récemment été décrits dans un article de synthèse (Figure 1.8) [163]. Brièvement, la PKA interfère à différents nœuds des voies de signalisations menant à la contraction tels qu'au niveau de la sous-unité α de la protéine $G_{\alpha q}$ des RCPG, de la PLC, de l'IP3R, de la MLCK, de la MLCP et des canaux potassiques sensible au Ca^{2+} [163]. Plus récemment, la PKA a été décrite comme étant impliquée dans l'inhibition de la protéine *heat shock protein 20* (HSP20) qui semble être directement en cause dans la polymérisation des filaments d'actine [164]. Plus spécifiquement, la PKA semble phosphoryler HSP20 [164, 165]. Une fois phosphorylée, HSP20 pourrait être impliquée dans la déphosphorylation de la cofiline, activant ainsi son rôle dans le clivage des filaments d'actine polymérisés [165]. Le clivage des filaments d'actine engendre ainsi une diminution de la contraction, entre autres par une diminution des structures mises en place au niveau des points d'adhésion focaux [164-166]. Les mécanismes sous-jacents sont toujours mal compris, mais il semblerait que la forme phosphorylée de HSP20 pourrait entrer en compétition avec la cofiline dans l'interaction avec la protéine d'échafaudage 14-3-3 [165]. La dissociation entre la cofiline phosphorylée et la protéine 14-3-3 par la phospho-HSP20 rendrait alors la cofiline vulnérable à sa déphosphorylation par différentes phosphatases. Certains auteurs émettent l'hypothèse que la protéine HSP20 pourrait diminuer la contraction en diminuant les interactions entre les filaments d'actine et les filaments de

myosine [164]. Une autre cible activée par la production d'AMPc est la protéine Epac (*exchange proteins directly activated by cAMP*), décrite pour inhiber la phosphorylation de la chaîne légère de myosine et l'activité de la protéine RhoA GTPase [167]. Il faut noter que l'AMPc peut également sortir de la cellule et induire la contraction en agissant sur le récepteur à l'adénosine A₁ suivant sa conversion en adénosine par les ecto-5'-nucléotidases [168]. Cette boucle extracellulaire pourrait être un mécanisme commun qui atténue l'effet des bronchodilatateurs, et représenterait une cible potentielle afin d'augmenter leur activité bronchorelaxante.

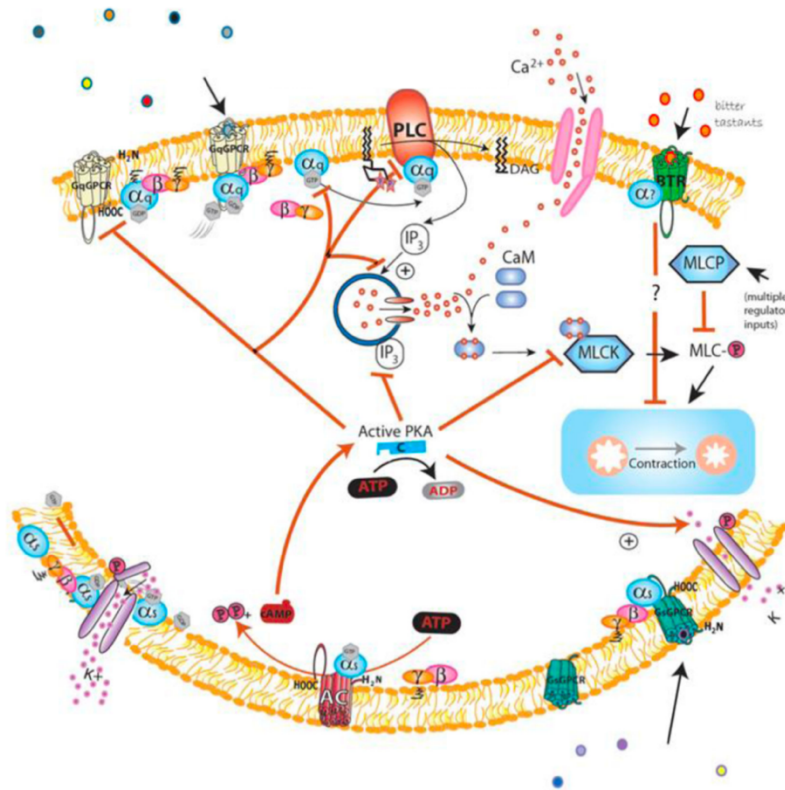


Figure 1.8 : Voies de signalisations intracellulaires qui gouvernent la relaxation des cellules musculaires lisses par la PKA. Activation des différentes protéines qui interviennent suite à la signalisation par les récepteurs β₂-adrénergiques. PKA, protéine kinase A ; PLC, phospholipase C ; DAG, diacylglycerol ; CaM, calmoduline ; AC, adénylate cyclase ; GTP, guanosine triphosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; cAMP, adénosine monophosphate cyclique ; PDE, phosphodiésterase ; IP₃, inositol-3-phosphate ; MLCK, *myosin light chain kinase* ; *HSP20*, *heat shock protein 20*. D'après Pera T. & Penn RB., *pharmacol ther*, 2016.

Malgré l'efficacité démontrée de l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques dans la relaxation du muscle lisse des voies aériennes, leur activation ne peut pas s'effectuer de façon continue compte tenu d'un phénomène de désensibilisation [129]. En effet, lorsque ces récepteurs sont stimulés par leurs ligands, ils deviennent rapidement découplés de l'adénylate cyclase, et sont phosphorylés par les *GPCR receptor kinase* (GRK). Une fois phosphorylés, les portions cytoplasmiques des récepteurs interagissent avec la β -arrestine et sont ensuite internalisés dans des endosomes [129, 169, 170]. Les récepteurs sont par la suite dégradés ou recyclés, et retournent à la membrane plasmique. Ainsi, une prise régulière d'agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques mène à une régulation négative de ces récepteurs et ainsi à une diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules musculaires [171]. Cette diminution entraîne le besoin d'augmentation des doses de bronchodilatateurs avec l'évolution de la pathologie.

La resensibilisation du récepteur (par sa déphosphorylation et/ou son recyclage vers la membrane plasmique suivant son internalisation) semble être altérée dans les cellules musculaires lisses provenant de patients décédés dû à l'asthme [172]. Plus précisément, la diminution de l'activité de l'AC, ainsi que la diminution de la production d'AMPc en réponse à un β_2 -agoniste dans les cellules musculaires lisses de patients asthmatiques, ont été associées avec une augmentation de la forme phosphorylée du récepteur à la membrane plasmique, ainsi qu'à une accumulation du récepteur phosphorylé dans les endosomes [172]. Il semblerait que ce problème découle d'une diminution de la déphosphorylation du récepteur [172]. Les auteurs ont démontré que l'activité de la $PI3K\gamma$ est augmentée dans les endosomes de cellules asthmatiques et que l'activité de la *protein phosphatase 2 type A* (PP2A) est diminuée à la fois dans les endosomes, et à la membrane plasmique. Les auteurs suggèrent que la $PI3K\gamma$ activerait la protéine I2-PP2A (*inhibitor 2 of PP2A*), prévenant ainsi l'activation de PP2A et par conséquent la déphosphorylation du récepteur nécessaire à sa resensibilisation [172].

D'autres enzymes, appelées phosphodiésterases (PDE), sont impliquées dans la régulation des concentrations intracellulaire d'AMPc et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Les cellules de muscle lisse des voies aériennes expriment 18 des 24 gènes qui codent pour les PDE. Les plus fortement exprimés sont la PDE4A, la PDE1A et la PDE8A [173]. Ainsi, l'inhibition des PDE représente également une avenue thérapeutique intéressante dans la recherche de molécules bronchorelaxantes dans l'asthme.

Certaines protéines semblent également requises pour une relaxation optimale du muscle lisse des voies aériennes. Par exemple, la récupération spontanée d'une bronchoconstriction induite par la MCh *in vivo* est atténuée chez les souris déficientes en gelsolin [174]. Des trachées précontractées avec de la MCh provenant de ces souris répondent également moins à l'isoprotérénol et à la chloroquine. Il semblerait que la gelsolin soit impliquée dans la dépolymérisation de l'actine, ainsi que dans la séquestration du PIP2. Un défaut au niveau du remodelage de l'actine, ainsi que des augmentations de la formation d'IP3 et de la mobilisation cytoplasmique du calcium, semblerait donc à l'origine d'une déficience de relaxation du muscle lisse des voies aériennes chez les souris déficientes en gelsolin [174].

Hormis les agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques, d'autres molécules possèdent des effets bronchorelaxants tels que des gaz comme le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Ces médiateurs provoquent la relaxation en stimulant la synthèse de GMPc par l'activation des formes solubles des *guanylyl cyclases* (GC) [175]. Il semblerait que ces molécules opèrent également grâce à d'autres mécanismes indépendants du GMPc [175].

La découverte de la présence de récepteurs de type « *bitter taste receptor* » (TAS2Rs) sur les cellules musculaires lisses dans la dernière décennie a ouvert une nouvelle avenue dans la recherche de molécules bronchorelaxantes [176]. Ces récepteurs de type RCPG ont été décrits pour relaxer le muscle lisse grâce à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, impliquant les canaux potassiques BK_{Ca} [176, 177]. En plus des canaux potassiques BK_{Ca} activés par les TAS2Rs, l'activation des canaux potassiques Kv7 est aussi largement décrite dans la littérature comme étant liée au phénomène de relaxation du muscle lisse bronchique [178-180]. Ainsi, l'utilisation de modulateurs d'activation des canaux responsables des différents flux ioniques au sein des cellules musculaires lisses fait également partie des nouvelles avenues de recherche de molécules bronchorelaxantes [178].

Différemment de la relaxation provoquée par diverses molécules extracellulaires, la relaxation induite par le stress mécanique et la déformation du tissu, ainsi que les protéines impliquées dans ces phénomènes ont aussi été étudiées. L'action dépolymérisante de la cofiline sur les filaments d'actine a été décrite pour être requise dans le déclin optimal de contractilité suivant un stress mécanique [159]. Des cellules musculaires lisses bronchiques

déficientes en cofiline démontrent une diminution plus faible de contractilité en réponse à un étirement transitoire simulant une inspiration profonde [159]. De façon intéressante, l'activation de la cofiline suivant un étirement ne semble pas se produire lors de l'élongation, mais plutôt lors de la rétraction [159]. Les changements de contractilité provoqués par l'étirement sont cohérents avec le remodelage de l'actine : *c.-à-d.*, les filaments d'actine des cellules déficientes en cofiline demeurent largement intacts suivant l'étirement, contrairement aux filaments de cellules normales qui se dégradent rapidement. Ainsi la fluidisation du cytosquelette d'actine par la cofiline pourrait être un mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet bronchodilatateur d'une inspiration profonde tel que décrit plus haut dans la partie traitant de l'hyperréactivité bronchique. Les auteurs ont également démontré que le taux de récupération de la contractilité suivant l'étirement, ainsi que le taux de remodelage de l'actine sont réduits en absence de cofiline. Ces résultats suggèrent encore une fois un rôle actif de cette protéine dans la réorganisation des filaments d'actine en plus de son rôle dans la dépolymérisation [159].

Il a également été démontré qu'une autre protéine intracellulaire était impliquée dans la récupération du muscle lisse suivant un étirement, la zyxine [181]. La zyxine est recrutée dans des régions localisées où les fibres de stress ont été fragmentées lors de l'étirement [181]. Son recrutement précède la filamentogénèse d'actine et semble orienter la réparation du cytosquelette. Cette protéine faciliterait donc la récupération de la force contractile suivant un étirement transitoire dans des cellules isolées de muscle lisse des voies aériennes. De plus, cette protéine réduit également la cinétique de bronchodilatation induite par des oscillations mécaniques qui simulent la respiration dans des coupes de poumons [181]. Les auteurs ont également démontré une surexpression de cette protéine dans les cellules musculaires lisses bronchiques provenant de patients souffrant d'asthme fatal. Ainsi, une augmentation de l'expression de la zyxine offre une explication logique à la diminution de l'effet bronchodilatateur de l'inspiration profonde chez les patients asthmatiques. Finalement, d'autres études démontrent que les protéines ROCK et PKC seraient également impliquées dans la récupération de la force suivant des déformations oscillatoires [182].

La modulation de la contraction

En plus des voies de signalisation menant à la contraction et à la relaxation, différentes voies auxiliaires modulent la contractilité du muscle lisse des voies respiratoires. Ces voies auxiliaires sont activées par un grand nombre de molécules extracellulaires [112] que nous avons récemment détaillées dans un article de synthèse, et qui sera publié prochainement dans la revue des maladies respiratoires (Annexe 8.3). Alors que certaines de ces voies auxiliaires signalisent pour rapidement interférer avec les voies canoniques de la contraction ou de la relaxation, d'autres affectent indirectement la contractilité en modulant l'expression de certains gènes. Ainsi, les effets des molécules extracellulaires qui modulent la contractilité du muscle lisse des voies aériennes s'effectuent à l'intérieur de différentes échelles de temps.

Un exemple typique d'une molécule qui module la contractilité du muscle lisse est celui de l'IL-13. Cette interleukine signale sur les cellules musculaires lisses grâce à la dimérisation de la chaîne α du récepteur de l'IL-4 et la chaîne $\alpha 1$ du récepteur de l'IL-13 [183]. Le rapprochement de ces deux chaînes suivant la signalisation par l'IL-13 permet la phosphorylation de leurs domaines cytoplasmiques par les protéines JAK1 (*Janus kinase*) et Tyk2 (tyrosine kinase), constitutivement associées à la portion juxtamembranaire de chacune de ces chaînes [184]. Les résidus de tyrosine ainsi phosphorylés recrutent alors les protéines *signal transduction and activator of transcription* (STAT6) qui sont ensuite activées et transloquées au noyau [184]. En plus de cette voie JAK-STAT, l'hypercontractilité induite par l'IL-13 requiert la voie PI3K-Akt, et plus spécifiquement la PI3K de classe I constituée de la sous-unité p110 δ [185]. Cependant, il semblerait que ces voies de signalisation n'interfèrent pas directement avec les voies canoniques de la contractilité.

L'effet amplificateur de l'IL-13 sur la contraction ainsi que son effet inhibiteur sur la relaxation se manifeste quelques heures suivant la stimulation. La signalisation par l'IL-13 semble donc affecter la contractilité en modulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la contraction. De façon intéressante, les gènes affectés par IL-13 ne sont pas ceux qui codent pour des protéines de l'appareil contractile tels que ceux de l' α -*smooth muscle actin* (α -SMA) ou de la myosine musculaire [186], mais plutôt ceux des protéines responsables de la transmission du signal du récepteur vers l'appareil contractile. Ainsi, l'IL-13 peut altérer la contractilité en : 1- amplifiant la mobilisation de calcium en réponse aux

bronchoconstricteurs [186-193]; 2- sensibilisant au calcium par l'augmentation de l'expression des protéines RhoA et ROCK2 [194, 195] provoquée par une diminution du micro ARN régulateur miR-133a [195, 196]; 3- potentialisant la signalisation calcique des RCPG suivant leur internalisation en augmentant l'expression de la cavéoline-1 et la cavéoline-2 [189]; 4- augmentant l'activité et l'expression de PDE4 par un mécanisme dépendant des sous-unités $\beta\gamma$ des RCPG [197]; 5- stimulant la sécrétion d'IL-5 suite à une augmentation de son ARN messager, qui, par une boucle autocrine, augmente la contractilité [198]; et 6- surexprimant la 11 β -HSD2 (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase*) au niveau de l'épithélium afin de favoriser la conversion du cortisol en cortisone, inhibant ainsi l'effet bloquant des corticostéroïdes endogènes sur les changements proasthmatiques (c.-à-d., l'hypercontraction et l'hyporelaxation) induits par l'IL-13 [199].

L'augmentation de la mobilisation de Ca^{2+} en réponse aux bronchoconstricteurs suivant une exposition à l'IL-13 peut également être occasionnée par de multiples mécanismes tels que : 1- une augmentation de l'expression du CD38 [188]; 2- une potentialisation de l'entrée de calcium en favorisant l'agrégation de STIM1 [200]; 3- une augmentation de l'activité de SERCA2 [201]; et 4- une augmentation de la fréquence des oscillations calciques [202] par la PI3K γ [192]. Ainsi, de nombreux mécanismes moléculaires ont été proposés afin d'expliquer l'hypercontractilité induite par l'IL-13. Bien que moins étudiée, la complexité des mécanismes sous-jacents aux autres molécules extracellulaires qui modulent la contractilité, tel que le *tumor necrosis factor α* (TNF α), l'IL-17 ou le *transforming growth factor β* (TGF β) pourrait être équivalente [203].

Sur une échelle de temps beaucoup plus courte, parallèlement à l'augmentation de la phosphorylation des MLC₂₀ musculaires, l'activation des sous-unités G α_q provoque également l'activation de certaines protéines Rho [153]. Ces petites protéines monomériques de la superfamille des Ras possèdent une activité GTPasique. Le rôle de RhoA est le mieux caractérisé dans la contraction du muscle lisse des voies aériennes [145]. Une fois activée, RhoA phosphoryle la protéine ROCK qui phosphoryle à son tour la sous-unité MYPT1 de la MLCP, soit directement, soit par l'entremise de la protéine CPI-17 [204]. Ainsi, lorsque la voie ROCK est activée, la protéine MLCP est inhibée. Suite à cette inhibition, la concentration en calcium cytoplasmique nécessaire à l'induction d'une contraction maximale est fortement diminuée [205]. Ce phénomène nommé sensibilisation au calcium pourrait être impliqué dans l'hypersensibilité et dans l'augmentation de la contraction du muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme [130, 206]. De plus, il a été

démonstré que le niveau d'activation de la protéine ROCK, ainsi que le niveau de phosphorylation de MYPT1 sont augmentés dans les cellules musculaires lisses bronchiques provenant de patients asthmatiques [203, 207]. En 2014, une étude a démontré que la protéine IQGAP1 joue le rôle de frein dans la contraction musculaire en diminuant l'activité de la protéine RhoA grâce à son interaction avec la protéine p190A-RhoGAP (*GTPase-activating protein*) [208]. Ainsi, une perte d'inhibition de RhoA par le complexe IQGAP1-p190A-RhoGAP pourrait contribuer à une potentialisation de la force générée par le muscle lisse des voies aériennes.

Bien que fortement étudié à différentes reprises, le rôle de la protéine ROCK dans la régulation de la phosphorylation de la MLC₂₀ dans le muscle lisse des voies respiratoires a récemment été remis en question [150]. Les auteurs démontrent que l'inhibition de la protéine ROCK ne diminue pas le niveau de phosphorylation de la MLC₂₀ en réponse à une stimulation par l'acétylcholine [150]. Les auteurs démontrent également que l'inhibition de la protéine ROCK n'affecte ni la phosphorylation de la NMII, ni le recrutement du complexe taline-paxilline-vinculine à la membrane plasmique, ni la polymérisation de la NMII en filaments et ni son interaction avec le cytosquelette [150]. En revanche, il semblerait que l'activation de la protéine ROCK soit requise pour l'activation de PAK, la phosphorylation de la paxilline et le recrutement du complexe GIT1/βPIX/PAK à la membrane plasmique. Ainsi, elle serait nécessaire à l'activation de la protéine membranaire CDC42, à l'activation des complexes N-WASp et ARP2/3, et donc requise pour l'augmentation de la polymérisation d'actine [150]. Enfin, une étude a démontré que la protéine ROCK semble jouer un rôle dans l'entretien des filaments de myosine. Effectivement, l'inhibition de ROCK par des inhibiteurs pharmacologiques diminue le nombre de filaments de myosines dans des cellules provenant de muscle lisse trachéal stimulé avec de l'acétylcholine [182].

La PI3K δ semble également être une protéine impliquée dans l'inhibition de la MLCP et dans l'activation de la MLC suivant l'activation des RCPG par leurs agonistes contractiles [207]. L'inhibition de la PI3K δ renverse la constriction induite par le carbachol, l'histamine et la bradykinine. Cet effet relaxant est associé à une diminution de la phosphorylation de MYPT1 et de la MLC₂₀. Bien que la cible moléculaire sur laquelle la PI3K δ est effective soit encore inconnue, l'inhibition de la PI3K δ n'affecte ni la mobilisation de calcium ni la production d'AMPc [207]. De plus, la dilatation induite par l'inhibition de la PI3K δ est insensible à la désensibilisation du récepteur β_2 -adrénergique ainsi qu'à un prétraitement

par l'IL-13. En revanche, cette voie de signalisation ne semble pas impliquée dans la contraction de tissus murins [192]. Il semblerait donc que le rôle de la PI3K δ dans la contraction soit différent en fonction des différentes espèces étudiées.

Finalement, différentes études génétiques telles que les GWAS ont également mis en évidence la variation d'expression de différents gènes dont certains SNP sont associés à l'asthme. C'est le cas du gène qui code pour la protéine orosomucoid-like 3 (ORMDL3), qui est une protéine du réticulum endoplasmique [209]. Les mécanismes sous-jacents par lesquels la surexpression de cette protéine augmente la contractilité musculaire ne sont pas encore complètement compris, mais elle semble impliquée dans l'augmentation de l'expression de SERCA2b et jouerait ainsi un rôle dans la mise en place d'oscillations calciques [209].

Tel qu'énuméré dans l'ensemble de cette partie, le nombre de molécules qui gouvernent la contraction du muscle lisse des voies aériennes est extrêmement élevé. De plus, comme décrit dans la dernière sous-partie qui porte sur la modulation, la contractilité du muscle lisse des voies aériennes peut être modifiée dans différentes échelles de temps, et par de nombreux mécanismes.

Durant cette thèse, la majeure partie de mes travaux se sont portés sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent le gain de force du muscle lisse. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux changements de contractilité qui interviennent suite à une période de tonus. Ces changements extrêmement labiles peuvent être renversés en quelques minutes suivant la suppression du tonus. Ainsi, nous avons porté nos recherches sur les mécanismes qui affectent la contractilité du muscle lisse des voies aériennes sur une échelle de temps rapide. Nous avons donc priorisé nos travaux sur les événements qui contrôlent le niveau d'activation de la MLC₂₀ ou la filamentogénèse des filaments d'actine.

La mesure de la fonction respiratoire

Durant ce doctorat, élucider comment le gain de force du muscle lisse des voies aériennes pouvait affecter la mécanique respiratoire chez l'humain était une question majeure. Afin de pouvoir interpréter les résultats que nous avons obtenus au cours des études réalisées, comprendre comment les techniques fonctionnent, et à quoi correspondent les paramètres mesurés s'est avéré nécessaire.

La fonction principale de la respiration est d'assurer les échanges gazeux qui ont lieu entre le système circulatoire et l'environnement extérieur. Les poumons humains sont composés de plus de 23 générations de bronches dichotomisées entre la trachée et les bronchioles terminales qui aboutissent à 14 millions de conduits alvéolaires et plus de 300 millions d'alvéoles [210]. Ce sont ces alvéoles qui assurent le transfert du dioxygène et du dioxyde de carbone entre l'air et le sang [210]. Afin que les échanges gazeux puissent se produire, les alvéoles doivent être bien ventilées, mais également bien perfusées. La ventilation (V) est dépendante du flux d'air qui entre dans les alvéoles, tandis que la perfusion (Q) est dépendante du flux sanguin présent dans les capillaires pulmonaires. En clinique, lorsqu'on mesure la capacité d'un poumon à réaliser correctement des échanges gazeux entre l'environnement et le flux sanguin, on parle du ratio ventilation sur perfusion V/Q . Les alvéoles adjacentes sont séparées les unes des autres par des septa, et interconnectées par de micropores appelés pores de Kohn [211]. Ces pores permettent la création de flux d'airs collatéraux nécessaires à l'équilibration des pressions alvéolaires [211]. Finalement, l'ouverture et la fermeture des alvéoles sont également contrôlées par des projections du muscle lisse des voies aériennes en plus des changements de pressions transpulmonaires.

Dans l'asthme, l'augmentation de la résistance à l'écoulement de l'air provoqué par l'obstruction bronchique mène à : 1- Une augmentation des efforts respiratoires ; 2- un emprisonnement d'air au sein des voies respiratoires et une hyperinflation pulmonaire ; 3- une hétérogénéité de la ventilation et 4- un dérèglement du ratio V/Q conduisant à une altération des pressions gazeuses dans le sang [212]. Pouvoir quantifier le niveau d'obstruction bronchique est donc nécessaire afin de connaître la sévérité de l'asthme et pour observer l'efficacité de certains traitements tels que l'inhalation de LABA ou de CSI.

La spirométrie est la méthode de référence couramment utilisée chez l'humain pour évaluer les fonctions respiratoires [213]. Les pathologies obstructives telles que l'asthme ou la

maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) sont caractérisés par une baisse du VEMS causée par une diminution du flux d'air maximal durant une expiration forcée [214]. Différemment, les pathologies restrictives telles que la fibrose pulmonaire provoquent des baisses du VEMS et de la CVF causées par des limitations inspiratoires [215]. En revanche, les mesures de l'obstruction bronchique réalisées par spirométrie ne corrèlent pas tout le temps correctement avec les symptômes de la pathologie. Une forte obstruction bronchique peut être présente chez des enfants et des adultes asymptomatiques [216]. Aussi, certaines personnes ressentent mal les symptômes de l'obstruction bronchique et sont catégorisées comme « *low perceiver* » [217]. De plus, la fiabilité des mesures réalisées en spirométrie est fortement dépendante de l'utilisateur et requiert une grande coopération de la part du patient. Ainsi, dans le but de rendre les mesures de spirométries comparables entre les différents centres hospitaliers et à travers le monde, des lignes de conduite ont été mises en place par les sociétés mondiales qui étudient la fonction respiratoire telles que l'*American Thoracic Society* (ATS), l'*European Respiratory Society* (ERS) ou encore le consortium du *Global Initiative for Asthma* (GINA) [218].

Une évaluation plus détaillée de l'obstruction bronchique chez l'humain est possible grâce aux mesures de résistance des voies aériennes (R_{aw}) ou de résistance du système respiratoire (R_{rs}). Ces mesures sont obtenues grâce à l'utilisation de la pléthysmographie ou de la technique des oscillations forcées, respectivement. De plus, des mesures similaires réalisées chez des petits animaux tels que des rongeurs sont possibles lors de la réalisation d'études fondamentales en laboratoire.

Mesure de la résistance des voies aériennes par pléthysmographie

La résistance des voies aériennes telle que décrite par la loi d'Ohm, est définie par les différences de pressions entre l'atmosphère et les alvéoles divisé par le flux soit :

$$R_{aw} = \frac{P_{atm} - P_{alv}}{\dot{V}} = \frac{\Delta P}{\dot{V}}$$

Ou P_{atm} = pression atmosphérique, P_{alv} = pression alvéolaire et \dot{V} = flux [212]. La résistance totale des voies aériennes correspond à la somme des résistances de l'ensemble des voies aériennes connectées les unes aux autres en série. Cependant, la résistance des voies aériennes mesurée est majoritairement gouvernée par les bronches entre les générations 2 et 10, et n'est que très faiblement influencée par les voies aériennes en dessous de la 13^e génération [219].

Les lois de Hagen-Poiseuille et Hagen-Poiseuille modifiée définissent les facteurs qui influencent la résistance des voies aériennes lorsque le flux d'air est laminaire ou turbulent, respectivement (Figure 1.9). Ces lois illustrent bien l'importance du calibre des voies aériennes dans la mesure de la résistance. On observe dans ces formules que le rayon des voies aériennes est au dénominateur, élevé à la puissance 4. Ainsi, une diminution de moitié du calibre bronchique multipliera par 16 la résistance des voies aériennes.

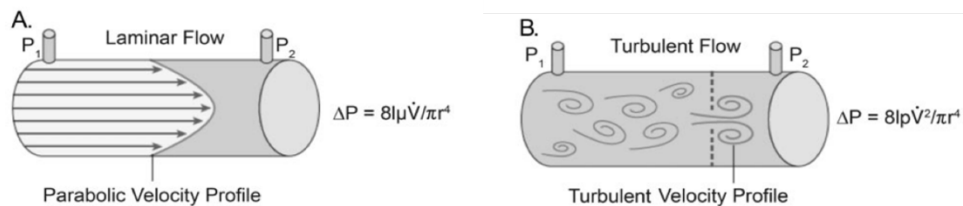


Figure 1.9 : Illustration des différents types de flux gazeux à travers un tube rigide. A

– Illustration d'un flux laminaire où les différences de pressions sont dépendantes des caractéristiques du tube et du gaz selon la loi de Poiseuille. l = longueur du tube, μ = viscosité du gaz, et r = rayon du tube. B – Illustration d'un flux turbulent où les différences de pression sont mesurées par la loi de Poiseuille modifiée. ρ = densité du gaz. D'après Bossé Y. et al, *Annu Rev Physiol*, 2010 [212].

Chez l'humain, le flux d'air est en partie laminaire et en partie turbulent, résultant d'une relation complexe entre le flux, la composition du gaz et la géométrie des voies respiratoires. Afin de mesurer la résistance des voies aériennes décrite par la loi d'Ohm, le flux et la pression alvéolaire doivent être quantifiés. Si le flux est facilement mesurable, la pression alvéolaire peut sembler difficile à obtenir. En 1956, Dubois réalise que dans des conditions où le flux est nul, la pression mesurée à la bouche est la même que la pression alvéolaire [220]. Ainsi, lorsqu'on réalise des mesures de pléthysmographie, le sujet est placé dans une boîte étanche et respire à travers un tube mesurant le flux et le volume d'air grâce à la présence d'un pneumotachographe. L'intérieur de la boîte est doté d'un transducteur de pression afin de mesurer les variations de pressions entre l'intérieur et l'extérieur de la chambre. Enfin, le dernier composant nécessaire à la mesure de la résistance par pléthysmographie est l'utilisation d'un obturateur proche du pneumotachographe afin de bloquer le flux d'air.

Lorsque le sujet respire, le flux d'air à la bouche (\dot{V}) et les changements de volume sont mesurés. Les changements de volumes qui interviennent durant une inspiration sont provoqués par : 1- une contraction du diaphragme et des muscles intercostaux ; 2- une diminution de la pression pleurale ; 3- une augmentation de la pression transpulmonaire ; 4- une expansion des poumons et 5- une diminution de la pression alvéolaire qui provoque l'entrée d'air dans les poumons. Ainsi, lors des manœuvres de pléthysmographie, les volumes pulmonaires sont mesurables grâce à la loi de Boyle-Mariotte selon laquelle :

$$P_1V_1 = P_2V_2.$$

Grâce à l'utilisation de l'obturateur et du postulat selon lequel la pression mesurée à la bouche lorsque le flux est nul correspond à la pression alvéolaire, les volumes de gaz thoraciques (VGT) et la résistance spécifique des voies aériennes (sRaw) peuvent être mesurés. La mesure de sRaw tient compte des volumes de gaz thoraciques, qui peuvent varier en fonction des différentes conditions expérimentales [221]. Ainsi, afin d'avoir une mesure de la résistance des voies aériennes (Raw), il faut diviser sRaw par VGT, et donc :

$$Raw = \frac{sRaw}{VGT}$$

La conductance des voies aériennes (G_{aw}) peut également être utilisée comme indice de l'obstruction bronchique. Elle correspond à l'inverse de la résistance spécifique des voies aériennes :

$$G_{aw} = \frac{1}{R_{aw}}$$

Les indices G_{aw} et R_{aw} représentent des mesures très sensibles de l'obstruction des voies respiratoires. L'importance de leurs utilisations en plus de la spirométrie a été démontrée dans la réalisation d'études cliniques pharmacologiques [222]. En revanche, les mesures de G_{aw} et R_{aw} présentent une forte variabilité et demandent donc de répéter les mesures un certain nombre de fois afin d'obtenir des résultats fiables [222]. De plus, aucune ligne de conduite ni aucune valeur seuil n'ont été clairement déterminées pour ces mesures afin d'évaluer et de comparer l'obstruction bronchique entre les sujets [223].

Lorsque les mesures sont réalisées avec des patients qui démontrent de l'obstruction bronchique tels que les asthmatiques, le postulat selon lequel la pression alvéolaire peut être estimée à partir de la pression mesurée à la bouche lorsque le flux est nul peut être faux [224]. De plus, étant donné l'augmentation de l'hétérogénéité pulmonaire et la présence de remodelage bronchique chez ces patients, les volumes thoraciques peuvent également être surestimés [224]. Aussi, le calibre des voies respiratoires est fortement diminué en fonction de la profondeur de l'arbre bronchique dans laquelle on se situe. C'est pourquoi des changements du diamètre des voies principales vont fortement affecter les mesures de sR_{aw} , tandis que des changements au niveau des voies périphériques seront quasiment imperceptibles [225]. Malgré la précision de cette technique, des changements au niveau de l'obstruction périphérique, obstruction très fréquente dans des pathologies telles que l'asthme, seront très difficile à observer [83, 84]. De plus, la mesure de sR_{aw} par pléthysmographie demande l'utilisation d'équipements encombrants et très coûteux, ce qui rend l'accès à cette technique contraignant et difficile.

Mesure de la résistance par la technique des oscillations forcées

Contrairement à la technique de la pléthysmographie, la technique des oscillations forcées permet d'obtenir une mesure de la résistance du système respiratoire, qui tient compte du tissu pulmonaire et du thorax en plus des voies aériennes. L'utilisation de cette technique a été décrite pour la première fois en 1956 par Arthur Dubois [226]. Le concept de la technique des oscillations forcées repose sur la mesure de l'impédance du système respiratoire, Z_{rs} . En mécanique respiratoire, l'impédance permet de décrire et d'expliquer les changements dynamiques de pression en lien avec les des changements de volume ou de flux [227]. Elle est définie par :

$$Z_{rs} = \frac{\Delta P}{\Delta \dot{V}}$$

Ou ΔP correspond au changement de pression et $\Delta \dot{V}$ au changement de flux. Lors de la mesure de l'impédance du système respiratoire chez l'humain, la grande majorité des appareils mesurent l'impédance d'entrée (*input impedance*). Cela signifie que les changements de volume qui sont appliqués au système respiratoire et les changements de pression et de flux qui en résultent sont mesurés simultanément au même endroit, à la bouche du sujet. Un autre paramètre qui varie en fonction des différents appareils de mesure utilisés, correspond à la nature des oscillations appliquées au système respiratoire. Les premières applications développées consistaient à appliquer différentes fréquences lors de mesures successives [227]. Les nouvelles applications permettent d'utiliser des perturbations provoquées par des signaux composites (composés de différentes fréquences). Grâce à l'utilisation d'une équation mathématique complexe, la transformation de Fourier, le signal obtenu est décomposé en fonction des différentes fréquences qui le constitue. Cependant, afin de ne pas confondre les perturbations provoquées par la respiration et les perturbations provoquées par les oscillations générées par l'appareil, seules des mesures avec des fréquences oscillatoires supérieures à 5 Hz sont principalement réalisées. L'appareil que nous possédons dans notre laboratoire, le tremoFlo, permet d'obtenir des mesures d'impédance pour des fréquences entre 5 et 37 Hz.

La mesure de l'impédance du système respiratoire, tel que décrit plus haut, repose sur des mesures de pression et de flux suite à une perturbation du système respiratoire. En mécanique Newtonienne, la dérivée d'une trajectoire correspond à la vitesse, et la dérivée de la vitesse correspond à l'accélération. Respectivement, en mécanique respiratoire la

dérivée d'un volume d'air correspond au flux d'air, et la dérivée du flux correspond à l'accélération de la colonne d'air. Ainsi, si on se réfère à l'équation du modèle à un compartiment du mouvement d'air, alors :

$$P = EV + R\dot{V} + I\ddot{V}$$

Où P correspond à la pression, E à l'élastance, R à la résistance, I à l'inertance, et V, \dot{V} et \ddot{V} au volume d'air, au flux et à l'accélération, respectivement. Grâce à la transformation de Fourier sur le domaine du temps de la dérivée et de l'intégrale de l'équation du flux d'air (\dot{V}), et suite à la simplification des équations, la formule la plus simple de l'impédance du système respiratoire correspond à :

$$Z_{rs}(\omega) = R_{rs}(\omega) + iX_{rs}(\omega)$$

Où R_{rs} correspond à la résistance du système respiratoire, X_{rs} correspond à la réactance du système respiratoire ω à la fréquence angulaire (c.-à-d., $2\pi f$).

D'un point de vue physiologique, la résistance du système respiratoire (R_{rs}) est la partie réelle de l'impédance mesurée, elle correspond à l'énergie dissipée par le système respiratoire suite à la perturbation [227]. La réactance du système respiratoire (X_{rs}) correspond à la partie imaginaire de l'impédance, elle représente l'énergie emmagasinée par le système respiratoire [227]. La réactance est composée de deux paramètres qui sont l'élastance et l'inertance. En revanche, l'inertance du système respiratoire est négligeable lorsqu'elle est mesurée à de basses fréquences, inférieures à la fréquence de résonance [225]. La fréquence de résonance correspond à la fréquence à laquelle la réactance est nulle, lorsque l'impédance du système respiratoire ne dépend que de la résistance. Lorsqu'on représente l'impédance du système respiratoire de façon graphique, en fonction de la fréquence des oscillations générées par l'appareil, on produit deux courbes. Les deux courbes correspondent à la partie réelle et la partie imaginaire, soit la résistance et la réactance du système respiratoire, respectivement (Figure 1.10.A). Ainsi, la fréquence à laquelle la courbe de la réactance coupe l'axe des abscisses correspond à la fréquence de résonance. Enfin, l'aire mesurée entre la courbe de la réactance et l'axe des abscisses jusqu'à la fréquence de résonance correspond à AX.

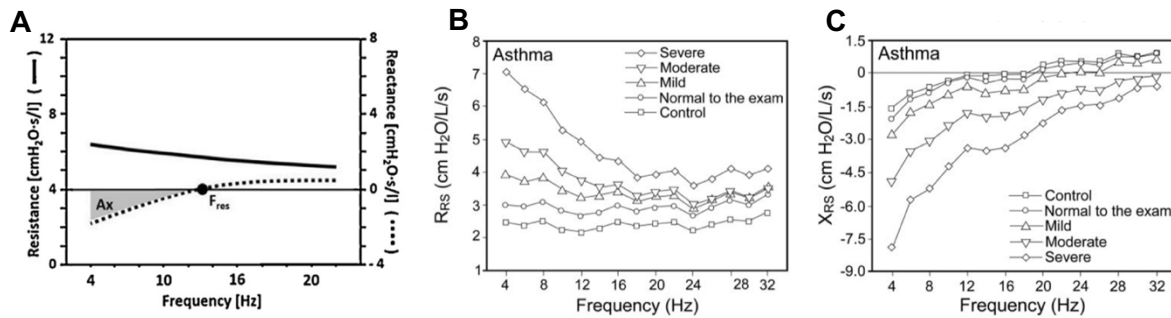


Figure 1.10 : L'impédance du système respiratoire. A – L'impédance du système respiratoire représentée schématiquement. La ligne continue représente la résistance du système respiratoire en fonction de la fréquence et la ligne pointillée représente la réactance du système respiratoire en fonction de la fréquence. B – Mesure de la résistance du système respiratoire chez différents groupes de sujets asthmatiques. C – Mesure de la réactance du système respiratoire chez différents groupes de sujets asthmatiques. D'après Kaminsky DA., Respir Care, 2012

Lorsqu'on mesure le niveau d'obstruction bronchique chez des patients asthmatiques, la résistance du système respiratoire mesurée en réponse à des oscillations à des fréquences proches de 5 Hz (R_{rs5}), est augmentée par rapport à des sujets sains. Cette augmentation de R_{rs5} témoigne d'une augmentation de la résistance de l'ensemble du système respiratoire (Figure 1.10.B). Lorsqu'on mesure la résistance du système respiratoire en fonction de la fréquence des oscillations chez des sujets sains, on observe de très faibles variations (Figure 1.10.B). Au contraire, chez les personnes qui présentent une obstruction bronchique tel que les patients asthmatiques, on observe une dépendance de la mesure de la résistance en fonction de la fréquence. Ces changements mesurés par la différence entre la résistance du système respiratoire à 5 Hz et la résistance du système respiratoire à 19 Hz (R_{rs5-19}), témoignent d'une augmentation de l'hétérogénéité pulmonaire chez ces sujets [225].

Contrairement à la résistance du système respiratoire, la réactance du système respiratoire est fortement dépendante de la fréquence des perturbations autant chez les sujets sains que chez les sujets asthmatiques (Figure 1.10.C). Cependant, plus l'hétérogénéité pulmonaire est élevée, plus la réactance du système respiratoire est négative [228]. Ainsi, plus la sévérité de l'asthme augmente, plus la courbe de la réactance est déplacée vers le bas. Plus la réactance est basse, plus la fréquence de résonance est déplacée vers la droite et donc plus l'aire sous la courbe mesurée entre l'axe des abscisses, la courbe de la

réactance et la fréquence de résonnance augmente (Figure 1.10.C). Il a été démontré que la réactance est un indice extrêmement sensible à de faibles changements d'obstruction bronchique. Les changements de réactances en réponse à une bronchoconstriction seront perçus avant même les mesures de résistances [229]

Un des avantages majeurs de la technique des oscillations forcées dans la mesure de la mécanique respiratoire est le faible niveau de coopération requise de la part des sujets. Les sujets sont simplement assis sur une chaise, le corps droit, les mains sur les joues et respirent normalement à volume courant dans l'appareil. Ainsi, ce besoin minime de participation en fait un outil idéal de diagnostic en pédiatrie [228]. De plus, la mesure de la mécanique respiratoire à volume courant permet également de s'affranchir de la prise d'inspirations profondes telles que celles réalisées en spirométrie. D'une part, cela rend les mesures beaucoup plus faciles pour les personnes faisant preuve d'obstruction bronchique et les personnes âgées. D'autre part, l'absence d'inspiration profonde permet de s'affranchir de l'effet bronchodilatateur provoqué par ces excursions de volumes [230]. Enfin, l'un des nombreux avantages de la technique des oscillations forcées est la rapidité de la prise de mesure et la résolution temporelle des appareils. Avec une mesure réalisée toutes les 0.5 secondes, cette technique permet de suivre la cinétique du changement de l'obstruction bronchique en réponse à l'inhalation de bronchoconstricteurs. Ces mesures permettent également de mettre en évidence des différences entre les valeurs durant l'inspiration et les valeurs durant l'expiration. En effet, durant la respiration les valeurs de résistance et de réactance changent en fonction du volume et du flux d'air dans les voies respiratoires [231]. Différentes études ont permis de mettre en évidence des limitations de flux expiratoire chez les patients MPOC [232, 233].

Ainsi, l'utilisation de la technique des oscillations forcées représente un outil de choix dans l'étude de la mécanique respiratoire chez l'humain, autant chez l'adulte que chez l'enfant. De plus en plus d'études tentent désormais de définir des valeurs de références et des lignes de conduite afin de pouvoir répéter et comparer les mesures entre différents centres et différents hôpitaux [234, 235]. Dans le cadre de nos recherches, l'utilisation de cet appareil afin de mesurer la mécanique respiratoire chez l'humain était un choix judicieux. Il permet de s'affranchir de la prise d'inspiration profonde et nous permet donc de conserver le tonus du muscle lisse des voies aériennes. De plus, la prise de mesure rapide durant la respiration normale nous permet également de monitorer l'évolution de la bronchoconstriction en réponse à l'inhalation de différentes doses de MCh.

La mesure de la fonction respiratoire dans les modèles animaux

Les études fondamentales réalisées par la grande majorité des équipes de recherches sont effectuées sur le petit animal le plus répandu en laboratoire : la souris. Les souris et les rongeurs possèdent beaucoup d'avantages, notamment en ce qui concerne la taille, le temps de reproduction, le prix, ou encore en termes de modifications génétiques qu'il est possible de réaliser sur ces animaux. En revanche, lorsqu'il s'agit de mesurer la fonction respiratoire de façon robuste chez les rongeurs, le défi est de taille. Tout d'abord, d'un point de vue anatomique, la structure d'un poumon de souris diffère fortement de la structure d'un poumon humain. La capacité pulmonaire totale d'un poumon de souris est d'environ 1 ml tandis que la capacité pulmonaire totale d'un poumon humain est d'environ 6 L, soit 6000 fois plus élevée [236]. Les poumons de souris possèdent moins de générations bronchiques que les poumons humains, et démontrent un motif de ramification monopodial tandis que le motif de ramification des bronches humaines est dichotomique [237]. Une autre différence majeure dans les bronches de souris est la finesse de l'épithélium bronchique, ainsi que la taille relative de la lumière bronchique par rapport à la taille de la bronche. Chez la souris, la taille de la lumière bronchique, toute proportion gardée, est plus importante que chez l'humain [237]. De plus, le nombre de cellules sécrétrices de mucus est beaucoup plus faible dans les épithéliums bronchiques de souris que dans les épithéliums bronchiques humains. Finalement, la vitesse de respiration des souris se situe entre 250 et 350 respirations par minutes, tandis que la vitesse de respiration chez l'humain se situe entre 12 et 18 respirations par minutes [238].

Ainsi, étudier et mesurer la fonction respiratoire chez la souris est un défi, en particulier lorsqu'on souhaite comparer ces mesures à celles réalisées chez l'humain. De plus, mesurer la fonction respiratoire chez la souris dans un environnement dit 'naturel' est presque impossible, essentiellement car demander à l'animal de réaliser des manœuvres respiratoires est infaisable. Aussi, les mesures de fonctions pulmonaires sont grandement affectées par la fréquence respiratoire. Si cette fréquence respiratoire n'est pas contrôlée, des changements de la réponse mesurées pourraient être provoqués par des changements des fonctions respiratoires, mais également par des changements de fréquence respiratoire [239]. Ainsi, la situation dans laquelle la mesure des fonctions respiratoires est effectuée chez les rongeurs est décrite par l'analogie au principe d'incertitude de Heisenberg en physique, selon lequel connaître précisément à la fois la position d'une particule et sa vitesse est impossible. Plus on augmente la précision de la mesure de la fonction

respiratoire, et moins l'animal se trouve dans des conditions physiologiques dites 'naturelles', et inversement, plus l'animal se trouve dans des conditions naturelles, et moins la mesure des fonctions respiratoires est précise [240].

Afin de mesurer la fonction respiratoire fidèlement chez la souris, l'expérimentateur a besoin de contrôler le plus grand nombre de paramètres possibles. L'utilisation du flexiVent représente l'étalon or dans la mesure des fonctions respiratoires chez le rongeur. Lors de l'utilisation de cette technique, l'animal est anesthésié, paralysé, trachéotomisé et ventilé mécaniquement. Ainsi, le patron de respiration de l'animal est entièrement contrôlé et les fonctions pulmonaires peuvent être mesurées de façon précise. Le flexiVent est un appareil qui utilise la technique des oscillations forcées tel que décrit plus haut dans cette partie. Ainsi, cet appareil peut mesurer l'impédance du système respiratoire à une ou plusieurs fréquences. Une fois mesurée, l'impédance du système respiratoire est alors estimée à l'aide d'un modèle mathématique. La relation qui existe entre l'impédance et les différentes propriétés mécaniques du poumon lors de la mesure à différentes fréquences par le flexiVent est décrite dans l'équation du "*constant phase model*" [241]:

$$Z_{in}(f) = R + i2\pi fI + \frac{G_t - iH_t}{(2\pi f)^\alpha}$$

où R correspond à la résistance Newtonienne, I à l'inertance, G_t à la résistance tissulaire et H_t à l'élastance tissulaire. D'un point de vue physiologique, la résistance newtonienne (R) permet d'obtenir une mesure correspondant à la résistance des voies aériennes supérieures, la résistance tissulaire (G_t) permet d'avoir une mesure correspondant à l'obstruction bronchique périphérique et des propriétés viscoélastiques des tissus, et l'élastance tissulaire (H_t) permet d'avoir une mesure correspondant à la rigidité et à l'hétérogénéité pulmonaire [242]. Cependant, malgré la grande précision de ces mesures, le flexiVent est une technique très invasive qui pour la plupart des protocoles mène à la mort de l'animal.

Lorsqu'on diminue le nombre de paramètres contrôlés durant l'expérimentation, la mesure de la fonction respiratoire est moins précise, mais aussi moins invasive. Parmi les techniques que nous utilisons dans notre laboratoire, la technique de la pléthysmographie à deux chambres permet de réaliser des études longitudinales chez les animaux tout en étant relativement précises [243]. Cette technique décrite par Pennock en 1979 s'appuie sur la mesure des différences de pressions qui ont lieu à l'intérieur de deux chambres

hermétiques [244]. L'animal est ici restreint de tout mouvement, le corps dans une chambre et le bout du museau dans l'autre. Ainsi, le délai de temps entre les variations de pressions des deux chambres permet de mesurer la résistance du flux d'air entre la bouche et les alvéoles de l'animal. Comme décrite lors des mesures de pléthysmographie chez l'humain, la résistance des voies aériennes est fortement dépendante des volumes de gaz thoraciques et de la fréquence respiratoire. Ici, connaître le volume d'air présent dans les poumons de l'animal durant les mesures est impossible. De plus, le volume pulmonaire de l'animal peut changer en fonction du niveau d'obstruction bronchique. Ainsi, l'utilisation de cet appareil permet d'obtenir différents indices de l'obstruction bronchique tels que la résistance spécifique des voies aériennes ($sRaw$), le flux expiratoire à 50% de l'expiration (EF50), la fréquence respiratoire (f) ou encore les mesures des temps inspiratoires et expiratoires [243].

L'utilisation du flexiVent et de la pléthysmographie à double chambre sont donc des outils nécessaires lorsqu'on souhaite évaluer l'effet de différents allergènes ou irritants sur les fonctions respiratoires [245]. L'utilisation du flexiVent étant plus précise mais terminale, la pléthysmographie à double chambre s'avère intéressante lorsqu'on souhaite mesurer le niveau d'obstruction bronchique en réponse à l'aérosolisation de MCh à un instant t [246], ou à différents jours au cours d'un protocole [79].

Lors des études du gain de force du muscle lisse des voies aériennes chez la souris, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inflammation sur le phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes. Afin de quantifier précisément ces effets, nous avons privilégié des mesures de la mécanique du système respiratoire et nous avons utilisé le flexiVent.

Chapitre I : Problématique, hypothèses et objectifs

L'asthme est une pathologie complexe caractérisée par de nombreux phénotypes tels que décrits dans l'introduction de cette thèse. Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes est un phénomène récemment découvert, qui pourrait contribuer à l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme. En ce sens, les travaux de doctorat que j'ai réalisés durant cette thèse visaient à étudier le gain de force du muscle lisse des voies aériennes à différentes échelles biologiques, de la cellule jusqu'à l'humain.

1.1 Problématique, hypothèse et objectifs relatifs au chapitre II : « Airway smooth muscle tone increases airway responsiveness in young healthy adults »

Une hyperréactivité bronchique ainsi qu'un tonus élevé du muscle lisse des voies aériennes sont deux caractéristiques typiques de l'asthme. Notre équipe de recherche a démontré que la présence d'un tonus (c.-à-d. contraction soutenue), provoqué par de faibles doses d'un bronchoconstricteur, était capable d'augmenter les capacités contractiles de muscle lisse de trachées de souris montées en bains d'organes [104]. Nous avons également démontré que la présence d'un tonus provoquée par l'inhalation répétée de faibles doses de MCh *in vivo* chez des souris était capable d'augmenter leur réactivité bronchique en réponse à une forte dose de MCh [104]. En revanche, l'existence de ce phénomène *in vivo* chez l'humain n'avait jamais été observée. Afin d'étudier l'occurrence du gain de force du muscle lisse des voies aériennes *in vivo* chez des humains en santé nous avons émis l'hypothèse que :

Un tonus élevé du muscle lisse des voies aériennes augmente la réactivité bronchique chez des jeunes humains en santé

Afin de répondre à cette hypothèse, les objectifs suivants ont été réalisés.

- *Mesurer l'impédance du système respiratoire en réponse à une forte dose d'un bronchoconstricteur (MCh) suivant ou non une période de 30 min de tonus.*
- *Étudier les effets bronchodilatateurs d'une inspiration profonde suivant l'inhalation d'une forte dose de MCh précédée ou non d'une période de tonus.*

- *Déterminer la contribution des éléments contractiles et non-contractiles des voies respiratoires dans l'augmentation de la réactivité bronchique suivant une période de tonus.*

1.2 Problématique, hypothèse et objectifs relatifs au chapitre III : « Airway smooth muscle tone increases actin filamentogenesis and contractile capacity »

Le phénomène du gain de force augmente les capacités contractiles du muscle lisse des voies aériennes *in vitro* en bain d'organe, mais également *in vivo* chez la souris [104]. Cependant, les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'augmentation de contractilité du muscle provoquée par l'exposition à un tonus n'ont jamais été étudiés. La contraction du muscle lisse des voies aériennes peut être comparée à un véhicule en déplacement dans lequel la myosine joue le rôle du moteur, et le cytosquelette d'actine joue le rôle de la transmission. Afin d'étudier le gain de force du muscle lisse des voies aériennes, nous avons étudié ces deux systèmes de façon indépendante dans des trachées de souris montées en bain d'organes ainsi que dans des cellules musculaires lisses en culture. Dans le but de comprendre ces mécanismes, nous avons émis l'hypothèse que :

Un tonus élevé du muscle lisse des voies aériennes augmente la polymérisation d'actine et accroît les capacités contractiles du muscle lisse.

Afin de répondre à cette hypothèse, les objectifs suivants ont été abordés.

- *Mesurer le phénomène du gain de force sur des cellules musculaires lisses des voies aériennes en culture grâce à des expériences de microscopie à force de traction.*
- *Étudier le rôle de l'activation de la chaîne légère de myosine et des protéines nécessaires à son activation dans le phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes.*
- *Caractériser le rôle de la polymérisation et de la filamentogénèse d'actine dans le phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes.*

1.3 Problématique, hypothèse et objectifs relatifs au chapitre IV : « The role of inflammation in force adaptation in a mouse model of allergic asthma »

La présence d'un tonus élevé du muscle lisse des voies aériennes augmente la réactivité bronchique en réponse à une forte dose de MCh chez les souris. Cependant, les liens de cause à effet potentiels qui existent entre le gain de force du muscle lisse et l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme demeurent incompris. Dans cette pathologie, le nombre de molécules inflammatoires qui agissent sur la contraction du muscle lisse bronchique est extrêmement élevé (Annexe 8.3) [112, 247]. Ainsi, la présence d'inflammation dans les voies respiratoires des patients asthmatiques pourrait contribuer à élever le tonus du muscle lisse des voies aériennes et provoquant la mise en place du phénomène du gain de force du muscle lisse. La mise en place de ce phénomène pourrait mener à un phénotype d'hyperréactivité bronchique. Afin de caractériser l'effet de l'inflammation dans le phénomène du gain de force du muscle lisse provoqué par l'exposition à un tonus, nous émettons l'hypothèse que :

L'inflammation dans un contexte d'asthme allergique augmente la réactivité bronchique en favorisant la mise en place d'un tonus élevé qui augmente les capacités contractiles du muscle lisse des voies aériennes

Afin de répondre à cette hypothèse, les objectifs suivants ont été abordés :

- *Mesurer l'impact du gain de force du muscle lisse sur les différents paramètres de la fonction respiratoire mesurés au flexiVent tel que la résistance newtonienne, l'amortissement tissulaire et l'élastance tissulaire.*
- *Établir un modèle murin d'asthme représentatif de l'inflammation éosinophilique majoritairement retrouvée dans l'asthme allergique, et mesurer l'effet de l'inflammation sur les différents paramètres de la mécanique respiratoire.*
- *Déterminer la présence du phénomène du gain de force du muscle lisse des voies respiratoires dans des souris devenues allergiques par une sensibilisation à la poudre d'acarien (HDM).*

Chapitre II : Airway smooth muscle tone increases airway responsiveness in young healthy adults

Morgan Gazzola¹, Katherine Lortie¹, Cyndi Henri¹, Samuel Mailhot-Larouche¹, David G Chapman², Christian Couture¹, Chun Y Seow³, Peter D Paré³, Gregory G King^{4,5,6}, Louis-Philippe Boulet¹, Ynuk Bossé¹

¹Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, Québec; ²Vermont Lung Center, University of Vermont College of Medicine, Vermont, United States; University of British Columbia Centre for Heart Lung Innovation, St Paul's Hospital, Vancouver; ⁴Woolcock Institute of Medical Research, ⁵University of Sydney, ⁶CRC for Asthma, Sydney, Australia

Sources of funding:

The work was supported by a donation of Merck Sharpe & Dohme Corps and by the Respiratory Health Network of the FRQS. DGC is supported by a CJ Martin Fellowship from the National Health and Medical Council of Australia (#1053790).

2.1 Résumé

Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes est un phénomène dans lequel l'activation soutenue du muscle lisse par un spasmogène (c.-à-d. un tonus) augmente ses capacités contractiles. Ce phénomène a précédemment été observé in vitro dans des tissus isolés, et in vivo chez la souris. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un tonus sur la réactivité bronchique chez l'humain. Dix volontaires en santé ont reçu des provocations de MCh à deux occasions. L'une d'elles consistait à l'inhalation de six doses de saline, suivies d'une forte dose de MCh. La seconde consistait à l'inhalation de six faibles doses de MCh espacées de 5 minutes, suivies de l'inhalation d'une forte dose. La dose cumulative de MCh inhalée était identique dans les deux protocoles. Suivant la dernière provocation de MCh dans chacun des protocoles, les sujets ont pris une inspiration profonde jusqu'à la capacité pulmonaire totale. Les réponses à la MCh et à l'inspiration profonde ont été mesurées grâce à l'utilisation d'un appareil d'oscillations forcées multifréquences. En comparaison à l'inhalation d'une seule dose de MCh, la provocation précédée de la période de tonus a augmenté la résistance du système respiratoire (Rrs) ainsi que la réactance du système respiratoire (Xrs) à 5 Hz. En revanche, aucune différence de Rrs à 19 Hz n'a été observée, témoignant d'un effet dans les bronches périphériques. La présence d'un tonus a également diminué l'efficacité de l'inspiration profonde mesurée par une diminution de la dilatation maximale durant l'inspiration profonde, et par une augmentation de la reconstriction suivant l'inspiration profonde. Nous concluons qu'un tonus du muscle lisse des voies aériennes augmente la réactivité bronchique en réponse à l'inhalation de MCh, et réduit l'efficacité de l'inspiration profonde chez des sujets humains en santé. Ces résultats suggèrent également que le gain de force du muscle lisse des voies aériennes pourrait contribuer au développement de l'hyperréactivité bronchique et à la diminution de l'effet bronchodilatateur des inspirations profondes dans l'asthme.

2.2 Abstract

Force adaptation, a process whereby sustained spasmogenic activation (*viz.*, tone) of airway smooth muscle (ASM) increases its contractile capacity, has been reported in isolated ASM tissues *in vitro*, as well as in mice *in vivo*. The objective of the present study was to assess the effect of tone on airway responsiveness in humans. Ten healthy volunteers underwent methacholine challenge on two occasions. One challenge consisted of six serial doses of saline followed by a single high dose of methacholine. The other consisted of six low doses of methacholine five minutes apart followed by a higher dose. The cumulative dose was identical for both challenges. After both methacholine challenges, subjects took a deep inspiration (DI) to total lung capacity as another marker of ASM mechanics. Responses to methacholine and the DI were measured using multi-frequency forced oscillation technique. Compared to a single high dose, the challenge preceded by tone led to an elevated response measured by respiratory system resistance (Rrs) and reactance (Xrs) at 5 Hz. However, there was no difference in the increase in Rrs at 19 Hz, suggesting a predominant effect on smaller airways. Increased tone also reduced the efficacy of DI, measured by an attenuated maximal dilation during the DI and an increased renarrowing post-DI. We conclude that ASM tone increased small airway responsiveness to inhaled methacholine and reduced the effectiveness of DI in healthy humans. This suggests that force adaptation may contribute to the development of airway hyperresponsiveness and the reduced bronchodilatory effect of DI in asthma.

2.3 Introduction

The contractile capacity of airway smooth muscle (ASM) is not fixed, but can rather change in response to several extracellular cues [247, 248]. This plasticity of ASM allegedly contributes to the variable component of asthmatic airway hyperresponsiveness (AHR) [249], which waxes and wanes according to the level of inflammation brought about exposures to allergens, viruses or other environmental triggers [250, 251]. Indeed, it is possible that this inflammatory environment enhances the function of ASM and thereby airway responsiveness without necessitating any intrinsic abnormality of asthmatic ASM [90]. Notably, airway inflammation, no matter its molecular heterogeneity, comes about with the overexpression of a variety of spasmogens (*i.e.*, contractile agonists), which triggers the contractile activation of ASM (reviewed in [112]). This sustained contractile activation of ASM (hereafter called ‘tone’) is consistent with the exaggerated responsiveness to bronchodilators used to diagnose asthma [213]. However, it is unknown whether tone can directly influence the degree of airway responsiveness in humans.

Recent findings from our laboratory suggest that mere exposure of ASM to ‘tone’ increases the contractile capacity of ASM [103-105, 252], which may represent the causal link between increased tone and AHR in asthma [253, 254]. Indeed, in isolated tracheal smooth muscle strips from sheep, we demonstrated that tone elicited by the continuous exposure to a spasmogen increased the contractile capacity of ASM in a time-dependent fashion [103, 105, 252]. This phenomenon was dubbed ‘force adaptation’ since ASM ‘adapted’ during the tonic phase of contraction in order to generate greater force upon subsequent stimulations. Based on computational model, ‘force adaptation’ was predicted to increase resistance to airflow between 39% in the more proximal airways to 274% in the more peripheral airways [106]. Importantly, force adaptation was recently demonstrated to increase airway responsiveness *in vivo* in mice [104]. More specifically, a single high dose of methacholine induced substantially greater airway responsiveness in mice previously exposed to a 20-min period of tone compared to mice in which the cumulative dose was given as a single dose. Therefore, force adaptation may provide a unifying mechanism by which tone mediated by the overexpression of inflammation-derived spasmogens could induce AHR in asthma. However, it is unknown whether force adaptation occurs in humans *in vivo*.

The present study aimed to determine whether tone increases airway responsiveness in young healthy adults *in vivo*. To address this question, we measured changes in respiratory mechanics using the forced oscillation technique (FOT) during a methacholine challenge preceded by a 30-min period with or without tone. The results demonstrate that tone greatly enhanced airway responsiveness, especially in peripheral airways, in addition to reduce the duration of the bronchodilatory effect of DI.

2.4 Methods

2.4.1 In vivo study with human subjects

All subjects were healthy non-asthmatics without a history of respiratory disease. All were lifetime non-smokers, except 1 who was current smoker. The Ethics Committee of the IUCPQ approved the study and all subjects gave written informed consent.

Each subject attended three visits, each separated by at least 2 days. The first visit involved a skin prick test as well as baseline lung volume and function measured by spirometry, body plethysmography (Platinum Elite™ body plethysmograph with RTD, MGC Diagnostics Corporation, Saint Paul, MN) and the forced oscillation technique (FOT) (TremoFlo, Thorasys, Montréal). Subjects then underwent a methacholine challenge via the tidal breathing method [255] with doses from 2 to 128 mg/ml. Subjects were asked to refrain from deep inspirations (DIs) during the challenge. In order to avoid DI throughout the challenge, the response of the respiratory system to methacholine was monitored using the FOT. DIs were prohibited because they are well-known to decrease tone triggered by the inhalation of a spasmogen (methacholine or histamine) [256-258]. The goal of the present study was to assess the effect of methacholine-induced tone on airway responsiveness. To maintain a consistent tone, it was thus mandatory to instruct the subjects to refrain from taking DIs. The avoidance of DIs in the first visit was also required to decide on a safe dose that can then be administered in the absence of DI in the subsequent visits. The challenge in the first visit was stopped once the maximal tolerable dose (perception of dyspnea over 8/10 on the Borg scale) was attained or after the 128 mg/ml dose was administered. This dose was used for the two subsequent visits as described below.

The 2 last visits were designed to test the effect of tone on airway responsiveness (Figure 1) and were performed in random order. At both visits, baseline spirometry and FOT were obtained. Subjects were again instructed to avoid DI. In Protocol 1, subjects inhaled serial doses of saline (vehicle control) every 5 min during a 30-min period. Subjects were then administered a single dose, the maximal dose determined at the first visit. In Protocol 2, six low doses of methacholine (representing 1/32 of the maximal dose at visit 1) were inhaled at 5-min intervals to induce a sustained activation of airway smooth muscle (*i.e.*, tone) followed by a single higher dose of methacholine (representing 26/32 of the maximal dose at visit 1). The low and higher doses in Protocol 2 were calculated so that the cumulative dose was equivalent to that in Protocol 1 (Table 3). FOT indices were measured after each dose.

At the end of each protocol, before taking out the mouthpiece, subjects were instructed to take a DI to total lung capacity (TLC) to measure inspiratory capacity (IC) and then to resume tidal breathing for an additional minute (Figure 2). End-tidal expiratory volumes were calculated from the measured IC and baseline TLC from visit 1. Maximal dilation during the DI was measured as respiratory system resistance (R_{rs5}) at TLC when flow was zero, which represented the minimal R_{rs5} over the course of the DI ($R_{rs_{min}}$). The extent of dilation induced by the DI was calculated as the average R_{rs5} pre-DI minus $R_{rs_{min}}$, expressed as percentage of R_{rs5} pre-DI. The dilator effect of DI was calculated as R_{rs5} pre-DI minus the average R_{rs5} over the first tidal breath post-DI, expressed as percentage of R_{rs5} pre-DI. The extent of re-narrowing was calculated as the maximal single-breath R_{rs5} post-DI minus R_{rs5} over the first tidal breath post-DI, expressed as percentage of baseline R_{rs5} . The kinetics of re-narrowing was calculated as the rate of breath-by-breath R_{rs5} recovery post-DI [259].

2.4.2 In vitro study with human bronchi

Human lung tissue was obtained from patients undergoing lobectomy or segmentectomy for lung cancer removal. Consent was obtained from every donor and the use of human lung tissue was approved by the ethical review committee of the IUCPQ (*Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec*). The onsite tissue bank of the Respiratory Health Network of the FRQS (www.tissuebank.ca) was in charge of supplying resected lung specimens of gross healthy appearance (*i.e.*, away from tumors) the day of the surgery.

From each lung specimen, one bronchial ring was dissected free of parenchyma and mounted in an organ bath as previously described [260].

The effect of tone was tested as previously described in murine tracheas [261]. Briefly, the bronchi were subjected to 2 sequences of interventions in a randomized order. In one sequence, the bronchi were submitted to a 30-min period of rest followed by a contraction elicited by a near maximal concentration of carbachol (10^{-4} M). In the other sequence, the bronchi were stimulated with the concentration of carbachol that induces 30% of the maximal response (EC30) to elicit tone for 30 min and then stimulated with 10^{-4} M of carbachol (final concentration). The force generated in response to 10^{-4} M between the 2 sequences was then compared to assess whether preceded tone increases the contractile capacity of ASM.

2.4.3 Data analysis

Data are shown as means \pm SE. For the *in vivo* study, comparisons between protocols 1 and 2 were performed using paired t-tests or repeated measures two-way ANOVAs. For the *in vitro* study, the peak force obtained during the first 5 min following the administration of methacholine 10^{-4} M was compared between the two sequences with and without preceded tone using a paired t-test. All statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad, San Diego) and $p \leq 0.05$ was considered significant.

2.5 Results

2.5.1 In vivo study with human subjects

Baseline values obtained during the first visit for spirometric, FOT and plethysmographic indices were all within normal limits (Table 1). The maximal tolerable dose of methacholine and the degree of airway responsiveness determined by FOT were also indicative of normal responses to methacholine. The values of Rrs_5 , Rrs_{5-19} and Xrs_5 were in agreement with values reported previously for healthy adults [262].

The main aim of the present study was to compare indices of respiratory mechanics at the end of two bronchoprovocative challenges with different regimens of methacholine delivery.

The regimen in protocol 2 differed from protocol 1 by the inclusion of a 30-min period of tone that preceded the final dose of methacholine. Baseline spirometry and FOT did not differ between the two protocol visits (Table 2). Although the total amount of methacholine administered was specific for each person (32, 64 or 128 mg/ml), the cumulative amount administered in each protocol for each subject was the same (Table 3). Tone was effectively observed throughout protocol 2, as confirmed by progressive increases in R_{rs5} , R_{rs19} and R_{rs5-19} , and progressive decrease in X_{rs5} (data not shown).

2.5.2 Effect of induced tone on airway responsiveness

On average, 9.0 ± 1.4 and 9.8 ± 1.2 breaths were measured prior to the DI in protocol 1 and protocol 2, respectively. The pattern of breathing and the volume at which the subjects were breathing were not different between the two protocols (Table 4). As shown in Figure 3, increased ASM tone resulted in substantially exaggerated airway responsiveness. R_{rs5} increased by $132.8 \pm 20.7\%$ compared to $85.9 \pm 20.9\%$ in protocol 1, representing a difference of 59.6% ($p = 0.02$). Similarly, tone led to a greater increase in R_{rs5-19} by 97.3% ($p = 0.02$) and a greater decrease in X_{rs5} by 173.8% ($p = 0.004$). In contrast, R_{rs19} was not significantly different between the two protocols (4.0%; $p = 0.68$), suggesting that increased tone primarily affected more peripheral airways.

2.5.3 Effect of induced tone on the response to deep inspiration (DI)

To determine the effect of increased tone on DI-induced bronchodilation, subjects were instructed to take a DI to TLC and resume tidal breathing while monitored continuously with the FOT. The volume inhaled during the DI (*i.e.*, the inspiratory capacity (IC)) was substantially less than that at baseline (3.02 ± 0.31 L) but did not differ between Protocols (1.99 ± 0.61 vs 1.89 ± 0.52 L in protocol 1 vs protocol 2, respectively). The total duration of the DI, as well as the time for inspiration and expiration, was not different between protocols (Table 5).

The effect of DI on FOT indices is shown in Figure 4. Maximal dilation (R_{min}) was significantly impaired by tone (1.8 ± 0.4 vs 3.0 ± 0.6 cmH₂O/L/s in protocol 1 vs protocol 2, respectively;

$p = 0.03$). In contrast, the extent of dilation induced by the DI was not different between the two protocols ($66.3 \pm 5.3\%$ without preceding tone (protocol 1) *versus* $58.2 \pm 6.3\%$ with tone (protocol 2); $p = 0.35$). The effect of DI on breathing pattern between the protocols is shown in Table 4.

We subsequently determined the effect of DI once tidal breathing had resumed and the ensuing return of bronchoconstriction by analyzing the average values for each individual breath and plotting these values over time post-DI for each FOT indice. Figure 5 shows the entire time-dependence of Rrs_5 , Rrs_{19} , Rrs_{5-19} and Xrs_5 following DI. The dilator effect of DI, measured during the first breath following DI, is shown in Figure 6A. The dilator effect of DI was not affected by tone ($32.2 \pm 3.3\%$) compared without tone ($25.9 \pm 7.7\%$; $p = 0.37$). The extent of re-narrowing between protocols is shown in Figure 6B. Despite no difference in the dilator effect of DI, total re-narrowing during the min following DI was increased with tone ($74.4 \pm 13.3\%$) compared to without tone ($41.0 \pm 7.2\%$; $p = 0.003$). Similarly, the rate of re-narrowing shown in Figure 6C was increased with tone (0.028 ± 0.009 cmH₂O/L/s per second) compared to without tone (0.005 ± 0.006 cmH₂O/L/s per second; $p = 0.04$).

2.5.4 In vitro study with human bronchi

To confirm that tone enhances the contractile capacity of human ASM, human bronchi were stimulated to contract in response to 10^{-4} M of carbachol in motionless conditions with or without a preceded tone elicited by the EC30 of carbachol. The EC30 was on average $3.8 \times 10^{-6} \pm 7.3 \times 10^{-7}$ M. As shown in Figure 7, tone increased the contractile capacity of human bronchi by $26.5 \pm 16.7\%$ ($p = 0.04$). The magnitude of this increase was similar to the results obtained previously in sheep tracheal smooth muscle strips [103, 105, 252] and in murine tracheas [104].

2.6 Discussion

This study demonstrates that tone increases airway responsiveness in young healthy adults. This was clearly shown by the enhanced response to methacholine measured by the increase in Rrs_5 and Rrs_{5-19} , as well as the decrease in Xrs_5 , in response to the same

cumulative dose of methacholine following 30 min of induced tone *versus* no induced tone. In contrast, there was no effect of induced tone on Rrs₁₉, suggesting that the effect of tone was predominant in more peripheral airways. Furthermore, tone also reduced the effectiveness of the bronchodilatory effect of DI, evidenced by the reduced maximal dilation of the DI and the increased extent and rate of re-narrowing following resumption to tidal breathing. It is noteworthy to mention that AHR, attenuated maximal dilation at TLC during a DI [263-266] and increased re-narrowing post-DI [259, 263, 264, 267] are well-described features of asthma. The fact that tone recapitulated all these features in healthy subjects suggests that an elevated tone may be a common underlying mechanism for these physiological abnormalities in asthma.

Although tone increased airway responsiveness, it is likely that we have underestimated the reported effect. This is because the series of doses administered in protocol 2 may not be totally cumulative. We previously demonstrated that, when DIs are prohibited, the increase in Rrs induced by inhaled methacholine in humans is maintained longer than the kinetics of methacholine clearance would predict [268]. In fact, this latter study demonstrated that during 30 min, the concentration of methacholine significantly waned. Therefore, the 30 minutes required to deliver the six low doses of methacholine in Protocol 2 is likely to have allowed the clearance and/or catabolism of methacholine; so that the total effective concentration remaining at the end of the protocol was less than the single high dose in Protocol 1. Nonetheless, this likely reduced dose still enhanced the response to methacholine, highlighting the potential importance of tone on airway responsiveness.

2.6.1 Contractile mechanisms

The increased airway responsiveness we observed following a period of tone may be explained on the basis of contractile mechanisms. Our previous *in vitro* studies [103-105, 252] clearly demonstrated that tone increases the contractile capacity of ASM through a process called force adaptation. The experiments conducted in the present study with isolated bronchi confirmed the occurrence of this phenomenon in human tissues.

The concept of 'plasticity' in the contractile capacity of ASM is not new [125, 157, 269]. The molecular mechanisms whereby the contractile capacity of ASM is modulated are currently being defined. Actin and myosin filaments, as well as adhesomes, which are multi-protein

modules ensuring physical linkages between the contractile apparatus inside the cell and the extracellular matrix, are evanescent in ASM [125, 157, 269]. Many mediators, including inflammation-derived spasmogens, reorganize and reinforce these cytoskeletal structures, which may account for the gain in contractile capacity induced by tone (*i.e.*, force adaptation). Importantly, these structural modifications occur within a timescale of minutes, which is also in accordance with the timescale of changes reported herein. These rapid changes in the contractile capacity of ASM are also consistent with clinical manifestations of asthma, especially the variable component of AHR [249]. The present study thus supports the continued effort in that research area, as it suggests that the contractile plasticity of ASM is a phenomenon occurring *in vivo* in humans that seriously influences the degree of airway responsiveness to methacholine. A better description of the intracellular mechanisms underlying force adaptation could leap forward our understanding of the variable component of AHR.

Our findings also suggest that the effect of tone, and perhaps force adaptation, is predominant in more peripheral airways. This is consistent with our previous computational modeling [106]. Because large airways are stiffer [270, 271], we previously predicted that the gain in contractile capacity induced by tone would be greater in smaller airways [106]. Accordingly, we reported herein an enhanced response to methacholine measured by Rrs_5 and Xrs_5 but not Rrs_{19} . Although we previously predicted small effects of force adaptation in larger airways, it is possible that the high doses of methacholine used led to maximal constriction in larger airways in both protocols, potentially due to cartilage abutment against each other [272, 273]. If maximal constriction had already been achieved, a gain in contractile capacity would not equate to further reductions in larger airway caliber, represented by Rrs_{19} . In contrast, force adaptation in large airways may lead to increased ASM isometric force, and attendant increases in airway wall stiffness without further narrowing. In this regard, the decrease in Xrs_{19} was greater following tone *versus* no tone (data not shown). This result may be evidence of enhanced methacholine-induced stiffening following a period of tone in maximally constricted large airways. However, it is also possible that the exaggerated effect on Xrs_{19} represents the consequence of small airway closure; *i.e.*, the oscillometric signal is now reflecting a greater contribution of larger airways, which are inherently stiffer, following induced tone. Nonetheless, both scenarios provide evidence that the effect of tone is predominant on small airways, and support the notion that tone may contribute to abnormal small airway function in asthma.

Beyond increasing the degree of airway responsiveness, tone also affected the response to DI. On one hand, tone clearly limited the maximal dilation (R_{\min}). On the other hand, tone neither affected the dilation induced by DI nor the bronchodilator effect of DI. However, the lack of difference in the dilation induced by DI indicated that the magnitude of strain (length excursion) that ASM underwent was different between protocols, at least when geometrical factors are taken into account. Specifically, the same change in R_{rs5} during DI in a more constricted state (higher R_{rs5}) implies less dilation, since the change in resistance is inversely related to luminal airway radius at the fourth power. Nevertheless, even if maximal dilation (R_{\min}) was clearly attenuated and the excursion of airway caliber may have been attenuated by preceded tone when geometry is taken into account, the bronchodilator effect of DI was the same. Indeed, the change in R_{rs5} pre- versus post-DI at isovolume (FRC) was identical between protocols. This suggests that despite limiting maximal elongation and the strain excursion that ASM underwent during the DI, tone did not impair the bronchodilatory effect of DI in healthy subjects. Another clear effect of tone on the response to DI was the increased amount and the expedited rate of renarrowing post-DI. This indicated that tone attenuated the duration of the bronchodilatory effect of DI.

Although our previous *in vitro* studies [103-105, 252] clearly demonstrated that tone increases the capacity of ASM to generate force, other contractile properties than force may come into play *in vivo*. For example, the increased airway narrowing, the reduced maximal dilatation achieved during the DI (R_{\min}) and the increased extent and rate of re-narrowing post-DI, suggest increased amount of shortening, increased ASM stiffness and increased velocity of shortening, respectively. Whether these contractile properties are affected individually by tone or are simply different *in vivo* manifestations of a gain in force-generating capacity remain to be determined.

The increased responsiveness observed following tone can also be explained on the basis of another process called length adaptation [100, 274]. We have previously shown *in vitro* that length adaptation and force adaptation are two distinct phenomena [252]. However, we don't believe that these 2 phenomena can be readily distinguished *in vivo*. It is thus very plausible that the small narrowing of the airways induced by tone had allowed ASM to adapt to a shorter length, which had then predisposed to greater force generation and further airway narrowing upon delivery of the last dose of methacholine.

However, the greater rate of renarrowing post-DI in the protocol with tone is harder to explain on the basis of length adaptation. All the oscillometric indices post-DI were mostly normalized between the 2 protocol immediately post-DI, suggesting that the length of ASM at that point in time was roughly the same throughout the lung. Since the gain in force due to length adaptation is expected to vanish in response to the stretch imposed by the DI, we believe that the supplemental force that drove the greater renarrowing at that point in time originated from force adaptation. Importantly, our previous *in vitro* studies support this contention [252]. In the latter, we demonstrated that the gain in force due to ‘force adaptation’ is not affected by either a length increase or a length decrease. We thus surmise that the greater rate of renarrowing following the stretch imposed by the DI is due to supplemental ASM force that was acquired through force adaptation. Our *in vitro* study done in motionless conditions further supports that force adaptation occurs in human bronchi.

2.6.2 Non-contractile mechanisms

The increased airway responsiveness we observed following a period of tone may also be explained on the basis on non-contractile mechanisms. For example, initial airway narrowing due to tone may induce ventilation or airway narrowing heterogeneity, which then predisposes to exaggerated bronchoconstriction to the final dose [275-277]. The importance of heterogeneity on AHR has been suggested by computational modeling [63, 278, 279] and in both asthmatic and non-asthmatic subjects [84, 275-277, 280]. Accordingly, Xrs_5 and Rrs_{5-19} , which are two good surrogates for quantifying heterogeneity [281-283], were elevated in our study after 30 min of tone compared with 30 min without tone. This suggests that at the final dose of methacholine, we were challenging a lung with a pattern of narrowing that was more heterogeneous, which should thus be more responsive. Therefore, airway narrowing heterogeneity may also explain the increased airway responsiveness induced by tone.

Be that as it may, the increased renarrowing post-DI is difficult to explain on the basis of heterogeneity. In fact, the average Xrs_5 over the first breath post-DI was almost identical between protocols. This suggests that heterogeneity at that particular point in time was very similar between protocols. This is very consistent with previous studies [275, 277]. In the latters, the authors showed that the elevated dynamic elastance due to heterogeneity drop back to normal after a single DI in healthy subjects, even after a 45 min of DI withholding with a high level of tone. Yet, in our experiments, the extent and the rate of renarrowing post-

DI was greater in the visit with preceded tone compared to the visit without tone. This suggests that ASM were stronger and thereby able to cause more narrowing in response to the remaining concentration of methacholine. Briefly, our observation is easier to explain on the basis of force adaptation than on the basis of increased baseline heterogeneity.

It is also possible that, due to airway closure induced by tone, the final methacholine dose was delivered into a 'smaller' lung [284, 285]. The concentration of methacholine is then anticipated to be higher per surface area, which may account for the increased response we observed. This is a possibility that we cannot discount with certainty. However, it can be counter-argued. Schmekel and coworker [286] have demonstrated that the pulmonary response to inhaled methacholine is not dependent on the pattern of aerosol deposition in humans. This suggested that inhaled methacholine is delivered in all the airways via the circulating blood, irrespective of whether it is initially deposited homogeneously throughout the lungs or patchily and restrictedly to large airways. These latter observations are also consistent with the altered time of recovery from spasmogen-induced airway response when bronchial perfusion was modulated in sheep and dogs [287, 288]. Our experiments were not designed to provide further clarification on this topic.

2.6.3 Clinical implication

Our results have important clinical implications. Force adaptation and its amplifying effect on airway responsiveness are dependent on low-grade stimulation of ASM by inflammation-derived spasmogens. This low-grade stimulation has long been recognized in asthmatic patients by the exaggerated response to bronchodilator therapy. Therefore, force adaptation suggests that in asthma, mild airway inflammation, which causes only minimal airway narrowing, could prime the airways for excessive, life threatening airway narrowing when exposed to additional challenges. We previously emphasized that tone can be triggered by many different assortments of contractile agonists and inflammatory mediators [112]. This is important as it implies that force adaptation may occur regardless of whether the inflammation is elicited by allergens, viral infection or acute toxic inhalational exposure. Our results may thus explain why increased tone (as evidenced by exaggerated bronchodilator response) and AHR are two common characteristics of asthma despite the well-defined molecular heterogeneity of asthma pathogenesis [1]. Finally, our results also suggest that

the effectiveness of ASM strain as a natural bronchodilator (*i.e.*, breathing is good for breathing [289]) will be enhanced if tone is lessened with bronchodilators [290].

2.7 Conclusion

Overall, our *in vivo* experiments do not allow us to distinguish with certainty whether tone amplifies airway responsiveness to methacholine by increasing heterogeneity, by altering methacholine deposition, or by fostering either length adaptation or force adaptation. Each phenomenon were likely to contribute. Our strongest *in vivo* evidence to support the gain in ASM's contractile capacity induced by tone is the greater rate of renarrowing observed in the visit with tone once heterogeneity had been mostly normalized by the DI. We also think that the *in vitro* experiments with human bronchi further reinforce the idea that force adaptation may be operational *in vivo* in humans.

Notwithstanding the difficulty of isolating the effect of force adaptation on *in vivo* responsiveness to methacholine in humans, our results are supportive of an enhancing effect of tone on the contractile capacity of ASM that then translates into increased airway responsiveness of small airways. Furthermore, the effect of tone also reduces the duration of the bronchodilator effect of deep inspiration. These findings may have important implications in asthma. They suggest that the effect of spasmogens on increased airway tone may directly contribute to AHR and reduce the efficacy of the bronchodilator effect of DI, perhaps by increasing the contractile capacity of ASM. Therefore, future determination of the molecular processes liable for force adaptation may provide important pharmacological targets to reduce bronchoconstriction in patients with asthma.

2.8 Acknowledgements

The authors thank the subjects that have participated in this study, as well as the staff at the Respiratory Health Network Tissue Bank for their valuable assistance in the obtention of human bronchi.

2.9 Tables

Table 2.1: Individual and mean characteristics of the subjects.

All values for spirometric, oscillometric and plethysmographic indices were from baseline at visit 1.

Subjects	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean \pm SEM
Age	28	25	30	26	22	27	22	25	33	22	26.0 \pm 1.2
Gender	M	F	F	M	F	F	M	M	M	F	
BMI	30.9	21.7	18.5	23.2	19.7	20.3	20.8	20.0	25.9	29.6	23.0 \pm 1.4
Allergy #	yes	yes	no	no	no	yes	yes	yes	yes	yes	
FEV ₁ (% predicted)	115.6	118.3	107.7	99.2	84.8	94.8	93.2	88.4	102.8	114.5	101.9 \pm 3.7
FVC (% predicted)	111.0	115.3	109.8	112.2	100.3	89.8	88.2	88.6	96.2	111.5	102.3 \pm 3.4
FEV ₁ /FVC (% predicted)	103.7	103.5	98.8	86.7	84.9	105.9	106.0	98.8	107.4	103.5	99.9 \pm 2.5
TLC (% predicted)	115.4	101.0	107.2	120.9	100.4	91.3	90.3	100.0	98.7	109.8	103.5 \pm 3.1
FRC (% predicted)	92.8	111.6	97.9	126.1	101.4	105.4	88.1	113.4	101.8	109.7	104.8 \pm 3.5
RV (% predicted)	98.2	69.4	93.7	131.1	114.4	100.0	82.3	125.6	99.4	107.1	102.1 \pm 5.9
Rrs ₅ (cmH ₂ O/L/s)	2.5	3.8	5.0	2.5	3.7	2.7	3.4	2.6	2.2	3.0	3.1 \pm 0.3
Rrs ₁₉ (cmH ₂ O/L/s)	2.5	3.8	5.2	2.5	3.6	2.6	2.9	2.4	1.9	3.3	3.1 \pm 0.3
Rrs ₅₋₁₉ (cmH ₂ O/L/s)	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.1	0.1	0.5	0.1	0.3	-0.3	0.1 \pm 0.1
Xrs ₅ (cmH ₂ O/L/s)	-1.0	-0.9	-1.4	-0.9	-1.2	-1.2	-0.9	-0.9	-0.9	-0.8	-1.0 \pm 0.1
Highest dose of methacholine inhaled (mg/mL)	128	64	32	32	32	128	32	32	64	32	57.6 \pm 12.4
Airway Responsiveness ^s	1.0	1.7	3.6	5.3	3.7	1.1	3.7	4.5	2.3	3.1	3.0 \pm 0.5

Skin-prick test positive for at least one of the common allergens tested (cat, dog, horse, cow, ash, poplar, birch, elm, maple tree, oak, grasses, timothy grass, ryegrass, ragweed, wormwood, plantain weed, cocklebur weed, alternaria, horradendrum, *aspergillus*, *D. farinae*, *D. Pteronyssinus*, feathers)

*Assessed by the forced oscillation technique (FOT). Dose-response slope in % increase of Rrs_5 per μ moles of methacholine

Abbreviations: BMI, body mass index; FEV_1 , forced expiratory volume in 1 second; FRC, functional residual capacity; FVC, forced vital capacity; Rrs_5 , respiratory system resistance at 5 Hz; Rrs_{19} , respiratory system resistance at 19 Hz; Rrs_{5-19} , Rrs_5 minus Rrs_{19} ; RV, residual volume; TLC, total lung capacity; Xrs_5 , respiratory system reactance at 5 Hz.

Table 2.2: Mean spirometric and oscillometric indices at baseline before the protocols

	Protocol 1	Protocol 2
FEV₁ (% predicted)	101.6 ± 3.4	101.1 ± 3.4
FVC (% predicted)	106.1 ± 3.5	105.9 ± 3.4
FEV₁/FVC (% predicted)	96.2 ± 2.3	95.9 ± 2.5
Rrs₅ (cmH₂O/L/s)	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3
Rrs₁₉ (cmH₂O/L/s)	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.2
Rrs₅₋₁₉ (cmH₂O/L/s)	-0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.08
Xrs₅ (cmH₂O/L/s)	-1.0 ± 0.1	-1.0 ± 0.1

Data shown are means ± SEM.

Abbreviations: FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; FRC, functional residual capacity; FVC, forced vital capacity; Rrs₅, respiratory system resistance at 5 Hz; Rrs₁₉, respiratory system resistance at 19 Hz; Rrs₅₋₁₉, Rrs₅ minus Rrs₁₉; Xrs₅, respiratory system reactance at 5 Hz

Table 2.3: The doses of methacholine used in this study.

The doses delivered in both protocols (doses A, B and C) were based on the maximal tolerable doses (one of the 3 doses in the grey shaded area) determined in visit 1. The dose regimen is displayed in Figure 1.

Maximal tolerable dose	32	64	128
Dose A	32	64	128
Dose B	1	2	4
Dose C	26	52	104

The doses are in mg/ml

Table 2.4: Tidal breathing pattern pre- and post-deep inspiration (DI)

		Protocol 1	Protocol 2	P values
Pre-DI	Tidal volume (mL)	629 ± 64	645 ± 71	0.71
	Frequency (Hz)	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.08
	Minute ventilation (L)	9.4 ± 1.1	11.0 ± 0.9	0.06
	Lung volume at end expiration (L)*	4.19 ± 0.35	4.34 ± 0.31	0.43
	Lung volume at end expiration (% of TLC)	67.1 ± 3.1	69.7 ± 1.9	0.38
Post-DI	Tidal volume (mL)	832 ± 86	873 ± 53	0.48
	Frequency (Hz)	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.003
	Minute ventilation (L)	12.9 ± 1.1	15.2 ± 0.7	0.04
	Lung volume at end expiration (L)	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.2	0.79
	Lung volume at end expiration (% of TLC)	65.1 ± 3.3	64.6 ± 2.1	0.85
Changes (post-DI minus pre-DI)	Tidal volume (mL)	203 ± 35	227 ± 40	0.70
	Frequency (Hz)	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.45
	Minute ventilation (L)	3.5 ± 0.3	4.2 ± 0.7	0.30
	Lung volume at end expiration (L)	131 ± 106	340 ± 105	0.03
P values pre- vs post-DI within each protocol	Tidal volume (mL)	0.0003	0.0003	
	Frequency (Hz)	0.24	0.96	
	Minute ventilation (L)	<0.0001	0.0002	
	Lung volume at end expiration (L)	0.01	0.25	

*The lungs were hyperinflated in both protocols compared to baseline with no methacholine (end expiratory volume of 3.23 ± 0.41 L, representing 52.5 ± 5.1% of TLC).

Table 2.5: Characteristics of the deep inspiration (DI)

	Protocol 1	Protocol 2	P values
Total time (s)	8.57 ± 1.19	7.83 ± 1.31	0.16
Inspiratory time (s)	3.97 ± 0.62	3.24 ± 0.48	0.07
Expiratory time (s)	4.60 ± 0.69	4.59 ± 0.88	0.97
Inspiratory capacity (IC) (L)	1.99 ± 0.61	1.89 ± 0.52	0.57

2.10 Figures

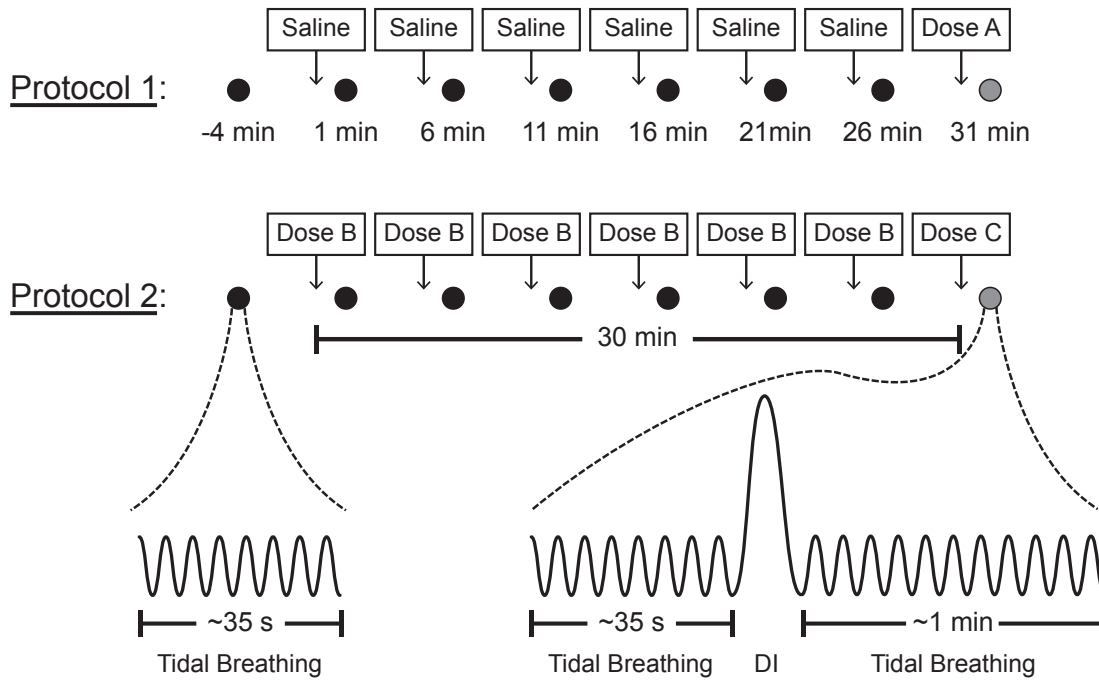


Figure 2.1. Schematic depicting the protocols used to test the effect of tone on in vivo airway responsiveness in humans. Every solid circle represents a period during which respiratory system impedance (Z_{rs}) was measured by the forced oscillation technique during ~35 s of tidal breathing as illustrated in the lower left corner. The gray circle in each protocol represents the period during which Z_{rs} was measured continuously during ~35 s of tidal breathing, a deep inspiration (DI) and for an additional 1 min of tidal breathing as illustrated in the lower right corner. The times displayed are in relation to the beginning of tone (time zero); *i.e.*, the time at which the inhalation of the first dose was terminated in protocol 2. The tone was maintained throughout protocol 2 by delivering low doses of methacholine at 5-min intervals. The doses used are depicted in Table 2.

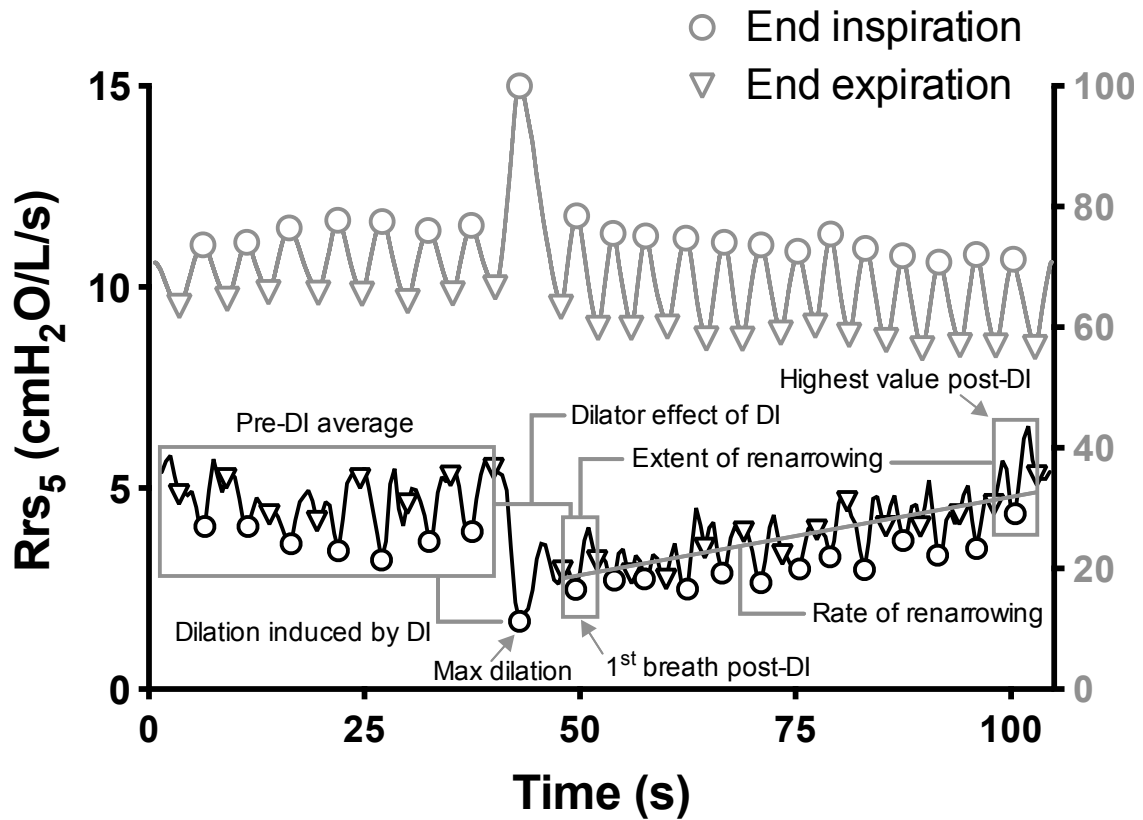


Figure 2.2. Representative traces of volume (in gray) and of an oscillometric indice (in black; Rrs_5 in this case) over time. The volume is expressed in percentage of TLC, which is why it reached 100% during the deep inspiration (DI). The circles and triangles indicate the time-points corresponding to the end of inspiration and the end of expiration, respectively, when airflow was near zero. The same aligned symbols on the Rrs_5 trace correspond to the same time-points. The ways maximal dilation, dilation induced by the DI, dilator effect of DI, extent of renarrowing and rate of renarrowing were calculated are described in the Methods.

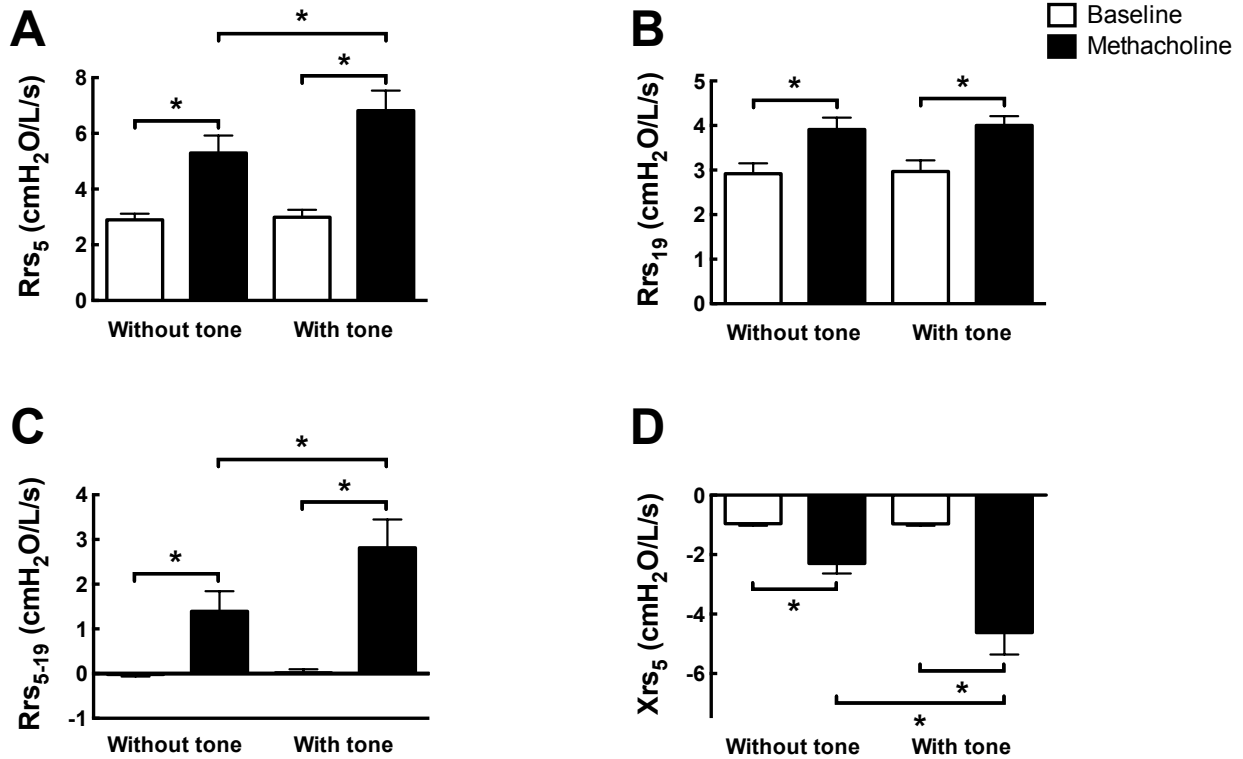


Figure 2.3. Tone potentiates the effect of methacholine on several oscillometric indices of respiratory mechanics. The respiratory system resistance (Rrs) at 5 and 19 Hz, the frequency-dependence of Rrs (Rrs_{5-19}) and the respiratory system reactance (Xrs) at 5 Hz are depicted from A through D, respectively, at baseline (empty bars) on both occasions (protocol 1 and 2) and after the delivery of the same cumulative dose of methacholine (black bars) preceded (protocol 2) or not (protocol 1) by a 30 min period of tone. * denotes statistically significant differences between the indicated bars. $n = 10$

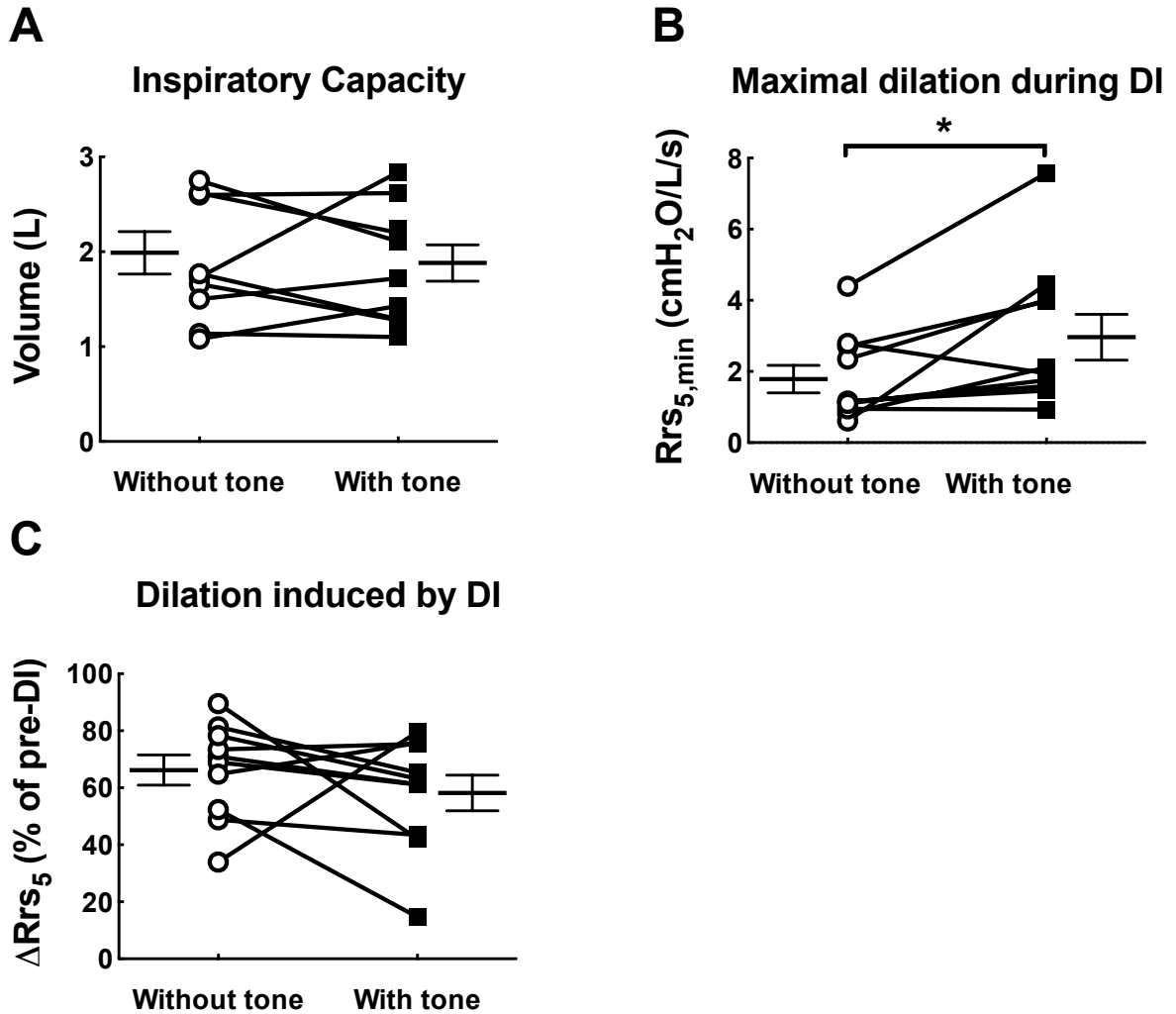


Figure 2.4. The characteristics of the deep inspiration (DI) are compared between protocols. The volumes inhaled during the DI (A); the maximal dilation achieved (B), which was the minimal value of Rrs₅ during the DI (*i.e.*, the Rrs₅ at TLC when the flow was zero); and the dilation induced by DI (C), which was the excursion of Rrs₅ from tidal breathing pre-DI to TLC, expressed in percentage of pre-DI Rrs₅ are depicted for protocol 1 (without tone; circles) and protocol 2 (with tone; squares). The results between protocols within each subject are linked by a line. The symbols flanking the individual results are the means and SEM. * denotes statistically significant differences between protocols. n = 10

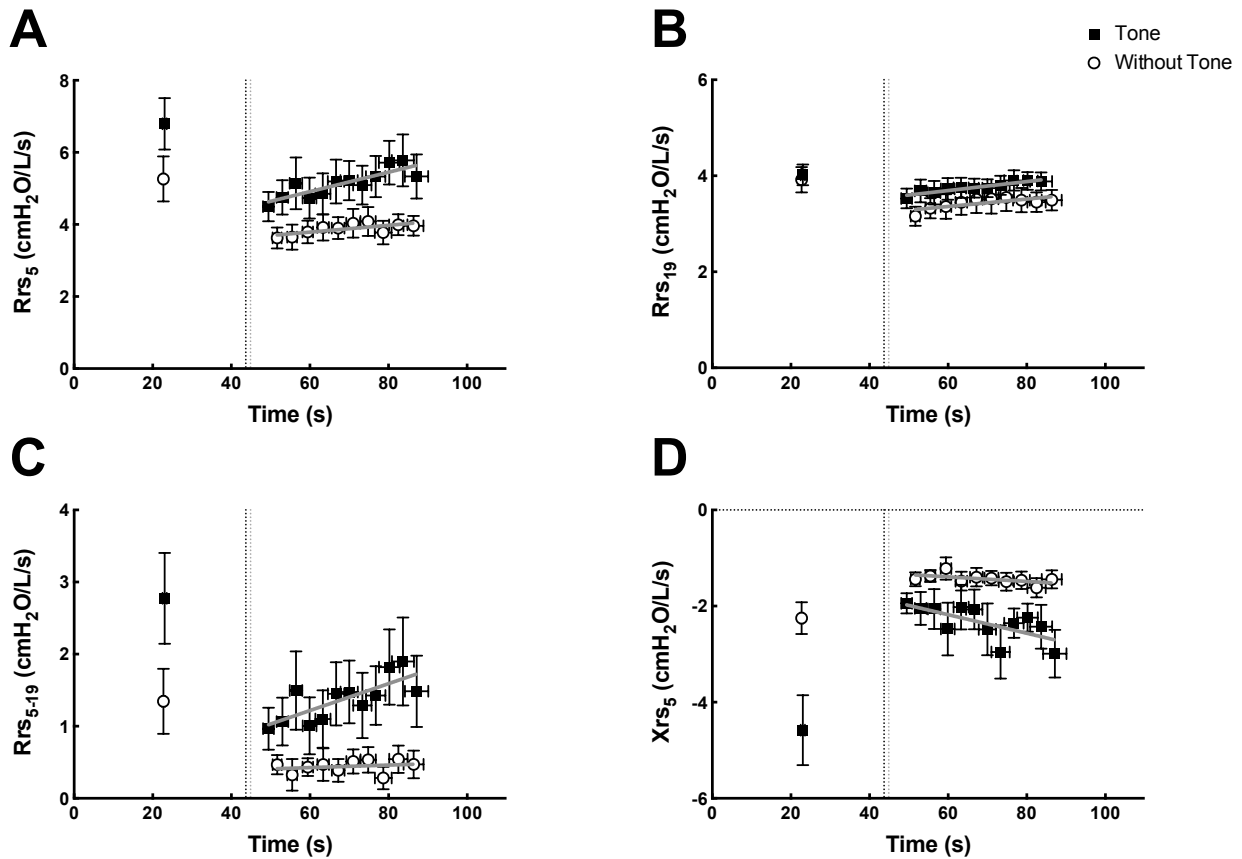


Figure 2.5. The kinetics of changes post-DI is compared between protocol 1 (without tone; empty circles) and protocol 2 (with tone; full squares) for each oscillometric indice. For each protocol, the breath-by-breath analysis of each subject, was combined in order to look at the mean change of Rrs₅ (A), Rrs₁₉ (B), Rrs₅₋₁₉ (C), and Xrs₅ (D) post-DI within each protocol. The pre-DI values over the ~35 s of tidal breathing are shown again (as in Figure 3) in the first part of each graph in order to better visualized the dilator effect of DI. The horizontal error bars are because breathing frequency varies between subjects, so that each breath occurred at a different time for each subjects. The gray and black vertical dashed lines are landmarks to indicate the time halfway into the DI during protocol 1 and 2, respectively. The linear regressions that were traced over the breath-by-breath values post-DI in each protocol allow a visual comparison of the rate and the extent of renarrowing between protocols. n = 10

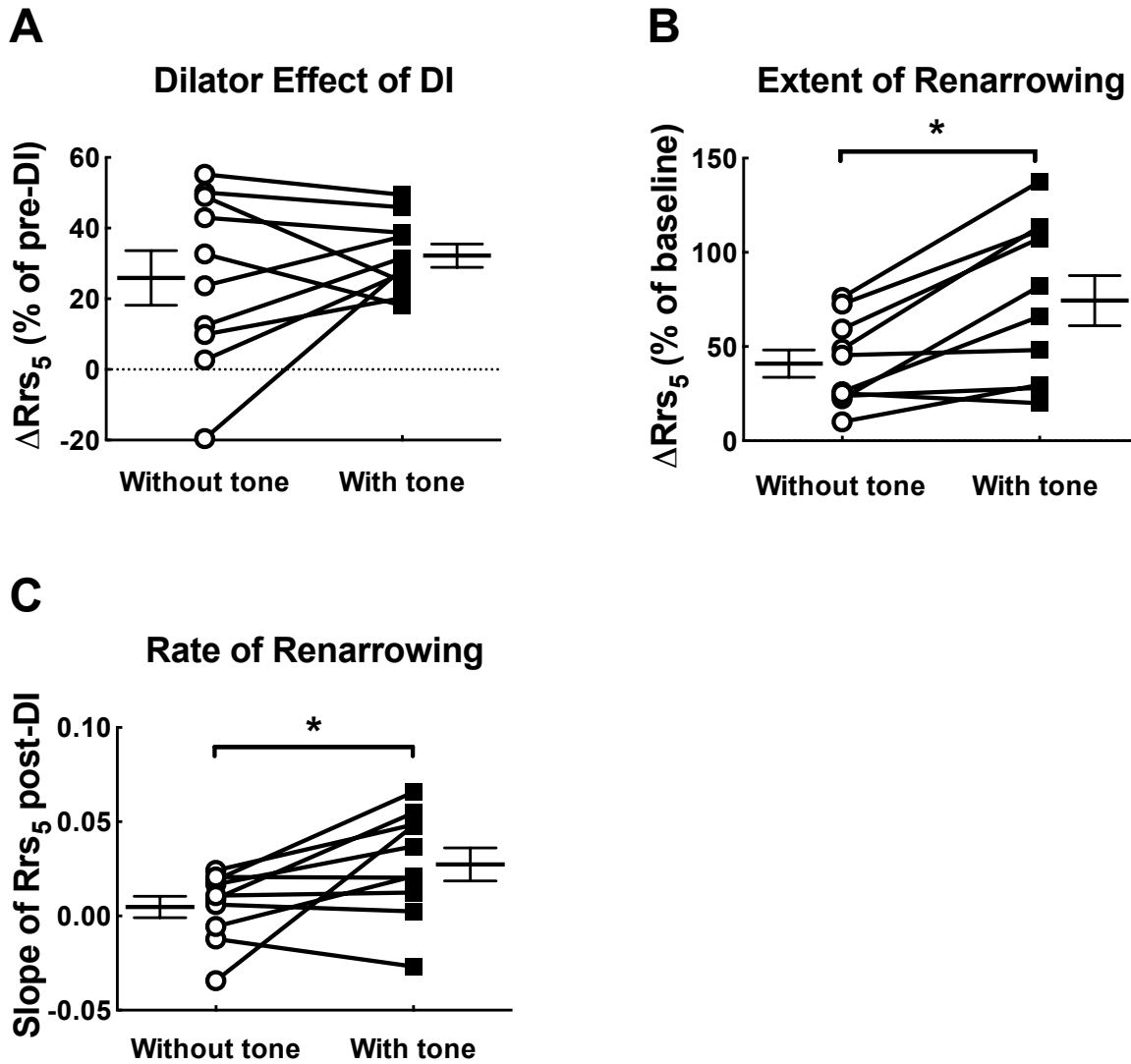


Figure 2.6. The dilator effect of DI as well as the ensuing extent and rate of renarrowing are compared between protocol 1 (without tone; empty circles) and protocol 2 (with tone; full squares). The dilator effect (A) was the difference between the average Rrs_5 pre-DI and the average Rrs_5 over the first breath post-DI, expressed as percentage of the average Rrs_5 pre-DI. The extent of renarrowing (B) was the difference between the average Rrs_5 over the first breath post-DI and the highest single-breath Rrs_5 post-DI, expressed in percentage of baseline Rrs_5 . The rate of renarrowing (C) was the slope of a linear regression traced over the breath-by-breath analysis of Rrs_5 post-DI. The results between protocols within each subject are linked by a line. The symbols flanking the individual results are the means and SEM. * denotes statistically significant differences between protocols. n = 10

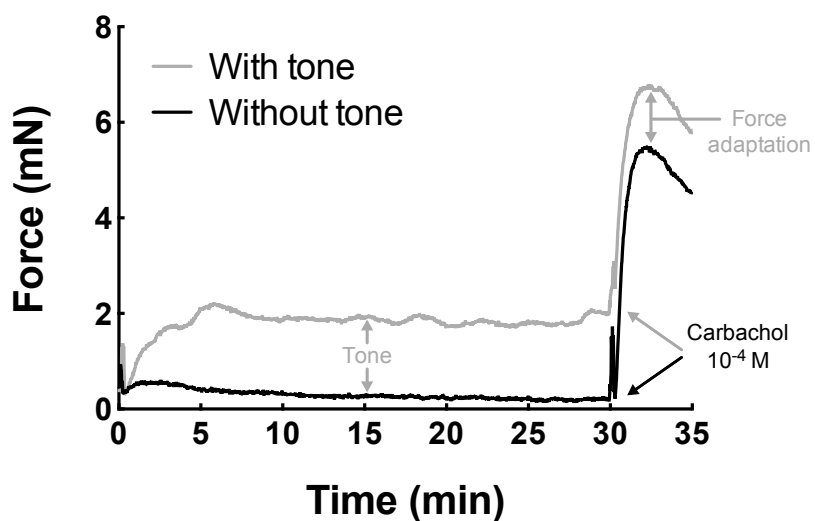


Figure 2.7. Tone increases the contractile capacity of human bronchi. Isolated bronchi were submitted to two sequences in a randomized order. Each sequence began with a 30 min period during which the bronchi were either left untreated (gray trace) or stimulated with the EC30 of carbachol (black trace) to induce tone. In each sequence, the organ bath solution was then changed with fresh solution containing 10^{-4} M of CCh. The isometric force was monitored throughout. Each trace represents the average of 5 bronchi.

Chapitre III : Airway smooth muscle tone increases actin filamentogenesis and contractile capacity

Morgan Gazzola¹, Cyndi Henry¹, Katherine Lortie¹, Fatemeh Khadangi¹, Chan Young Park², Jeffrey J. Fredberg², Ynuk Bossé¹

¹Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, Québec;

²Harvard school of public health, Harvard University, Boston, MA

Running head: Force adaptation is due to actin filamentogenesis

Sources of funding:

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR PJT-387910), by the Respiratory Health Network of the FRQS (*Fonds de Recherche du Québec – Santé*), and by the NIH (P01HL120839, R01HL148152). MG and YB are research scholars from the FRQS.

3.1 Résumé

Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes est un phénomène dans lequel la présence d'un tonus (c.-à-d. contraction soutenue) augmente ses capacités contractiles. De plus, la présence d'un tonus a été démontrée pour augmenter la réactivité bronchique chez des souris et des humains en santé. Le but de cette étude est d'élucider les mécanismes moléculaires de ce phénomène. La force maximale de trachées de souris a été mesurée en réponse à une stimulation par une concentration de 10^{-4} M de MCh suivant une période de 30 minutes avec ou sans un tonus provoqué par l'EC30 de MCh. Pour confirmer la présence du gain de force à une échelle cellulaire, la force de traction générée par des cellules humaines de muscle lisse des voies aériennes a été mesurée suivant le même protocole. Différents inhibiteurs pharmacologiques ont été utilisés pour investiguer le rôle des protéines *Rho-associated coiled-coil kinase* (ROCK), *protein kinase C* (PKC) et de la polymérisation d'actine dans le phénomène du gain de force. Les niveaux de phosphorylation de la *myosin light chain* (MLC), les niveaux de polymérisation d'actine et l'état d'activation de la cofiline ont également été mesurés. Bien que ROCK, PKC et la phosphorylation de la MLC ne soient pas impliqués dans ce phénomène, le gain de force a été inhibé à la suite de l'inhibition de la polymérisation d'actine. De façon intéressante, la présence d'un tonus a bloqué l'activation de la cofiline en plus d'augmenter le nombre de filaments d'actine à un niveau maximal. Nous concluons que la filamentogénèse d'actine induite par un tonus, provoquée par la polymérisation d'actine et l'inhibition de la cofiline sont les principaux mécanismes du gain de force du muscle lisse des voies aériennes.

3.2 Abstract

Force adaptation of airway smooth muscle (ASM) is a process whereby the presence of tone (i.e., a sustained contraction) increases the contractile capacity. For example, tone has been shown to increase airway responsiveness in both healthy mice and humans. The goal of the present study is to elucidate the underlying molecular mechanisms. The maximal force generated by mouse tracheas was measured in response to 10^{-4} M of methacholine following a 30-min period with or without tone elicited by the EC30 of methacholine. To confirm the occurrence of force adaptation at the cellular level, traction force generated by cultured human ASM cells was also measured following a similar protocol. Different pharmacological inhibitors were used to investigate the role of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK), protein kinase C (PKC) and actin polymerization in force adaptation. The levels of myosin light chain (MLC) phosphorylation and actin polymerization, as well as the activation level of the actin-severing protein cofilin, were also quantified. Although ROCK, PKC and MLC phosphorylation were not implicated, force adaptation was prevented by inhibiting actin polymerization. Interestingly, the presence of tone blocked the activation of cofilin in addition to increase the level of actin filaments to a maximal level. We conclude that actin filamentogenesis induced by tone, due to both actin polymerization and the prevention of cofilin-mediated actin cleavage, is the main molecular mechanism underlying force adaptation.

Abstract is 227 words

3.3 Introduction

More than 330 million people worldwide are affected by asthma [2]. Despite the existence of many therapeutic options, several patients are refractory to current pharmacological treatments and remain symptomatic. This pathology is characterized by wheezing, cough, chest oppression and respiratory distress [2]. These symptoms are the consequences of several causes including airway inflammation, airway remodeling and airway hyperresponsiveness. Airway hyperresponsiveness may stem from an excessive contraction of airway smooth muscle (ASM) [291, 292]. However, the excessive contraction of asthmatic ASM has not always been observed *in vitro* in isolated tissues [90, 93, 95]. Therefore, whether ASM is hypercontractile in asthma, and thereby contributes to airway hyperresponsiveness, is still a matter of debate. Beyond the possibility of being intrinsically hypercontractile, many factors *in vivo* may promote airway hyperresponsiveness by increasing the contractile capacity of ASM [247, 293].

Force adaptation is a physiological phenomenon whereby the presence of tone (i.e., sustained contraction) increases the contractile capacity of ASM [103]. We have previously demonstrated that this phenomenon increases airway responsiveness *in vivo* in healthy mice and humans [104, 294]. Moreover, ASM tone was shown to be elevated in asthmatic patients [109]. Together, these results suggest that the acquired hypercontractility of ASM induced by tone could contribute to airway hyperresponsiveness in asthma. The underlying molecular mechanisms accounting for the gain in ASM contractility induced by tone have yet to be studied [103, 104, 294].

The molecular mechanisms governing the contraction of ASM can be analogized to a car, wherein the myosin serves as the engine and the actin cytoskeleton as the transmission [125]. On the one hand, the intracellular signaling pathways leading to the activation of the myosin can be broadly described as follows. Upon binding their cognate G protein coupled receptor (GPCR), classical contractile agonists, such as methacholine (MCh), trigger the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum, resulting in the phosphorylation of the 20-kDa myosin light chain (MLC₂₀) by MLC kinase [130, 143, 144, 182, 204, 269, 295]. Meanwhile, parallel pathways downstream of GPCR activation potentiate MLC phosphorylation by CPI-17-mediated inhibition of MLC phosphatase (MLCP) through Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) and protein kinase C (PKC) [130]. MLC phosphorylation finally leads to the cross-bridge cycling of the myosin head on actin

filaments, providing the mechanical work required for ASM contraction [126, 144, 296]. On the other hand, the intracellular signaling pathways leading to the reorganization of the actin cytoskeleton can be concisely described as follows. A series of post-translational events recruit a large number of proteins to the cell's cortical regions to form structures, called adhesomes, that remodel the cytoskeletal network [156, 157]. In this process, the filamentogenesis of actin is fundamental. Filamentogenesis relies on a dynamic and coordinated balance between proteins fostering actin polymerization, such as non-muscle myosin II (NMII), small GTPase Cdc42, neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and actin-related protein 2/3 (ARP2/3), and proteins severing actin filaments, such as cofilin [151-153, 158, 159]. Ultimately, newly formed actin filaments serve to solidify the physical linkages between the contractile apparatus inside the cells and the extracellular matrix, which then enables the mechanical force generated by the myosin cross-bridges to be transmitted more efficiently on the cytoskeletal network, across the plasmalemma and throughout the tissue [126, 297]. The goal of the present study is to elucidate whether force adaptation arises from a potentiation of the cross-bridge cycling enhancing the myosin motor, or from the filamentogenesis of actin enhancing the efficiency of the mechanotransmission.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Mouse tracheas

The *in vitro* experiments on ASM contraction were conducted on tracheas isolated from male C57BL/6J mice of eight to ten weeks old (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). The protocols were approved by the Committee of Animal Care of Laval University in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

3.4.2 Force measurements

Mice were euthanized with ketamine and xylazine at 200 and 10 mg/kg, respectively. The tracheas were then carefully removed from the animals and mounted in organ baths 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). More precisely, the whole tracheas were held horizontally between two stainless steel triangles, with one side of each running into the tracheal lumen and distending it to a resting tension of 4 mN. The tracheas were first subjected to a pre-conditioning period of approximately 1 hour, over which time they were stimulated repeatedly with 10⁻⁴ M of MCh until a reproducible force was measured. The responses to escalating concentrations of MCh were then measured to draw the concentration-response curve and determine the concentration of MCh producing 30% of the maximal contractile response, the EC30. This concentration was used to elicit tone. The effect of tone on the contractile capacity of ASM was assessed as previously described [104]. Briefly, the tracheas were subjected to two sequences of stimulation assessed in a randomized order. During one sequence, the tracheas were left unstimulated for 30 min and then the maximal force was determined by measuring the force generated by a supraphysiological concentration of MCh (10⁻⁴ M). During the second sequence, the tracheas were exposed to tone elicited by the EC30 of MCh (between 10⁻⁷ M and 10⁻⁶ M) for 30 min and then the maximal force was measured following the addition of 10⁻⁴ M of MCh. In the experiments involving pharmacological inhibitors, the tracheas were first incubated with a specific inhibitor for 1 hour. The two sequences described above were then repeated in a randomized order. The gain in maximal force induced by tone, before and after the incubation with the inhibitors, was then compared to assess the effect of the inhibitors on force adaptation.

3.4.3 Cell culture

Human airway smooth muscle cells (HASM) were obtained from Lonza (Basel, Switzerland). The cells grew in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% non-essential amino acids and 1% anti-mycotics/biotics (St-Jean Baptiste, Canada). The cells were used between passages 3 to 10. Before stimulation, they were plated and grew to confluence in 6-well plates. In order to differentiate them into a more contractile phenotype, they were then deprived of serum using DMEM supplemented with 1% FBS, 1% ITS, 1% L-Glutamine, 1% non-essential amino acids and 1% anti-mycotics/biotics [298]. The cells were then stimulated with: 1- PBS for 30 min (control); 2- 10⁻⁷ M of MCh for 30 min (tone); 3- PBS for 30 min followed by 10⁻⁴ M of MCh for 5 min (MCh); or 4- 10⁻⁷ M for 30 min to induce tone followed by 10⁻⁴ M of MCh for 5 min (tone + MCh) (Figure 1A).

3.4.4 Traction force microscopy

Traction force microscopy was performed as previously described [299]. Briefly, fluorescent beads were deposited on acrylamide gels with a Young modulus of 8 kPa in 96 well plates. The gels were then covered with a layer of collagen. The positions of the beads were measured using fluorescent microscopy and HASM cells were then seeded on these gels. The cells naturally attached to the collagen layer and spread on it. The cells were then differentiated and stimulated with MCh as described above. The forces exerted by HASMC on the collagen layer caused the gel to deform elastically. The positions of the beads were measured before and at different time points. At each time point, the displacements of the beads relative to their original positions (i.e., prior to cell seeding) were used to compute the average traction force in each well using a MATLAB algorithm. The change in the average traction force caused by MCh relative to baseline (i.e., prior to adding MCh) was then calculated and expressed as normalized changes in traction force.

3.4.5 MLC and cofilin phosphorylation

The stimulations described above were stopped by adding a lysis buffer in wells. To detect the phosphorylated form of MLC₂₀ (P-MLC₂₀), the lysis buffer contained 8 M of urea, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2% dithiothreitol (DTT), 50 mM trisHCl, 20 mM glycine, and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. To detect the phosphorylated form of cofilin (P-cofilin), the lysis buffer was RIPA (Sigma, St Louis MI) with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. The cells overlaid by the lysis buffer were scraped, and the harvested samples were centrifuged at 14.000 x g for 8 min. The supernatants were then collected and mixed with a loading buffer (β -mercaptoethanol 0.1%, SDS 2%, glycerol 30%, bromophenol blue 0.0005%) before being boiled at 95 °C for 5 min. The proteins were separated on a 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Non-specific binding sites were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-tween 0.1% for 1 hour and the membranes were then probed with the primary antibody against P-MLC₂₀ (1/2000) or P-cofilin (1/5000) overnight. After dully washings, the membranes were incubated with a secondary antibody coupled with a horseradish peroxidase (1/8000) for 1 h and washed again. The proteins were visualized using a Bio-Rad ChemiDoc XRS detection system (Hercules, CA) and the bands were quantified using Image Lab software. The membranes

were then incubated in stripping buffer (1% tween20, 0.1% SDS, 200 mM glycine) for 10 min to remove antibodies and the process was repeated with a primary antibody against either MLC₂₀ (1/4000) or cofilin (1/5000).

3.4.6 Immunofluorescence

The cells were grown on glass slides in 6-well plates. Following the stimulations described above, the cells were fixed by covering them with fresh ice cold 4% PFA in PBS for 10 min. The cells were then rinsed in PBS for 5 min twice, permeabilized by covering them with 0.2% triton X100 during 5 min and incubated an hour in a solution of 1% BSA to block non-specific binding sites. They were then incubated with TRITC-conjugated phalloidin (1/200) and AlexaFluor488-conjugated DNase I (1/300) for 30 min to stain the filamentous form of actin (F-actin) and the monomeric form of actin (G-actin), respectively. Finally, after 4 rinses in PBS, the mounting solution containing DAPI was added and the slides were left to dry overnight at 4 °C. The slides were scanned with a confocal microscope (Zeiss LSM800) using a 1.4 NA and a 20X objective.

3.4.7 Statistical Analysis

Unless otherwise specified, the data shown are means \pm SD. According to the experimental design, the data were analyzed with t-tests, one-way ANOVAs or two-way ANOVAs using Prism 8 (GraphPad, San Diego). $p \leq 0.05$ was considered significant.

3.5 Results

3.5.1 Force adaptation in isolated mouse tracheas

The protocol used to test force adaptation on mouse tracheas is displayed in Figure 1A. Briefly, the tracheas were exposed to the EC30 of MCh (tone) or PBS (no tone) for 30 min and then stimulated with a supraphysiological concentration of MCh to assess the maximal contractile capacity. The average traces of force with or without tone are shown in Figure

1B. As previously reported, pre-exposure to tone increased the maximal contractile capacity [103, 104, 294]. Notably, the pattern of contraction was also significantly modified by tone (see the zoomed area of Figure 2B). Without tone, the first part of contraction elicited by 10^{-4} M of MCh was quick and then a second part was slowly developing. This was not observed following a period of tone. In fact, the maximal force generated by 10^{-4} M of MCh was quickly reached with pre-exposure to tone. In order to quantify the effect of force adaptation (i.e., the gain of force induced by tone), we measured the area under the curve of force over the last 5 min with 10^{-4} M of MCh and compared the sequences with and without tone. The results are presented in Figure 1C. On average, tone increased the maximal contractile capacity of mouse tracheas by $20.6 \pm 15.7\%$.

3.5.2 Force adaptation with cultured HASMC

Human airway smooth muscle cells (HASMC) in culture were subjected to the protocol displayed in Figure 1A. The average traction force of HASMC was measured at 1 min and every 5 min during 30 min with or without tone elicited by 10^{-7} M of MCh. The cells were then stimulated with 10^{-4} M of MCh and the traction force was measured after 1, 3 and 6 min. The change in traction force in response to MCh in each well was normalized to its own baseline and expressed as normalized traction force. The results are presented in Figure 2A. For each well, the area under curve of the normalized traction force between 1 and 6 min after adding 10^{-4} M of MCh was measured and compared between the sequences with and without tone. As seen in Figure 2C, tone significantly increased the average traction force exerted by HASMC in response to 10^{-4} M of MCh.

3.5.3 ROCK and PKC in force adaptation

The role of ROCK and PKC in force adaptation was evaluated with pharmacological inhibitors on mouse tracheas. Each trachea was subjected to the protocol displayed in Figure 1A with and without a pharmacological inhibitor. The effect of ROCK inhibitors Y27632 and H1152P, and the PKC inhibitor BIM-X on force adaptation are presented on the right side of Figure 3A, B and C, respectively. The corresponding controls are presented on the left side. On average, Y27632, H1152P and BIM-X diminished force by $43.4 \pm 14.4\%$,

49.5 ± 12.1% and 9.3 ± 12.4%, respectively. However, force adaptation was not affected, amounting to 25.4 ± 15.4%, 36.4 ± 19.4% and 23.3 ± 6.7% in the presence of Y27632, H1152P and BIM-X, respectively.

3.5.4 MLC phosphorylation in force adaptation

The effect of tone on the phosphorylation level of MLC₂₀ was assessed by western blots in cultured HASMC. The cells were stimulated with MCh according to the protocol displayed in Figure 1A. A representative western blot is presented in Figure 4A. The increase in the phosphorylation of MLC₂₀ was quantified by measuring the ratio of the phosphorylated MLC₂₀ over the total MLC₂₀ for each experimental condition. The compiled data are presented in Figure 4B. A clear increase in MLC₂₀ phosphorylation was observed following the stimulation with 10⁻⁴ M of MCh. However, the level of MLC₂₀ phosphorylation reached in response to 10⁻⁴ M of MCh was not potentiated by pre-exposure to tone.

3.5.5 Actin filamentogenesis in force adaptation

Actin filamentogenesis was quantified by confocal microscopy in HASMC. Again, the cells were stimulated with MCh according to the protocol displayed in Figure 1A. Representative images of F-actin, as well as their corresponding fields of G-actin and merged fields, are presented in Figure 5A. The fluorescent intensities of F-actin and G-actin were measured and the changes in their ratios in response to MCh was used to quantify actin filamentogenesis. The compiled data are presented in Figure 5B. As expected, stimulations with 10⁻⁴ M of MCh for 5 min increased the ratio of F- to G-actin in cells not pre-exposed to tone. More surprisingly, these ratios were even more increased with tone alone (i.e., 10⁻⁷ M of MCh for 30 min), which was not further potentiated with an additional 5 min of stimulation with 10⁻⁴ M of MCh.

3.5.6 Actin polymerization in force adaptation

The role of actin polymerization on force adaptation was evaluated with pharmacological inhibitors on mouse tracheas. Each trachea was subjected to the protocol displayed in Figure 1A with and without a pharmacological inhibitor. The polymerization of actin was prevented either indirectly by blocking NMII with blebbistatin, or directly by blocking the upstream catalyst of actin polymerization ARP2/3 with CK666 or the binding of G-actin on F-actin with latrunculin A. The results with blebbistatin, CK666 and latrunculin A are presented on the right side of Figure 6A, B and C, respectively. The corresponding controls are presented on the left side. On average, blebbistatin, CK666 and latrunculin A diminished force by $50.3 \pm 18.5\%$, $67.8 \pm 6.8\%$ and $79.2 \pm 6.9\%$, respectively. While force adaptation was not affected by blebbistatin, amounting to $18.7 \pm 23.5\%$, force adaptation was completely inhibited by CK666 and latrunculin A.

3.5.7 Tone and cofilin activation

The effect of tone on the phosphorylation level of cofilin was assessed by western blots in cultured HASMC. The cells were stimulated with 10^{-4} M of MCh for 1, 3 and 5 min with or without pre-exposure to tone for 30 min. A representative blot is presented in Figure 7A. The level of cofilin phosphorylation was quantified by measuring the ratio of phosphorylated cofilin (P-cofilin) over total cofilin for each experimental condition. The compiled data are presented in Figure 7B. A clear decrease in cofilin phosphorylation (i.e., activated cofilin) was observed for the first 3 min following stimulation with 10^{-4} M of MCh. However, this dephosphorylation was entirely prevented by pre-exposure to tone.

3.6 Discussion

The underlying molecular mechanisms governing force adaptation remain to be defined. In the present study, we set forward a series of experiments to determine whether force adaptation of ASM results from a functional potentiation of either myosin or actin in contractility. Pertaining to myosin, the results demonstrate that blocking ROCK or PKC did not inhibit force adaptation. The results also demonstrate that MLC_{20} phosphorylation was not enhanced by tone. Pertaining to actin, the results demonstrate that blocking Arp2/3 and actin polymerization, but not NMII, inhibited force adaptation. The results also demonstrate

that tone maximized the formation of actin filaments and blocked the activation of cofilin. Taken together, these results suggest that force adaptation is not mediated by a functional potentiation of myosin but rather arises due to the potentiation of actin's functional role in ASM contractility.

Force adaptation is a phenomenon whereby ASM acquires supplemental contractile capacity over the course of a sustained contraction (i.e., a tone). The phenomenon was first discovered on sheep tracheal strips and then confirmed on mouse tracheas and human bronchi [103-105, 294]. Recent studies also demonstrated that exposing ASM to tone *in vivo* increases airway responsiveness in both healthy mice and humans [104, 294]. Together, these findings would predict that the elevated tone observed in asthmatic individuals contributes to airway hyperresponsiveness by increasing the contractile capacity of ASM. Notably, the gain in contractile capacity induced by tone is also quickly reversible when tone is removed [106]. The reversible nature of this phenomenon could thus contribute to the variable component of airway hyperresponsiveness, which waxes and wanes according to the degree of inflammation [249, 300]. Thus, shedding lights on the molecular mechanisms underlying force adaptation may not only improve our understanding of airway hyperresponsiveness but also provide clues regarding the origin of its instability.

Our previous studies on force adaptation were all conducted either at the tissue scale or at the *in vivo* scale. In order to rationalize the possibility of using HASMC to scrutinize the molecular mechanisms underlying force adaptation, the initial onus consisted at confirming the occurrence of force adaptation at the cellular scale. Indeed, just because a phenomenon occurs at two higher length scales does not mean that it will manifest itself at a lower scale [301]. The results presented in Figure 2 demonstrate that tone elicited by 10^{-7} M of MCh increased the traction force of cultured HASMC in response to 10^{-4} M of MCh. This finding is acting as a proof of concept, confirming that force adaptation occurs at the cellular scale. It also justified the pursuit of our molecular investigation on force adaptation with HASMC.

If myosin acts as the engine and the actin as the transmission [125], here we studied these two systems separately. To decipher whether force adaptation relies on a functional potentiation of myosin, we first investigated the role of ROCK and PKC. These proteins are well described to potentiate MLC_{20} phosphorylation by inhibiting MLCP, which then increases the force generated by ASM [130, 203, 207, 302]. As expected, their inhibition with pharmacological inhibitors provoked a substantial decrease in the force generated by

mouse tracheas. However, neither ROCK nor PKC inhibition affected the gain in force induced by tone (i.e., force adaptation). In combination, these results suggest that although ROCK and PKC are important signaling proteins involved in ASM contraction, they are not the ones implicated in force adaptation. To exclude the functional potentiation of myosin in force adaptation, we directly measured the phosphorylation of MLC₂₀ in HASMC in response to 10⁻⁴ M of MCh after a preceded period with or without tone. Although MLC₂₀ phosphorylation increased after stimulation as expected, the level of phosphorylation reached was not different with or without preceded tone. This result suggests, once again, that force adaptation do not rely on a functional potentiation of myosin activation.

To decipher whether force adaptation relies on a functional potentiation of actin, we first evaluated the expression of F- and G-actin by confocal microscopy. The change in the ratio of F- to G-actin following a stimulation can be used as a surrogate for quantifying actin filamentogenesis. We use the term 'filamentogenesis' here instead of 'polymerization' because in a dynamic system where the number of filaments is determined by an equilibrium between their genesis and their degradation, an increased ratio of F- to G-actin can arise from an increase in polymerization, a decrease in depolymerization or both. As expected, actin filamentogenesis occurred during a 5-min stimulation with 10⁻⁴ M of MCh. More surprisingly, actin filamentogenesis was further increased after 30 min of tone elicited by 10⁻⁷ M of MCh. More interestingly, no additional increase was observed with the addition of 10⁻⁴ M of MCh following 30 min of tone. This result indicates that tone alone maximized the amount of newly formed actin filaments in HASMC upon contractile activation.

As demonstrated by others, the role of actin filamentogenesis during contraction is to enhance the transmission of force by reinforcing the links between the actin cytoskeleton and the membrane adhesion sites [157, 303, 304]. Our results thus raise the possibility that an improved mechanotransmission due to actin filamentogenesis may underlie force adaptation. The different patterns of contraction seen in response to 10⁻⁴ M of MCh following a period with or without tone are consistent with this premise (Figure 1). In fact, the maximal force generated by 10⁻⁴ M of MCh after a period of tone was rapidly reached. This implies that the molecular machinery liable for the generation of force was already optimized. In stark contrast, the force generated in response to 10⁻⁴ M of MCh was slowly developing when preceded by a period without tone. This implies that a time-dependent molecular mechanism, perhaps actin filamentogenesis, first needed to take place in order for the muscle to reach a maximal force.

To further explore the role of actin dynamics in force adaptation, essential proteins in pathways indirectly or directly involved in actin polymerization were inhibited. On the one hand, indirect interference with actin polymerization was achieved by blocking NMII with blebbistatin. NMII recruits important structural/scaffolding proteins at membrane adhesion sites, which are then required to catalyze actin polymerization [150]. The results of the present study demonstrate that blocking NMII provoked a strong decrease in ASM force but did not affect force adaptation. This is also consistent with the aforementioned results obtained with the ROCK inhibitors, as ROCK was also described to act upstream of NMII in addition to inhibit MLCP [305]. In combination, the results obtained with ROCK and NMII inhibitors suggest that although the translocation of structural/scaffolding proteins to membrane adhesion sites are required for optimal force generation, they are not responsible for the time-dependent increase in force induced by tone. On the other hand, a direct interference with actin polymerization was achieved either by blocking the actin polymerization catalyst ARP2/3 complex with CK666 or by using latrunculin A. Each intervention significantly decreased ASM force, confirming the importance of actin polymerization in ASM contraction. More relevant to the present study, both interventions completely prevented the gain in force induced by tone. These results suggest that actin polymerization is required for force adaptation.

To probe whether a changing rate of actin depolymerization may also contribute to tone-induced actin filamentogenesis, the effect of tone on the actin-severing protein cofilin was evaluated. This protein is activated by dephosphorylation at serine 3. Following its activation, it binds to actin filaments and cleaves them to provide new free barbed ends required for nascent actin polymerization [126, 158, 159, 306]. In the present study, cofilin was quickly dephosphorylated after stimulation with 10^{-4} M of MCh. However, mechanisms that prevent its prolonged activation might be at play because it was also quickly de-activated. This transient activation of cofilin is consistent with its role in the creation of new barbed ends early in the contraction, which then enables the remodeling of the actin network and the firm attachment of the contractile apparatus at the cell cortex. Surprisingly, tone completely prevented the activation of cofilin induced by 10^{-4} M of MCh. One can presume that the mechanisms that prevent the prolonged activation of cofilin remain operational as long as tone elicited by a low concentration of MCh is present. As a result, the lack of dephosphorylation of cofilin in response to a greater concentration of MCh may prevent the

cleavage of F-actin, thereby increasing filament stability and contributing to tone-induced actin filamentogenesis.

3.7 Conclusion

In conclusion, we demonstrate that force adaptation occurred in vitro in cultured HASMC. We also demonstrate that force adaptation relied on a time-dependent process requiring actin polymerization. The fact that tone maximized actin filamentogenesis, prevented the activation of the actin-severing protein cofilin and quickened the rate at which the maximal force was reached in response to a supraphysiological concentration of MCh further support the role of actin remodeling in force adaptation. We also provide strong evidences that this phenomenon was not mediated by a functional potentiation of myosin and that it occurred even when the recruitment of adhesomal proteins to the cell's cortex are prevented. We conclude that a sustained level of contraction, even when small in magnitude (which is typically the case for tone), triggers a restructuration of the actin cytoskeleton that increases the contractile capacity of ASM by improving the efficiency of the mechanotransmission between the contractile apparatus and the extracellular matrix. This mechanism would thus be liable for force adaptation. The detailed molecular mechanisms governing the filamentogenesis of actin induced by tone will require further investigation.

3.8 Figures

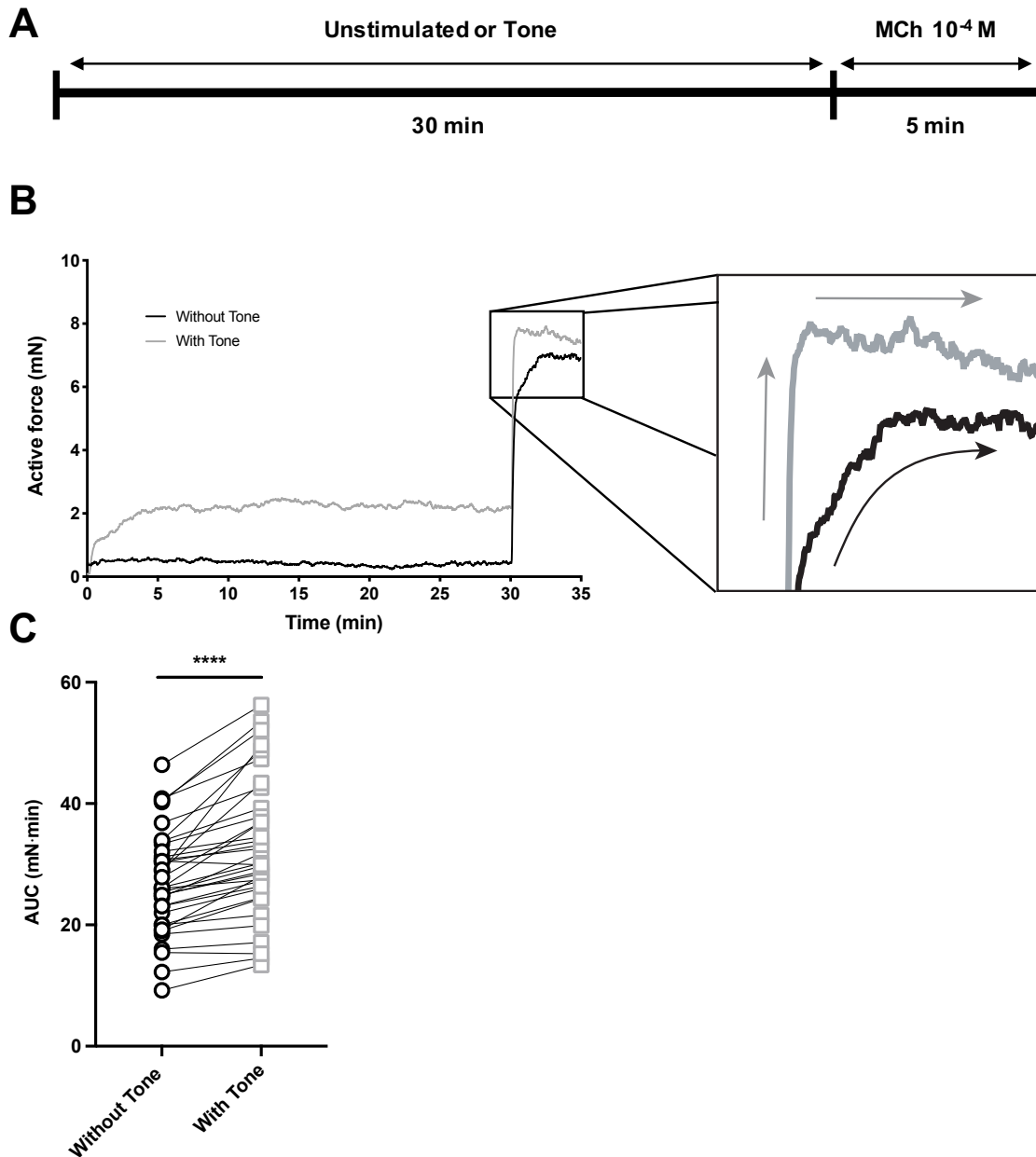


Figure 3.1. Force adaptation in organ baths. A – The protocol to test force adaptation on tracheas isolated from C57BL/6J mice. The tracheas were left unstimulated or exposed to tone in a randomized order for 30 min and then stimulated with a supraphysiological concentration of methacholine (10^{-4} M) for 5 min. Tone was elicited by the EC30 of methacholine. B – Average traces of force with (grey) and without (black) tone are depicted. The last 5 min of stimulation is zoomed to better visualize the pattern of contraction in

response to 10^{-4} M of methacholine. C – The force was quantified by measuring the area under curve (AUC) over the last 5 min and compared between the sequence with (grey squares) and without (black circles) tone. The data presented here are the combination of all the results shown on the left part of each graph in Figure 3 and Figure 6. The asterisks denote a statistically significant difference between the sequences with and without tone (**** is $p < 0.0001$). $n = 35$

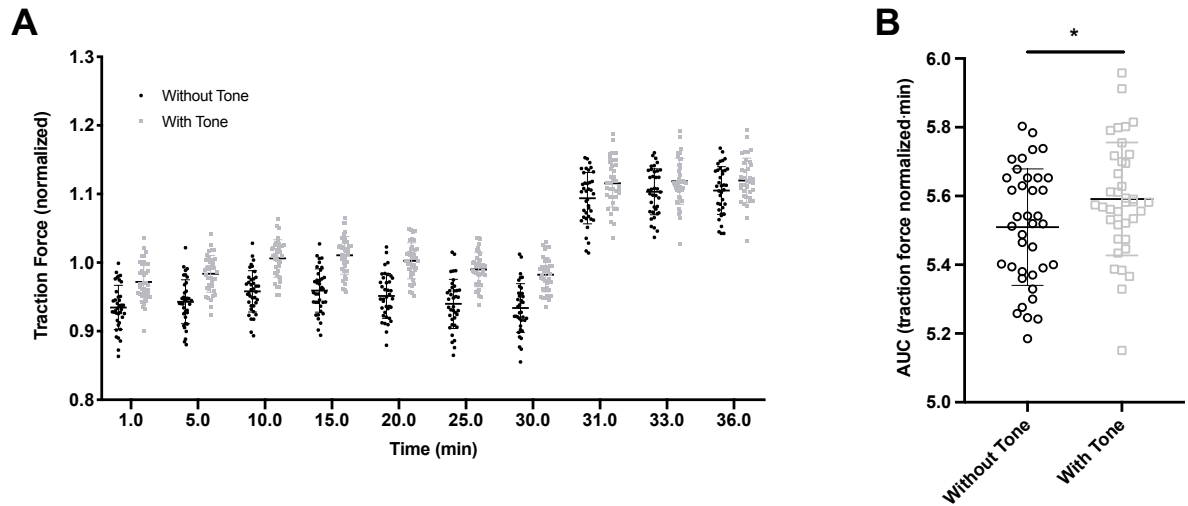


Figure 3.2. Force adaptation in cultured cells. A – Human airway smooth muscle cells were subjected to the protocol displayed in Figure 1A. Traction force was measured at 1 min and every 5 min during 30 min with (grey) or without (black) tone, as well as after 1, 3 and 6 min after the introduction of 10^{-4} M of methacholine. Traction force at each indicated time was normalized to baseline. B – As in Figure 1C, the force was quantified by measuring the area under curve (AUC) between 1 and 6 min after adding methacholine at 10^{-4} M and compared between the sequences with (grey) and without (black) tone. The asterisk denotes a statistically significant difference between treatment groups (* is $p < 0.05$). $n = 38$

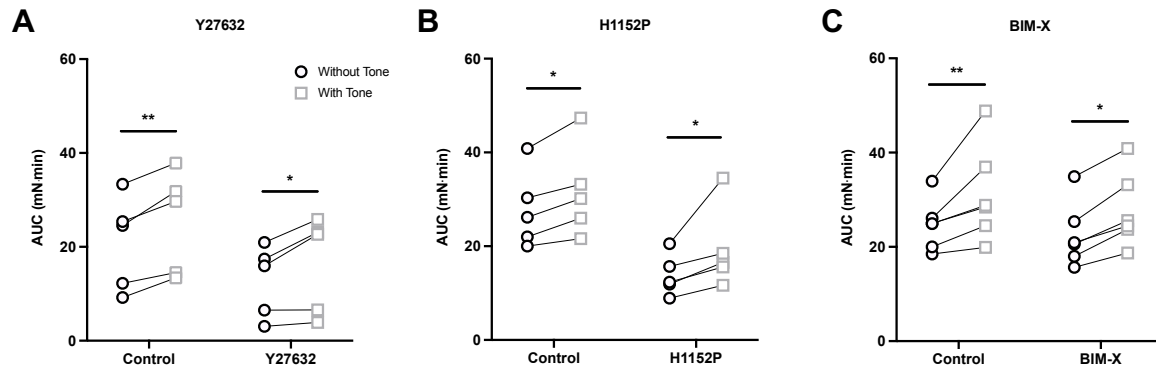


Figure 3.3. Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) and protein kinase C (PKC) in force adaptation. A - C – The tracheas were first subjected to the protocol displayed in Figure 1A and the force over the last 5 min was determined as in Figure 1C (left part of each A, B & C). The tracheas were then incubated for 1 h with ROCK inhibitors, either Y27632 (3 μ M) or H1152P (1 μ M), or the PKC inhibitor BIM-X (140 μ M). The protocol was then repeated in the presence of the inhibitors and the force over the last 5 min was determined again (right part of each A, B & C). The asterisks denote statistically significant differences between the sequences with and without tone (* and ** are $p < 0.05$ and 0.01, respectively). $n = 5, 5$ & 6 for A, B & C, respectively.

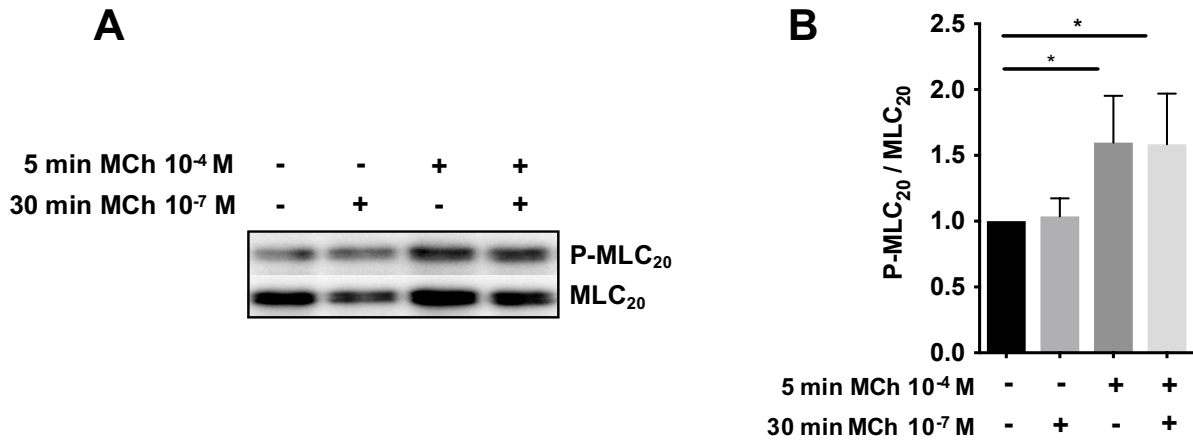


Figure 3.4. Myosin light chain phosphorylation (P-MLC₂₀) in force adaptation. A – A representative western blot showing the level of MLC₂₀ phosphorylation in cultured human airway smooth muscle stimulated with methacholine (MCh) at concentrations and for durations specified in the protocol displayed in Figure 1A. B – A bar graph depicting the average ratio of phosphorylated MLC₂₀ (P-MLC₂₀) over total MLC₂₀ for each treatment group relative to unstimulated cells. Values are means \pm SEM. The asterisks denote statistically significant differences between the compared treatment groups (* is $p < 0.05$). $n = 7$

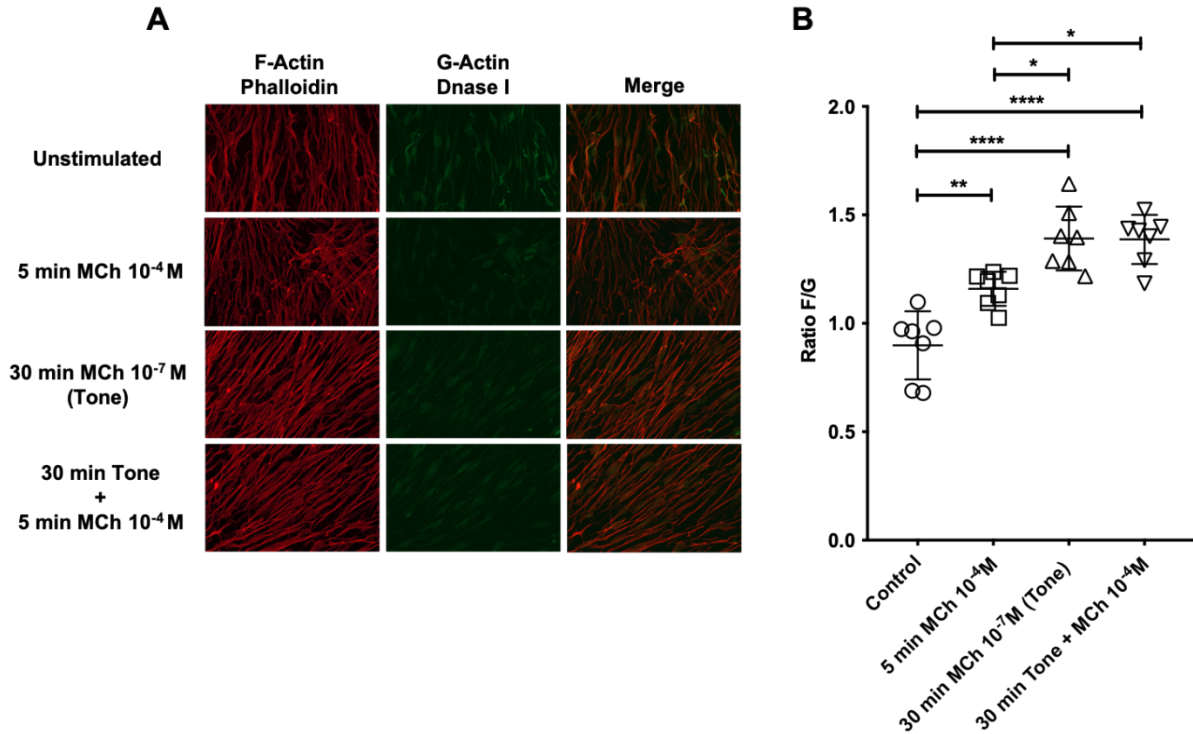


Figure 3.5. Actin filamentogenesis in force adaptation. A – Actin filaments (left panels), the monomeric form of actin (middle panels) and their overlaps (right panels) were visualized using confocal microscopy in cultured human airway smooth muscle cells stimulated with methacholine (MCh) at concentrations and for durations specified in the protocol displayed in Figure 1A. B – A dot plot depicting ratios of fluorescent intensities of actin filaments (F) over the monomeric form of actin (G) for each treatment group. The asterisks denote statistically significant differences between the compared treatment groups (*, ** and *** are $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 , respectively). $n = 7$.

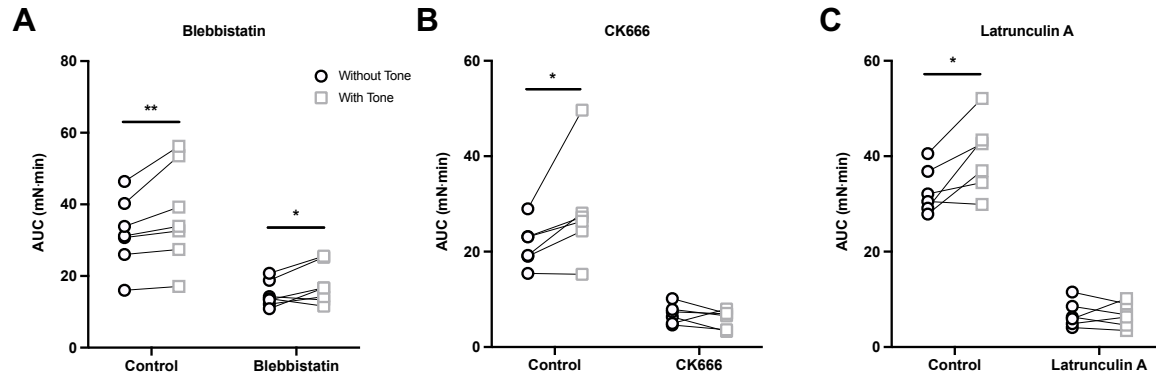


Figure 3.6. Actin polymerization in force adaptation. A - C – The tracheas were first subjected to the protocol displayed in Figure 1A and the force over the last 5 min was determined as in Figure 1C (left par of each A, B & C). The tracheas were then incubated for 1 h with the non-muscle myosin II (NMII) inhibitor blebbistatin (10 μ M), the actin-related protein 2/3 (ARP2/3) inhibitor CK666 (170 μ M), or the actin polymerization inhibitor latrunculin A (100 nM). The protocol was then repeated in the presence of the inhibitors and the force over the last 5 min was determined again (right par of each A, B & C). The asterisks denote statistically significant differences between the sequences with and without tone (* and ** are $p < 0.05$ and 0.01 , respectively). $n = 7, 6$ & 6 for A, B & C, respectively.

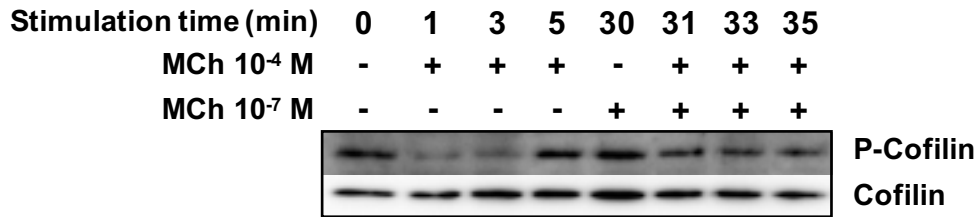
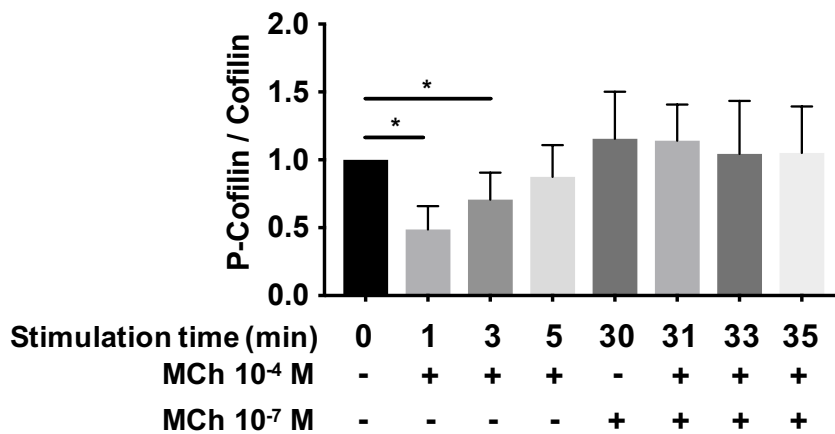
A**B**

Figure 3.7. Preventing the re-activation of the actin-severing protein cofilin in force adaptation. A – A representative western blot showing the level of cofilin phosphorylation (inactive form) at the indicated time points following stimulations with the indicated concentrations of methacholine (MCh) in human airway smooth muscle cells. B – A bar graph depicting the average ratio of phosphorylated cofilin (P-cofilin) over total cofilin at each time point relative to the unstimulated cells. The asterisks denote statistically significant differences between the compared treatment groups (* is $p < 0.05$). $n = 8$

Chapitre IV : The effect of inflammation on ‘force adaptation’ in a mouse model of allergic asthma.

Morgan Gazzola¹, Cyndi Henry¹, Katherine Lortie¹, Magali Boucher¹, Fatemeh Khadangi¹, David Marsolais¹, Ynuk Bossé¹

¹Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, Québec

Sources of funding:

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR PJT-387910), by the Respiratory Health Network of the FRQS (*Fonds de Recherche du Québec – Santé*), and by the NIH (P01HL120839, R01HL148152). MG and YB are research scholars from the FRQS.

4.1 Résumé

L'hyperréactivité bronchique est définie par une baisse excessive des fonctions respiratoires en réponse à l'inhalation d'un bronchoconstricteur. Cette caractéristique de l'asthme pourrait être en partie due au gain de force du muscle lisse, un phénomène selon lequel la présence d'un tonus du muscle lisse des voies aériennes augmente la réactivité bronchique en réponse à la métacholine (MCh). Le but de cette étude est de déterminer si un tonus naturel causé par la présence de médiateurs inflammatoires provoque le gain de force dans un modèle murin d'asthme allergique. La réactivité bronchique a été mesurée grâce au flexiVent en réponse à la nébulisation intratrachéale d'une large dose de MCh, avec ou sans préexposition à un tonus provoqué par de faibles doses de MCh. Ces protocoles ont été réalisés avec des souris non traitées ainsi qu'avec des souris traitées par des instillations intranasales avec de la saline ou de la poudre d'acarien (HDM) pendant 10 jours consécutifs. Comme décrit précédemment chez la souris et l'humain, nous avons confirmé que le gain de force augmente la réactivité bronchique chez des souris non traitées. Tel que décrit chez l'humain, cet effet a été majoritairement observé dans les bronches périphériques, confirmé par de plus grandes différences d'élastance du système respiratoire (Ers), de l'élastance tissulaire (H) et de la résistance du système respiratoire (Rrs) lorsque les souris non traitées avec ou sans préexposition à un tonus étaient comparées. En revanche, le gain de force n'a pas été observé ni dans les souris traitées à la saline, ni dans les souris traitées au HDM. D'autres études seront requises afin de déterminer si le gain de force contribue à l'hyperréactivité bronchique dans notre modèle murin d'asthme allergique.

4.2 Abstract

Airway hyperresponsiveness (AHR) is defined by an excessive fall in respiratory function following the inhalation of a bronchoconstrictor. This feature of asthma could be partly due to 'force adaptation', a process whereby the presence of an elevated ASM tone increases airway responsiveness in response to methacholine (MCh). The goal of the present study is to determine whether a naturally occurring tone caused by the presence of inflammatory mediators in a mouse model of allergic asthma provokes force adaptation. Airway responsiveness was measured with the flexiVent in response to the intratracheal nebulization of a large dose of MCh with or without a pre-exposure to tone elicited by small doses of MCh. These protocols were performed in untreated mice, as well as in mice treated intranasally with either saline or house dust mite (HDM) for 10 consecutive days. As previously described in mice and humans, we confirmed that force adaptation increases airway responsiveness in untreated mice. As described in humans, the effect was predominantly observed in peripheral bronchi testified by the greater differences in respiratory system elastance (Ers) and tissue elastance (H) than in respiratory system resistance (Rrs) when untreated mice with and without pre-exposure to tone were compared. However, force adaptation was not observed in either saline-treated mice or HDM-treated mice. Further studies will be required to determine whether force adaptation contributes to AHR in our mouse model of allergic asthma.

Abstract is 230 words

4.3 Introduction

Allergic asthma is a chronic obstructive lung disorder characterized by variable airflow obstruction associated with airway inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) [2, 61]. Despite the complexity and heterogeneity of this pathology, AHR is a consistent feature affecting the vast majority of asthmatic patients [96]. Defined for being an excessive fall in respiratory function following the inhalation of a spasmogen, the causes of AHR are still misunderstood. Moreover, whether the excessive airway smooth muscle (ASM) contraction involved in the AHR in asthma is associated with its intrinsic contractility or with its environment remains unclear [95, 96, 203, 291].

In this context, 'force adaptation' is a process whereby the presence of tone (i.e., sustained contraction) increases the contractile capacity of the ASM [103, 105]. This phenomenon, firstly observed *in vitro* with isolated tissues, was shown to increase airway responsiveness *in vivo* in healthy mice and humans [104, 294]. Moreover, the magnitude of ASM tone has been shown to correlate with the degree of airway responsiveness in healthy individuals [107]. One study also demonstrated that ASM tone is more elevated in asthmatic patients compared to control subjects [109]. Recently, we demonstrated that tone increases the contractile capacity of ASM by increasing actin filamentogenesis. Henceforth, understanding how an elevated ASM tone can contribute to AHR in asthma is thus paramount.

Murine models of allergic asthma are used to mimic the type of inflammation often found in the lungs of asthmatic patients. To ensure an 'asthma like' airway inflammation, several studies have used natural allergens, such as house dust mites (HDM), which act with a specific *modus operandi* that includes proteolysis [127, 307-310]. These allergens are the most commonly associated with asthma around the globe. Their properties have been recently reviewed [310]. Once these allergens contact the respiratory tract, epithelial cells release different mediators that activate the type 2 inflammatory response characterized by the presence of Th2 lymphocytes. These activated lymphocytes promote the recruitment of inflammatory cells found in the airways of asthmatic patients such as mastocytes and eosinophils [38]. The large number of molecules secreted by these cells directly acts on the contractility of the ASM and therefore increase its level of activation [247].

This increased activation (increased tone) may potentially contribute to the well-described AHR found in this mouse model of asthma [308, 309, 311]. Herein, we emit the hypothesis that the elevated tone caused by spasmogens found in allergic inflammation increases the

contractile capacity of ASM through the process of 'force adaptation' and thereby increases airway responsiveness.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Murine model of asthma

The experiments were conducted with female C57BL/6J mice of eight to ten weeks old (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). For the untreated group, the mice were left untouched during the treatment period. For the groups involving daily exposure to HDM or saline, the mice were randomly separated in 4 groups: 1- saline-treated mice without tone; 2- saline-treated mice with tone; 3- HDM-treated mice without tone; and 4- HDM-treated mice with tone. The 2 groups of saline-treated mice were treated intranasally with 25 μ l of saline once a day for 10 days under isoflurane anesthesia (Figure 1A). The 2 groups of HDM-treated mice were treated intranasally with 25 μ l of saline containing HDM extracts (*D. pteronyssinus*; Greer, Lenoir, NC, USA) once a day for 10 days under isoflurane anesthesia (Figure 1A). Airway responsiveness was tested 24h following the last exposure as described in the next section. This protocol was approved by the Committee of Animal Care of Laval University in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (#2014-016 & #2018-005).

4.4.2 Airway responsiveness

Airway responsiveness was assessed *in vivo* by estimating the changes in respiratory mechanics following the nebulization of MCh in anesthetized, paralyzed, tracheotomized and mechanically ventilated mice. More precisely, the mice were anesthetized with Ketamine-Xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively), tracheotomized and connected to a computer-controlled ventilator (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, QC, Canada). They were ventilated at 150 breaths per minute, with a tidal volume of 10 ml/kg and a positive end-expiratory pressure of 3 cmH₂O. Once ventilation was properly set, the mice were paralyzed with 0.1 mg/kg of pancuronium bromide injected intramuscularly. Respiratory system resistance (Rrs) and respiratory system elastance (Ers) were estimated by the flexiVent

using the perturbation called the SnapShot-150. Tissue damping (G), Tissue elastance (H) and Newtonian resistance (Rn) were estimated by the flexiVent using the perturbation called the Quick Prime-3. Heart rate was monitored during the whole procedure by electrocardiography to ensure correct anesthesia. The dosing regimen for MCh delivery is depicted in Figure 1B. The groups of mice 'without tone' were exposed to saline before being exposed to a final large dose of MCh. The groups of mice 'with tone' were exposed to a tone during 20 min before being exposed to a final large dose of MCh. Saline and MCh were delivered during the tidal breathing, and deep inspirations were avoided during the whole experiment. Tone was generated by the inhalation of four small doses of MCh 5 min apart: an initial dose of 10 mg/ml then three doses of 5 mg/ml. For the mice not exposed to tone, the shammed procedure consisted of nebulizing four times saline at the same intervals. A final large dose was then delivered after 5 min following the last exposure. The large dose was calculated so that each mouse was exposed to the same total concentration of 100 mg/ml; hence 75 mg/ml for the mice exposed to tone and 100 mg/ml for the mice not exposed to tone. For each saline or MCh dose delivery, respiratory mechanics was measured 2 times before and 8 times after the nebulization at 8 s intervals. The maximal response following the nebulization of the last dose of MCh were then compared in untreated mice, saline-treated mice and HDM-treated mice between the mice exposed to tone and the mice not exposed to tone. The maximal response following the nebulization of the last dose of MCh were also compared between saline treated mice not exposed to tone and HDM-treated mice not exposed to tone.

4.4.3 Airway Inflammation

Airway inflammation was quantified by counting the number of cells in bronchoalveolar lavages (BAL). Five min following the last inhalation of MCh, ventilation was stopped, and the mice were unplugged from the flexiVent. One ml of PBS was injected in the lung through the trachea using a syringe, the thorax was rubbed for 30 sec, and the PBS was harvested in a clean tube. The operation was repeated 3 times in order to collect 3 ml of BAL. The BAL were then centrifuged at 500 x g for 5 min to pellet inflammatory cells. The cells within the pellets were subsequently resuspended in either 100 or 500 μ l of PBS for cells derived from saline- or HDM-treated mice, respectively. One part of the resuspension was used to count the total number of cells with a hemocytometer. Another part was used to spread the cells

on a glass slide by a cytospin centrifugation, which was then stained with the Hemacolor kit (MilliporeSigma, Burlington, MA) to perform differential cell counts.

4.4.4 Statistical analysis

Data are shown as means \pm SD. Unpaired t-tests were used to compare maximal Rrs, Ers, G, H and Rn following the inhalation of the last dose of MCh between untreated mice with and without tone. Two-way ANOVAs were performed to assess statistical differences between experiments with and without tone in groups of saline-treated mice and HDM-treated mice. All statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism (San Diego, CA). $P \leq 0.05$ was deemed significant.

4.5 Results

4.5.1 Changes in respiratory system resistance and tissue damping

The protocol used to test force adaptation *in vivo* in mice is presented in Figure 1B. Briefly, changes in Rrs and G in response to a large dose of MCh were measured and compared between mice pre-exposed or not to tone. As previously reported [104], the Rrs of untreated mice pre-exposed to tone increased by 67.5% in response to a large dose of MCh compared to untreated mice not pre-exposed to tone (Figure 2A). In contrast, the pre-exposure to tone did not affect the Rrs of saline-treated mice and HDM-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 2B). However, for the groups of mice without pre-exposure to tone, the Rrs of HDM-treated mice increased by 61.1% compared to saline-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 2B).

The G of untreated mice pre-exposed to tone increased by 111.1% in response to a large dose of MCh compared to untreated mice not pre-exposed to tone (Figure 2C). In contrast, the pre-exposure to tone did not affect the G of saline-treated mice and HDM-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 2D). However, for the groups of mice without pre-exposure to tone, the G of HDM-treated mice increased by 93.6% compared to saline-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 2D).

4.5.2 Changes in respiratory system elastance and tissue elastance

Changes in Ers and H in response to a large dose of MCh were measured and compared between mice pre-exposed or not to tone. The Ers of untreated mice pre-exposed to tone increased by 155.9% in response to a large dose of MCh compared to untreated mice not pre-exposed to tone (Figure 3A). In contrast, the pre-exposure to tone did not affect the Ers of saline-treated mice and HDM-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 3B). However, for the groups of mice without pre-exposure to tone, the Ers of HDM-treated mice increased by 61.5% compared to saline-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 3B).

The H of untreated mice pre-exposed to tone increased by 152.4% in response to a large dose of MCh compared to untreated mice not pre-exposed to tone (Figure 3C). In contrast, the pre-exposure to tone did not affect the H of saline-treated mice and HDM-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 3D). However, for the groups of mice without pre-exposure to tone, the H of HDM-treated mice increased by 50.9% compared to saline-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 3D).

4.5.3 Changes in Newtonian resistance

Changes in Rn in response to a large dose of MCh were measured in mice pre-exposed to tone and compared with the response measured in mice not pre-exposed to tone. The pre-exposure to tone did not affect the Rn of untreated mice in response to a large dose of MCh (Figure 4A). Moreover, the pre-exposure to tone did not affect the Rn of saline-treated mice and HDM-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 4B). Finally, the Rn of HDM-treated mice didn't change compared to saline-treated mice in response to a large dose of MCh (Figure 4B).

4.5.4 HDM sensitization in lung Inflammation

The number of inflammatory cells in bronchoalveolar lavages (BAL) was counted to evaluate the degree of lung inflammation in saline- and HDM-treated mice. The treatment of mice with HDM was associated with a high increase in the absolute number of macrophages and

eosinophils compare to the treatment with saline ($1.03 \pm 0.48 \times 10^5$ and $2.67 \pm 1.24 \times 10^5$, respectively, Figure 5B), and with a slight increase in the absolute number of lymphocytes ($0.32 \pm 0.15 \times 10^5$, Figure 5B).

4.6 Discussion

The potential link between airway inflammation and the increase in airway responsiveness in asthma has yet to be elucidated. We confirmed in the present study that increasing ASM tone by repeated inhalation of small doses of MCh increases airway responsiveness in mice *in vivo* [104]. As previously demonstrated in humans [294], we observed that increased airway responsiveness caused by pre-exposure to tone is predominantly due to its effect in the peripheral bronchi. This is supported by the increase in G and H in response to a large dose of MCh following pre-exposure to tone in untreated mice compared to untreated mice not pre-exposed to tone. The lack of effect on Rn between mice pre-exposed or not to tone in response to a large dose of MCh is also consistent with alterations in the function of peripheral bronchi. Moreover, we demonstrated that AHR owing to HDM treatment is similarly due to effects on the peripheral bronchi: increase in G and H and absence of difference in Rn in response to a large dose of MCh between saline-treated mice not pre-exposed to tone and HDM-treated mice not pre-exposed to tone. Finally, we observed that increase in airway responsiveness induced by tone was prevented in HDM-treated mice. More surprisingly, the increase in airway responsiveness induced by tone was also prevented in saline-treated mice. Taken together, these results suggest that the increase in airway responsiveness caused by either tone or HDM treatment mainly involved the peripheral bronchi. However, absence of force adaptation in either saline-treated mice or HDM-treated mice is disconcerting. Further experiments will be required to determine whether force adaptation contributes to AHR in our murine model of allergic asthma.

‘Force adaptation’ is a process whereby the presence of an elevated tone (i.e., sustained contraction) triggered by spasmogens increases the contractile capacity of ASM [103-105]. This phenomenon, first observed *in vitro* with isolated tissues, has also been shown to increase airway responsiveness *in vivo* in healthy mice and humans [104, 294]. *In vivo*, an elevation of ASM tone can be induced by different kinds of spasmogens, such as inflammatory mediators [19, 112]. Thus, in pathologies marked by increased inflammatory

mediator secretion, as is seen in asthma, the subsequent increase in ASM tone could lead to the development of force adaptation and thereby to the development of AHR [247]. Moreover, the increase in ASM contractile capacity following the pre-exposure to tone has been shown to be quickly reversible when ASM tone decreases [104]. In asthma, the factors that contribute to AHR can be either transient, such as inflammation and mucus hypersecretion, or more permanent, such as airway wall and airway smooth muscle remodeling. Owing to the quick reversibility of force adaptation when tone is eliminated, we think that this phenomenon could be responsible of the elevation of airway responsiveness in asthma [104, 106]. Hence, determining whether inflammation in the context of allergic asthma affects force adaptation will give us a better understanding of possible links between force adaptation and AHR in asthma.

Our previous *in vivo* study in mice demonstrated that pre-exposure to tone elicited by the repeated inhalation of low doses of MCh increased Rrs in response to a large dose of MCh when compared to mice who were not pre-exposed to tone [104]. In addition, our study performed in healthy humans demonstrated that increases in airway responsiveness due to the pre-exposure to tone is caused by the peripheral bronchi without affecting larger airways [294]. As described in Figure 2A & C and Figure 3A & C, we observed in untreated mice that pre-exposure to tone increased Rrs, Ers, G and H in response to a large dose of MCh compared with mice who were not pre-exposed to tone. In contrast, as described in Figure 4A, we observed in untreated mice that pre-exposure to tone did not affect Rn in response to a large dose of MCh. Increases in Rrs, and Ers are representative of bronchoconstriction occurring throughout the whole respiratory system while increases in G and H are representative of bronchoconstriction occurring at the level of the peripheral bronchi. In contrast, increases in Rn are indicative of bronchoconstriction of larger airways [312]. Hence, these results demonstrate that force adaptation in untreated mice increases airway responsiveness by affecting peripheral bronchi without significantly affecting larger airways.

We further evaluated the effect of HDM treatment on airway responsiveness. In the groups of mice not pre-exposed to tone, we compared the effect of the inhalation of the large dose of MCh between saline- and HDM-treated mice. As described in Figure 2B & D and Figure 3B & D, we found that increases in Rrs, G, Ers and H in response to a large dose of MCh were further increased in HDM-treated mice than in saline treated mice. Moreover, as described in Figure 4B, we observed that increases in Rn in response to a large dose of MCh did not change between saline- and HDM-treated mice. These findings are consistent

to previous studies performed in mice sensitized with ovalbumin, where authors reported that ovalbumin treatment provoked an increase in G and H in response to a large dose of MCh without effect on Rn compared to vehicle-treated mice [313, 314]. Hence, these results suggest that, as with force adaptation, inflammation increases airway responsiveness due to peripheral bronchi without affecting larger airways.

We then evaluated the effect of tone in the response to a large dose of MCh in saline- and HDM-treated mice. As shown in Figure 2B & D and Figure 3B & D, we did not find any difference in Rrs, Ers, G or H in response to a large dose of MCh between mice pre-exposed or not to a tone, either for saline- and HDM-treated mice. Surprisingly, we observed a slight decrease in Rrs and G when HDM-treated mice were pre-exposed to tone (Figure 2B & D, non-significant). This effect may be due to an interaction with saline treatment. In fact, the maximal response following the inhalation of a large dose of MCh is the same between saline-treated mice pre-exposed to tone and HDM-treated mice pre-exposed to tone. Moreover, in saline- and HDM-treated mice, we did not observe any difference in Ers and H in response to a large dose of MCh with or without pre-exposure to tone. Here, the absence of an additional gain in Ers and H by the pre-exposure to tone may suggest that inflammation-derived spasmogens have already provoked 'force adaptation'. Nevertheless, the absence of 'force adaptation' in saline-treated mice requires further investigation.

We propose several hypotheses to explain the loss of 'force adaptation' in saline-treated mice: isoflurane and/or saline could have effects on 'force adaptation'. On one hand, a few studies have demonstrated that exposure to isoflurane during mechanical ventilation [315], or the addition of isoflurane in an organ bath [316], leads to decreased airway responsiveness in dogs and decreased rat ASM contractility, respectively. However, no studies have explored the effect of repeated exposure to isoflurane on airway responsiveness in mice. One study observed that hyporesponsiveness induced by volatile anesthetic disappeared after a short washout period (15-30 min) [317]. On the other hand, in 1987, a study demonstrated that challenging the airways of asthmatics with hypertonic saline induced a refractory period for subsequent challenges, up to 60 min after the initial challenge [318]. Authors also demonstrated that treating airways with hypertonic saline induced a refractory period to exercise-induced asthma [318]. Another study published in 2008 demonstrated that duration of the refractoriness to bronchoprovocation induced by hypertonic saline was at least 10 hours in asthmatics [319]. Although the saline used in our study was isotonic, perhaps repeated saline exposure over 10 days may have induced a

refractory period in these mice and protected them from further bronchoprovocation induced by MCh.

Finally, we evaluate the level of inflammation present in the lung of HDM-treated mice by conducting a differential cell count in BAL. This model is known to induce the recruitment of many inflammatory cells typically seen in the Th2 response, such as lymphocytes and eosinophils [307, 310, 320]. As depicted in Figure 5, inflammatory cells counted in the BAL of HDM-treated mice are representative of the inflammation found in a Th2 type inflammation. As expected, no eosinophils or lymphocytes were found in saline-treated mice.

4.7 Conclusion

In conclusion, we demonstrated in this study that the increase in airway responsiveness caused by either tone or HDM mainly stem from the peripheral bronchi. The absence of an additional gain in airway responsiveness by the pre-exposure to tone in HDM-treated mice may suggest that inflammation-derived spasmogens have already provoked 'force adaptation'. However, the absence of force adaptation in mice treated with saline is disconcerting. More experiments will be required to determine whether force adaptation contributes to AHR in our murine model of allergic asthma.

4.8 Figures

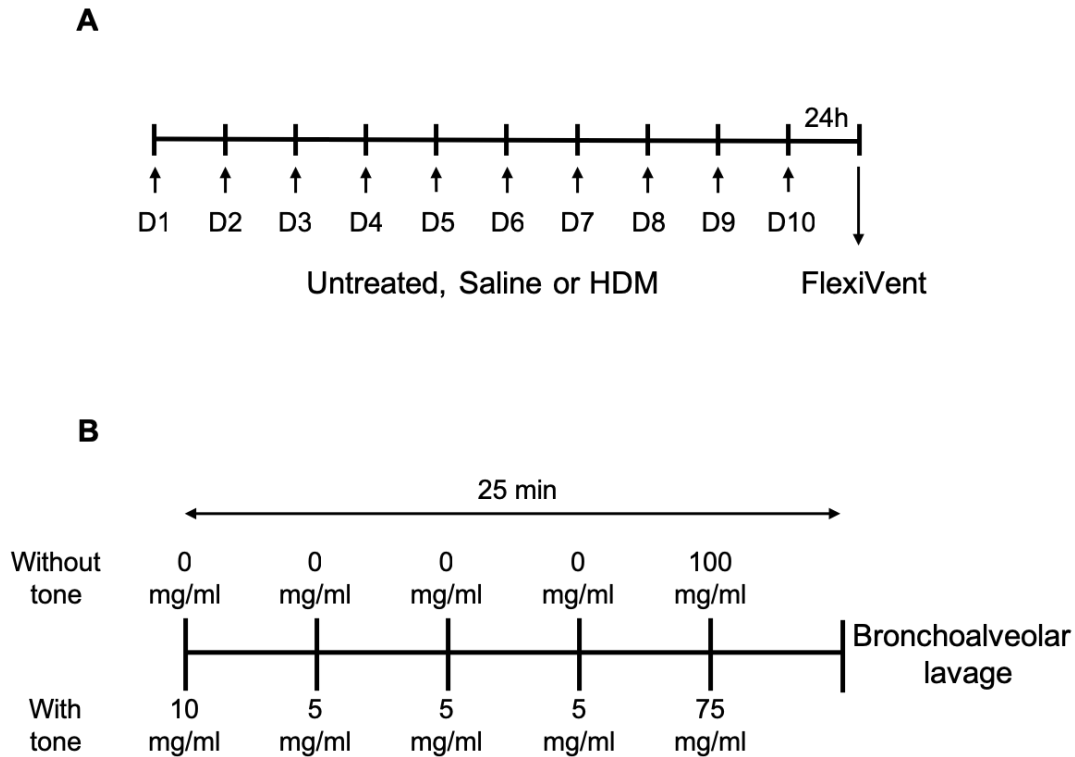


Figure 4.1. Protocols used to measure force adaptation in a mouse model of allergic asthma. A – The sequence of interventions carried out over 11 days on C57BL/6J mice. A group of mice was treated intranasally with 4 μ g of HDM diluted in 25 μ l of saline once a day for 10 days to induce allergic inflammation in the lungs. Another group was treated intranasally with 25 μ l of saline once a day for 10 days and a final group was neither treated with HDM nor saline. The latter two groups served as controls. At day 11, which represented 24 hours following the last exposure in the two former groups, respiratory mechanics was assessed with the flexiVent. B – The protocol to assess whether an increase in ASM tone affects airway responsiveness to MCh *in vivo*. Half of mice in each group were exposed to tone and the other half were not. Tone was induced by nebulizing directly into the trachea, 10, 5, 5, and 5 mg/ml of MCh 5 min apart (bottom part of B). The shammed procedure consisted of nebulizing saline repeatedly at the same intervals (top part of B). A final large dose was then administered. The large dose was calculated so that each mouse was exposed to the same total concentration of MCh of 100 mg/ml; hence 75 mg/ml for the mice exposed to tone and 100 mg/ml for the mice not exposed to tone. Different parameters were

estimated, such as respiratory system resistance (Rrs), respiratory system elastance (Ers), Newtonian resistance (Rn), tissue damping (G) and tissue elastance (H). The changes in each of these parameters caused by MCh were then compared between mice exposed or not to tone in each group. Bronchoalveolar lavages were also collected at the end of the protocol in the groups treated with saline and HDM once daily for 10 days to evaluate and compare the degree of airway inflammation.

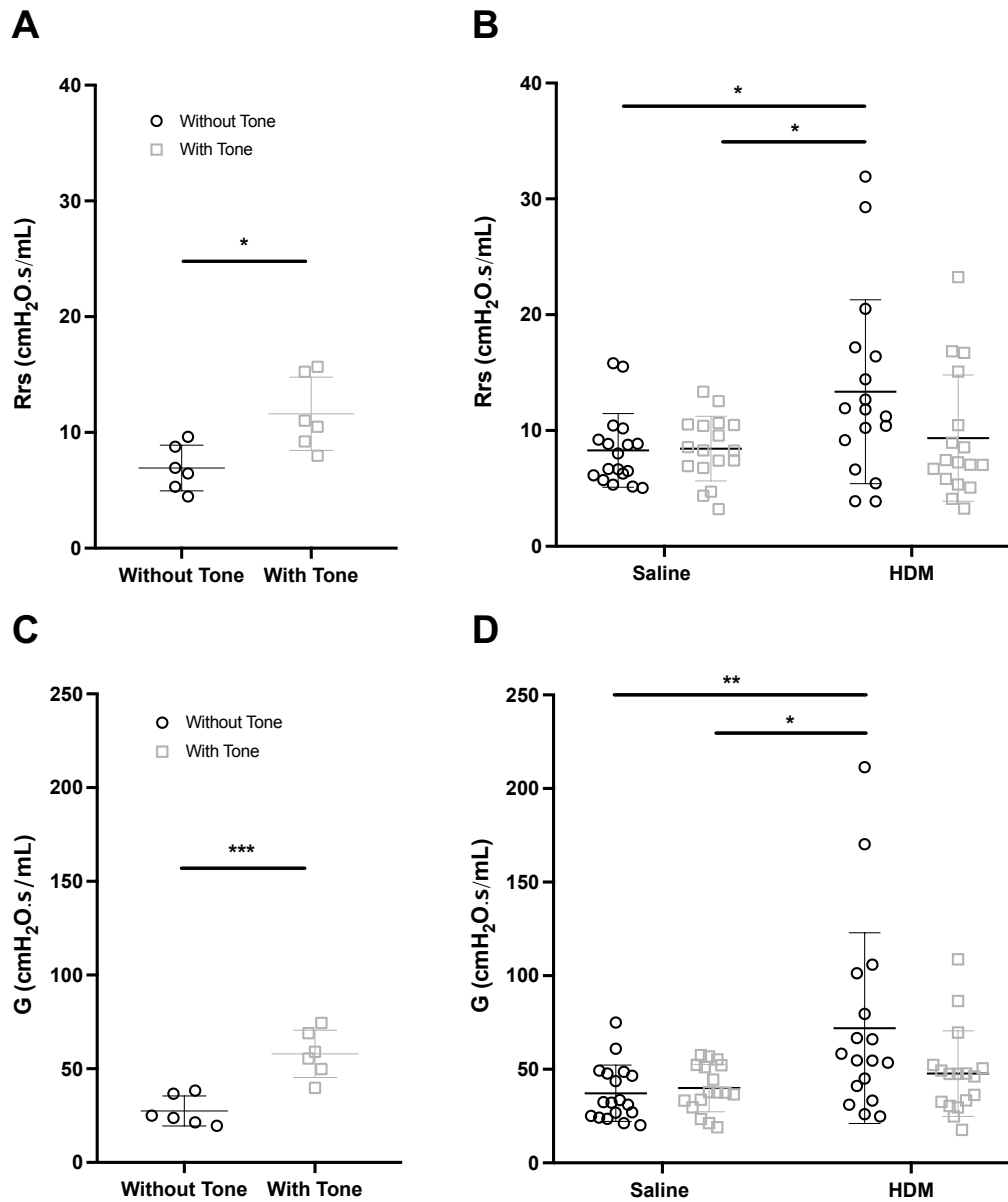


Figure 4.2. Maximal respiratory system resistance (Rrs) and tissue damping (G) estimated in response to the final large dose of MCh. A – Comparison of Rrs between untreated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. B – Comparison of Rrs between saline (left side) and HDM (right side)-treated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. C – Comparison of G between untreated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. D – Comparison of G between saline (left side) and HDM (right side)-treated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. The asterisks denote statistically significant differences between groups (* and ** are $p < 0.05$ and 0.01 , respectively) $n = 6$ and 18 for A & C and B & D, respectively.

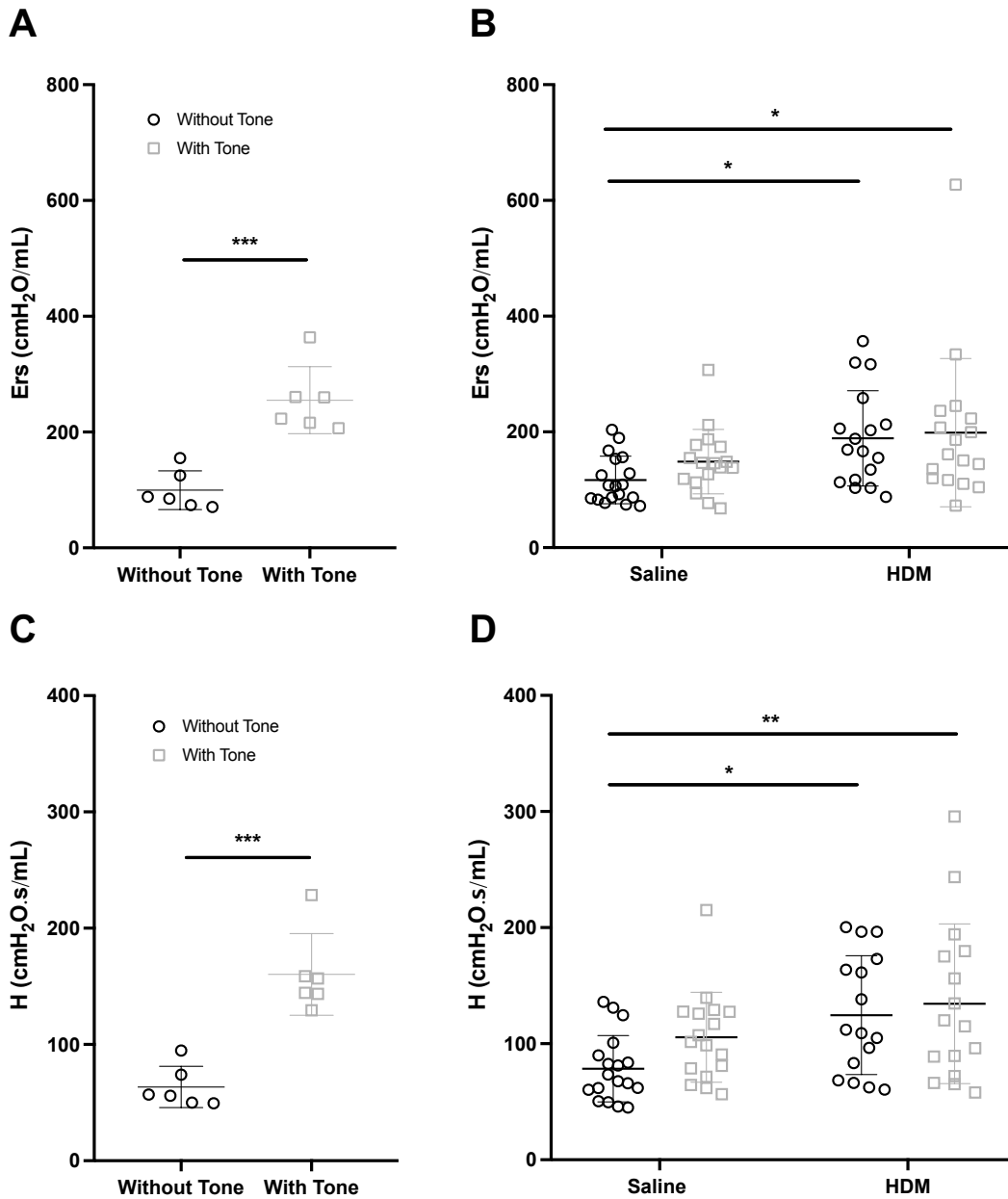


Figure 4.3. Maximal respiratory system elastance (Ers) and tissue elastance (H) estimated in response to the final large dose of MCh. A – Comparison of Ers between untreated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. B – Comparison of Ers between saline (left side) and HDM (right side)-treated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. C – Comparison of H between untreated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. D – Comparison of H between saline (left side) and HDM (right side)-treated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. The asterisks denote statistically significant differences between groups (* and ** are $p < 0.05$ and 0.01 , respectively) $n = 6$ and 18 for A & C and B & D, respectively.

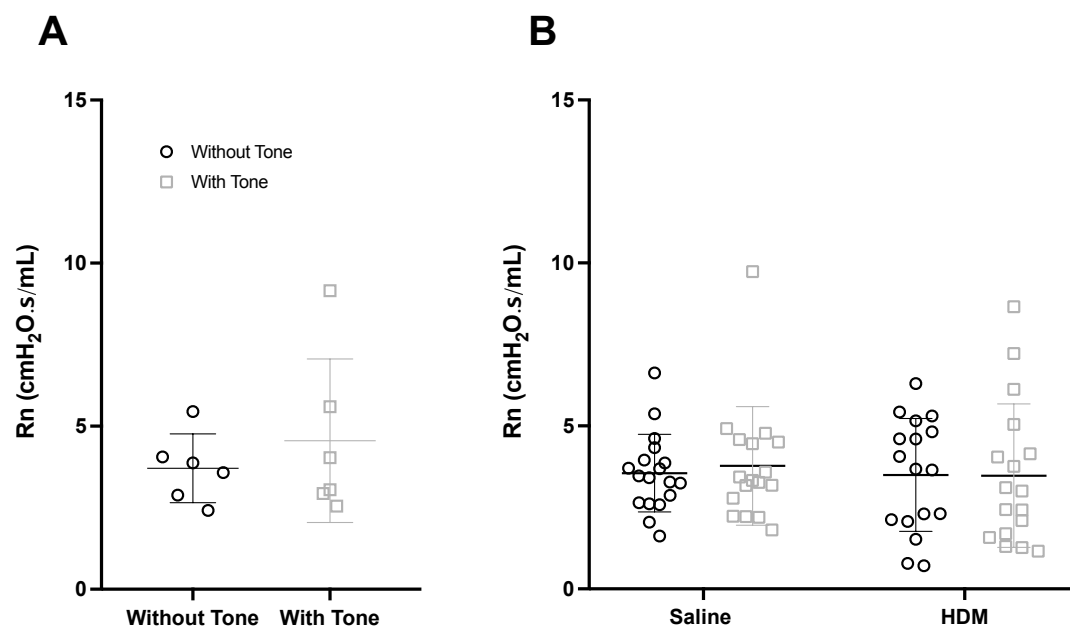


Figure 4.4. Maximal Newtonian resistance (Rn) estimated in response to the final large dose of MCh. A – Comparison of Rn between untreated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. B – Comparison of Rn between saline (left side) and HDM (right side)-treated mice pre-exposed (grey square) or not (black circle) to tone. n = 6 and 18 for A and B, respectively.

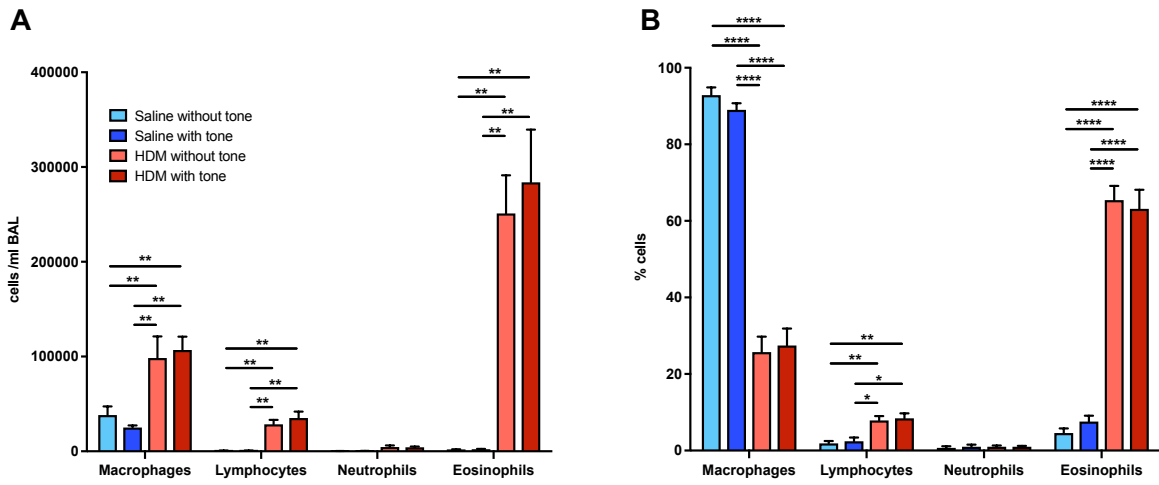


Figure 4.5. Inflammatory cells in bronchoalveolar lavages of mice treated with saline and HDM. 24 hours following the last exposure bronchoalveolar lavages were collected and differential cell counts were performed. A – Total cells in HDM-treated mice (red) and saline-treated mice (blue) exposed (dark) or not (light) to tone. B – Percent of cells in HDM-treated mice (red) and saline-treated mice (blue) exposed (dark) or not (light) to tone.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La respiration est le mécanisme primordial qui permet la réalisation d'échanges gazeux entre l'organisme et l'environnement extérieur. L'organe qui permet ces échanges, le poumon, est un tissu extrêmement élaboré en raison de la multitude des éléments qui le composent. Étudier sa mécanique de fonctionnement peut s'avérer passionnant, mais également profondément complexe.

Le rôle de l'élément contractile des voies respiratoires, le muscle lisse des voies aériennes, demeure méconnu [122, 321]. En revanche, les causes et les conséquences de la contraction excessive de ce muscle dans l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme sont une source intarissable d'études et de questionnement. De plus, lorsqu'on s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués dans la génération de force par le muscle lisse, les questions qui restent sans réponse sont nombreuses. Ce tissu relativement simple à première vue, est en réalité doté d'une grande plasticité liée aux différents constituants de son cytosquelette contractile.

Le phénomène du gain de force du muscle lisse des voies aériennes illustre parfaitement cette plasticité. À la suite de la découverte de ce phénomène au cours des dix dernières années, comprendre son rôle dans la réactivité bronchique chez l'humain, et étudier les mécanismes moléculaires qui le régissent représentaient de nouveaux objectifs de recherche. Désormais, comprendre le rôle de ce phénomène dans un contexte pathologique s'avère nécessaire. Ainsi, cette thèse s'insère directement dans l'étude fonctionnelle et mécanistique du gain de force du muscle lisse des voies aériennes provoqué par l'exposition à un tonus.

Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes : de l'*in vitro* à l'*in vivo*

Le gain de force du muscle lisse est un phénomène par lequel la présence d'un tonus du muscle lisse des voies aériennes augmente ses capacités contractiles en réponse à une stimulation par un agoniste contractile. Ce phénomène a tout d'abord été observé *in vitro* en 2009 sur des faisceaux isolés de muscles lisses de trachées de moutons [103]. Une

étude réalisée *in vitro* en 2012 a permis d'observer que le gain de force du muscle lisse n'était pas éliminé lorsque les faisceaux de muscles lisses étaient soumis à des oscillations de force mimant les mouvements respiratoires [105]. Finalement, une étude réalisée *in vivo* chez la souris en 2015 a démontré qu'une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes engendre une augmentation de la réactivité bronchique mesurée en réponse à l'inhalation d'une forte dose de MCh [104]. Cette étude a permis de démontrer qu'une faible augmentation de la force générée par le muscle lisse suivant la préexposition à un tonus mesurée *in vitro* (~20%) est capable d'augmenter la réactivité bronchique *in vivo* de façon considérable (126%) chez la souris [104].

En 2017, dans l'étude présentée au chapitre III de cette thèse, nous avons démontré *in vivo* chez de jeunes humains en santé que la préexposition à un tonus augmente de 59.6% la résistance du système respiratoire mesurée à 5 Hz en réponse à une forte dose de MCh. Nous avons également démontré que la préexposition à un tonus amplifie de 173.8% la diminution de la réactance du système respiratoire mesurée à 5 Hz en réponse à une forte dose de MCh. Finalement, en 2019, dans l'étude que nous avons réalisée au chapitre IV de cette thèse, nous démontrons que le phénomène du gain de force se produit également *in vitro* sur des cellules de muscle lisse des voies aériennes isolées grâce à des expériences de microscopie à force de traction. Ainsi, les travaux réalisés durant cette thèse s'insèrent dans la continuité directe des recherches sur le gain de force du muscle lisse des voies aériennes. Nos études démontrent qu'une très faible augmentation de la force de traction générée par des cellules isolées *in vitro* se traduit par une forte élévation de la réactivité bronchique *in vivo*. Ces résultats ne sont pas surprenants lorsqu'on connaît la cascade des éléments amplificateurs qui survient suivant l'activation contractile du muscle lisse des voies aériennes. Une très faible augmentation du niveau d'activation du muscle lisse mène à des changements importants de la résistance des voies aériennes (Annexe 8.1).

Lors de la réalisation de l'étude présentée au chapitre III, nous avons recruté 10 volontaires en santé de l'institut universitaire en cardiologie et pneumologie de la ville de Québec. Dans le but de monitorer l'évolution de la mécanique pulmonaire en réponse à différentes doses de MCh, nous avons utilisé la technique des oscillations forcées. Un des nombreux avantages de cette technique par rapport à la spirométrie ou la pléthysmographie, est qu'elle permet d'éviter l'effet bronchodilatateur provoqué par la prise d'inspirations profondes. L'appareil que nous possédons dans notre laboratoire, le tremoFlo, nous a permis d'obtenir une mesure de l'impédance du système respiratoire à différentes fréquences [225]. Grâce

à l'utilisation du tremoFlo, nous avons démontré que le phénomène du gain de force affecte principalement les voies aériennes périphériques et non les voies aériennes principales (c.-à-d. voies aériennes les plus larges). Effectivement, nous avons observé une augmentation de la résistance du système respiratoire à 5 Hz (R_{rs5}), indicateur de la résistance de l'ensemble du système respiratoire, en réponse à une forte dose de MCh lorsque les sujets avaient été préexposés à un tonus. Au contraire, aucune différence de résistance du système respiratoire à 19 Hz (R_{rs19}), indicateur de la résistance des voies aériennes principales, en réponse à une forte dose de MCh n'a été observée lorsque les sujets étaient préexposés ou non à un tonus. Nous avons émis l'hypothèse dans cette étude que l'absence de différence de résistance mesurée à 19 Hz pouvait être une conséquence directe de la présence de plaques de cartilage dans les voies respiratoires principales [322]. En effet, une augmentation de la force générée par le muscle lisse serait capable d'augmenter la rigidité de ces voies respiratoires, sans pour autant en affecter le calibre dû à une impossibilité mécanique. Lors de l'analyse des résultats, nous avons observé une diminution de la réactance à 19 Hz (X_{rs19}) en réponse à une forte dose de MCh lorsque les sujets avaient été préexposés à une période de tonus (Figure 6.1). Nous avons donc émis l'hypothèse contestée par nos pairs que la mesure de X_{rs19} serait un bon indice de la rigidité des voies respiratoires principales. En effet, si le muscle génère plus de force, mais qu'une diminution du calibre des voies respiratoires est impossible à cause d'une contrainte mécanique, les voies respiratoires seraient d'apparence plus rigide, et X_{rs19} plus négative.

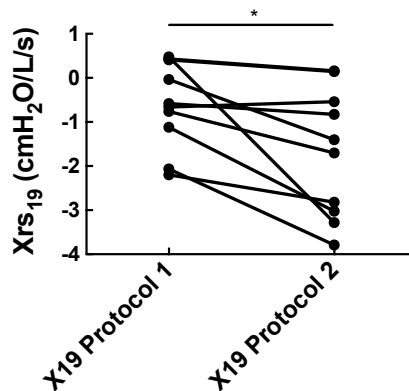


Figure 6.1 : Mesure de la réactance à 19 Hz dans l'étude du chapitre III. Mesure de la réactance à 19 Hz (X_{rs19}) durant les 40 secondes de respiration à volume courant suivant l'inhalation de la dernière dose de MCh. Durant le protocole 1 les sujets ont inhalé 6 doses de saline avant la dernière dose de MCh. Durant le protocole 2, les sujets ont inhalé 6 faibles

doses de MCh avant la dernière dose de MCh afin d'induire un tonus. $P < 0.05$ a été considéré comme significatif.

De façon intéressante, les résultats obtenus *in vivo* chez l'humain dans l'étude présentée au chapitre III concordent avec les résultats obtenus *in vivo* chez la souris dans l'étude réalisée au chapitre V de cette thèse. Nous avons confirmé *in vivo* chez des souris que l'élévation de la réactivité bronchique provoquée par une préexposition à un tonus affectait majoritairement les voies aériennes périphériques sans affecter les voies aériennes principales.

Dans l'étude présentée au chapitre III, la réactance du système respiratoire mesurée à 5 Hz (X_{rs5}) ainsi que la dépendance de la résistance à la fréquence (R_{rs5-19}) ont permis d'obtenir une mesure de l'hétérogénéité de la ventilation dans les voies aériennes suivant l'inhalation de la dernière dose de MCh [323]. Nous avons ainsi pu observer que la préexposition à un tonus augmente fortement l'hétérogénéité pulmonaire. Nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation d'hétérogénéité était liée à une augmentation de la force générée par le muscle lisse provoquant la fermeture de voies périphériques. Ici aussi, nous devons tenir compte des limitations qui nous ont été suggérées par nos pairs. Cette augmentation d'hétérogénéité pulmonaire pourrait simplement être liée à des phénomènes indépendants du gain de force du muscle lisse tels que : 1- une augmentation de l'hétérogénéité pulmonaire due à l'absence de prise d'inspiration profonde durant les 30 minutes précédant l'inhalation de la forte dose de MCh [276] ; 2- Une diminution du volume d'air inhalable provoqué par l'augmentation de l'hétérogénéité pulmonaire, et de fait, un changement du patron de déposition de MCh au sein de l'arbre bronchique [285] et 3- une augmentation de l'hétérogénéité pulmonaire provoquée par une augmentation de la sécrétion de mucus en réponse à l'inhalation répétée de faibles doses de MCh [324].

Le premier argument était facilement discutable étant donné que les sujets ne prenaient pas d'inspirations profondes durant les deux protocoles (c.-à-d. avec et sans tonus). De plus, les deux protocoles comportaient également la prise d'une inspiration profonde à la fin des 40 secondes suivant l'inhalation de la dernière dose de MCh. Différentes études ont démontré que la prise d'inspiration profonde provoquait un retour à la normale de l'hétérogénéité pulmonaire suivant une bronchoconstriction [97, 277, 325]. Nous avons observé dans cette étude que malgré une dilatation maximale plus faible durant l'inspiration profonde ($R_{5, \min}$) lorsque les personnes étaient soumises à un tonus, l'effet

bronchodilatateur de l'inspiration profonde (pré - post) était similaire entre les deux protocoles. De plus, les mesures de Xrs_5 et Rrs_{5-19} suivant l'inspiration profonde ont démontré que l'hétérogénéité pulmonaire était diminuée de façon similaire dans les deux protocoles. Nous avons également observé que suivant l'inspiration profonde, malgré une hétérogénéité pulmonaire similaire, le niveau de restriction et la vitesse de restriction mesurés durant une minute étaient plus importants lorsque les sujets avaient été soumis à une période de tonus. Ces résultats permettent d'appuyer l'implication du muscle lisse des voies aériennes dans l'augmentation de la réactivité bronchique suivant une préexposition de 30 minutes à un tonus.

Le second argument était également facilement discutable, sachant que la MCh lorsqu'elle est inhalée, va être délivrée dans l'ensemble des voies respiratoires à la suite de son passage rapide dans la circulation sanguine [286]. La bronchoconstriction est donc indépendante du patron de déposition [286].

En revanche, nous ne pouvons pas exclure dans cette étude l'impact du mucus dans l'augmentation de l'hétérogénéité pulmonaire. Afin d'étudier le rôle de la sécrétion de mucus dans le phénomène du gain de force du muscle lisse, plusieurs possibilités seraient envisageables soit : 1- l'utilisation de molécules inhibitrices de la sécrétion de mucus ou l'utilisation d'inhibiteurs de la production de mucus [326] ; 2- l'utilisation de molécules sécrétagogues telles que de l'ATP, de l'adénosine ou de la substance P [327], afin de tester l'effet de la sécrétion de mucus sur la réactivité bronchique ; et 3- l'utilisation d'un bronchodilatateur tel que le salbutamol à la fin des protocoles afin de mesurer le temps nécessaire pour le retour des différents indices d'obstruction bronchique à leur niveau basal. Effectivement, le temps nécessaire à la clairance de mucus est beaucoup plus important que le temps nécessaire à la relaxation par des bronchodilatateurs [328].

Dans son ensemble, cette étude démontre qu'une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes est impliquée dans une élévation de la réactivité bronchique chez l'humain. Ainsi, dans les pathologies caractérisées par une augmentation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires, tel que dans la pathologie de l'asthme, une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes pourrait mener à la mise en place du gain de force. Désormais, réaliser la même étude que celle réalisée au chapitre III avec des patients asthmatiques de différentes sévérités serait intéressant et pertinent. Ces résultats permettraient d'établir des corrélations potentielles entre le gain de force du muscle lisse et

le niveau d'inflammation ou le niveau de remodelage bronchique chez l'humain. Une inflammation élevée pourrait provoquer une élévation du tonus du muscle lisse de façon intrinsèque, et le gain de force du muscle lisse ne provoquerait ainsi aucune augmentation supplémentaire. Au contraire, un remodelage bronchique important pourrait augmenter la masse du muscle lisse des voies aériennes et augmenter le phénomène du gain de force.

À la suite des observations réalisées dans cette étude, il était nécessaire de : 1- étudier les mécanismes moléculaires qui gouvernent ces changements de contractilité au sein du muscle lisse des voies aériennes et 2- étudier quels sont les liens potentiels entre le phénomène du gain de force et l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme.

Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes : un cytosquelette plastique

L'une des découvertes majeures réalisées dans le domaine du muscle lisse des voies aériennes au cours des dernières décennies a été la reconnaissance d'une propriété unique : sa plasticité. La plasticité mécanique et structurale du muscle lisse des voies aériennes est caractérisée par sa capacité à changer rapidement (c.-à-d. une trentaine de minutes) la structure de son cytosquelette et de son appareil contractile afin de s'adapter à l'environnement dynamique du poumon [329]. Ainsi, contrairement à un muscle squelettique, le muscle lisse des voies aériennes ne possède pas de structure sarcomérique, mais un cytosquelette malléable [330].

Dans l'étude présentée au chapitre IV de cette thèse, nous avons étudié les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'augmentation des capacités contractiles du muscle lisse des voies aériennes suivant l'exposition à un tonus. Tout d'abord, lorsqu'on porte attention aux différents patrons de contraction du muscle lisse, on s'aperçoit que la cinétique de la contraction du muscle lisse en réponse à une forte concentration de MCh est différente lorsque le tissu a été préexposé ou non à un tonus durant 30 minutes. Lorsque le muscle lisse se contracte en réponse à une concentration élevée de MCh, sans préexposition à un tonus, on observe un développement rapide de la force dans les premières secondes, suivi d'une augmentation lente au cours du temps. Lorsque le muscle lisse est exposé à un tonus durant 30 minutes, le déploiement de la force par le muscle lisse en réponse à une forte

concentration de MCh est très rapide, et demeure stable. Ces deux différents patrons de contraction témoignent que certains changements ont eu lieu au sein des éléments moléculaires qui gouvernent la contractilité du muscle durant les 30 minutes de tonus. Envisager des modifications d'expressions de protéines contractiles paraît peu probable compte tenu du court intervalle de temps dans lequel ces modifications apparaissent. De plus, en réponse à l'élimination du tonus, l'augmentation des capacités contractiles précédemment mise en place disparaît sur une échelle de temps de quelques minutes [104]. Ainsi, ces différentes caractéristiques suggèrent davantage une réorganisation structurale des éléments contractiles du cytosquelette des cellules musculaires lisses.

Nous avons dissocié dans notre étude les éléments liés au moteur de la contraction (c.-à-d. l'activation de la myosine) et les éléments liés à la transmission de la force au sein des cellules musculaires lisses (c.-à-d. la polymérisation des filaments d'actine). Si aucune différence du niveau d'activation des chaînes légères de myosine n'a été observée dans cette étude, nous avons pu démontrer que la présence d'un tonus pendant 30 minutes augmente la polymérisation d'actine à un niveau maximal. Étonnamment, l'augmentation du niveau d'actine polymérisée est plus importante après 30 minutes de stimulation des cellules musculaires lisses avec une faible concentration de MCh (10^{-7} M) qu'après 5 minutes de stimulation avec une forte concentration de MCh (10^{-4} M). Ces résultats sont différents de certaines études présentes dans la littérature, qui démontrent que la polymérisation d'actine au sein des cellules musculaires lisses atteint un niveau maximal après 5 minutes de stimulation avec une concentration élevée de MCh [156, 157]. Une divergence des résultats pourrait s'expliquer par la technique utilisée ou par le type de cellules sur lesquelles ces expériences ont été réalisées. Les études précédentes ont été réalisées sur des faisceaux de muscles lisses des voies aériennes de chien, et certaines ont été réalisées sur des cellules primaires de muscle lisse des voies aériennes humaines. Cependant, la quantification du niveau d'actine polymérisée a été faite dans ces études par la technique de l'ultracentrifugation.

Quantifier la polymérisation d'actine au sein des cellules musculaires lisses n'est pas une tâche facile, compte tenu de la grande quantité d'actine déjà polymérisée à l'état basal dans ces cellules [149]. Lors d'une stimulation par la MCh, le ratio de F-actine sur G-actine augmente, passant de 70-80% à 85-90% [125]. Ainsi, les changements qui interviennent en termes de polymérisation sont faibles et difficiles à déceler. Trois méthodes différentes sont décrites dans la littérature afin de quantifier ces changements : 1- la quantification du ratio

F/G par la méthode de l'ultracentrifugation, 2- la quantification du ratio F/G par la méthode de la microscopie confocale et 3- la quantification grâce à la mesure de l'inhibition de la DNase I. Durant cette thèse, nous n'avons pas pu quantifier des changements du ratio F/G grâce à l'ultracentrifugation due à l'absence d'un appareil essentiel dans le centre de recherche. Nous avons donc tenté dans un premier temps de mesurer l'activité de la DNase I suivant différentes stimulations de MCh. Les différences d'activité mesurées dans ces expériences témoignent directement d'une inhibition de l'enzyme par les molécules de G-actine, et donc indirectement du niveau d'actine polymérisée au sein des cellules musculaires lisses. Lors de ces expériences, nous avons pu observer une augmentation de l'activité de la DNase I lorsque les cellules étaient stimulées avec une forte concentration de MCh. De façon étonnante, après 30 minutes de préexposition à un tonus, l'activité de la DNase I mesurée était semblable à l'activité mesurée lors d'une stimulation par une forte concentration de MCh. Cependant, due à la grande variabilité de cette technique, nous avons souhaité confirmer nos résultats par les mesures de ratios F/G actine en microscopie confocale. L'ensemble de ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le gain de force du muscle lisse serait lié à une augmentation de l'actine polymérisée, augmentation qui aurait lieu durant la période de tonus.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les expériences de polymérisation d'actine, nous avons souhaité tester l'inhibition de la polymérisation d'actine sur le gain de force du muscle lisse mesuré *in vitro* dans des trachées de souris. Étudier ce mécanisme grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques peut s'avérer périlleux compte tenu de la nécessité des filaments d'actine lors de la contraction. Nous avons ainsi inhibé la polymérisation d'actine de façon indirecte à l'aide de l'utilisation d'un inhibiteur du complexe Arp2/3 (CK-666), et de façon directe par la ségrégation des molécules de G-actine grâce à l'utilisation de latrunculine A. L'utilisation de ces deux inhibiteurs a permis d'inhiber entièrement le phénomène du gain de force du muscle lisse malgré une très forte diminution de la force générée par les trachées. Ici, nous devons tenir compte des commentaires qui nous ont été faits par nos pairs. En effet, nous ne pouvons pas directement conclure sur l'effet de la polymérisation d'actine dans le phénomène du gain de force à cause de la perte quasi totale de la force générée en présence de ces inhibiteurs. Afin de confirmer les résultats obtenus sur des trachées de souris, nous allons devoir fortement inhiber l'activation de la chaîne légère de myosine et mesurer l'effet du gain de force suite à une perte importante de force liée à cette inhibition. La présence du gain de force dans ces

expériences malgré une diminution très importante de force appuierait l'hypothèse que la polymérisation d'actine est responsable du gain de force.

Durant cette thèse, nous avons également souhaité remonter dans la voie de signalisation responsable de la polymérisation d'actine. Nous avons ainsi inhibé les protéines N-WASP et CDC-42 de même que deux protéines responsables de la formation des complexes adhésomes, FAK et NMII [126, 153-156, 331]. De façon étonnante, l'inhibition de ces protéines n'a inhibé ni le phénomène du gain de force du muscle lisse, ni grandement affecté la force de contraction générée par les muscles lisses, excepté pour l'inhibiteur de NMII. Cette absence d'inhibition pourrait être expliquée par différents phénomènes tels que : 1- une inhibition incomplète de ces protéines liée à une faible activité des inhibiteurs pharmacologiques ; 2- la mise en place de mécanismes compensateurs afin de contrebalancer l'effet de l'inhibition de certaines protéines nécessaires au maintien de ces mécanismes fondamentaux ; ou encore 3- que la protéine Arp2/3 peut être activé par d'autres mécanismes indépendants de la voie classique CDC-42/N-WASP. De plus, une étude a récemment démontré que la protéine ROCK était nécessaire à l'augmentation de la polymérisation d'actine grâce à son implication dans la formation des complexes adhésomes [305]. L'inhibition de ROCK dans notre étude n'a pas eu d'effet sur le phénomène du gain de force. Ces résultats suggèrent que le gain de force serait lié à une augmentation de la polymérisation d'actine, mais indépendant de la formation des complexes adhésomes. Ainsi, comprendre quels sont les mécanismes et les voies de signalisations qui mènent à la polymérisation d'actine dans le phénomène du gain de force représente de nouvelles avenues de recherche qu'il est nécessaire d'étudier. Afin d'explorer dans le phénomène du gain de force le rôle de différentes protéines impliquées dans la formation d'adhésomes, l'utilisation d'ARN interférents ou la surexpression de protéines mutées serait à considérer. Ainsi, il serait possible d'inhiber certaines protéines telles que la paxiline, la vinculine ou encore la talline [155, 157]. Ces techniques permettraient également d'étudier le rôle de la profiline et de la cortactine dans ce phénomène [332, 333]. Effectivement, Il existe encore très peu d'inhibiteurs pharmacologiques contre ces protéines sur le marché, ce qui en fait des acteurs difficiles à cibler.

Nous avons également démontré dans cette étude que la stimulation de cellules musculaires lisse avec une concentration faible ou élevée de MCh provoque une rapide diminution transitoire de la phosphorylation de la cofiline (c.-à-d. une activation) dans les premières minutes de la stimulation. Le niveau de phosphorylation de la cofiline était

retourné à son niveau basal après 5 minutes de stimulation. De façon surprenante, nos expériences ont démontré que la présence d'un tonus sur les cellules musculaires lisses durant 30 minutes bloque l'activation de la cofiline en réponse à une stimulation subséquente avec une forte concentration de MCh. Cette protéine lorsqu'elle est active, clive les filaments d'actine existants afin de générer de nouvelles extrémités libres, ce qui permet l'élongation des filaments à partir de ces nouvelles extrémités. Une étude réalisée en 2008 a démontré que cette protéine était nécessaire au développement de la force par le muscle lisse des voies aériennes dans des conditions isométriques [158]. Les auteurs ont également démontré que son inactivation grâce à l'expression d'un mutant dominant, diminuait la polymérisation d'actine qui a lieu lors d'une stimulation par un agoniste contractile [158]. Une seconde étude réalisée 10 ans plus tard en 2018 a démontré que l'activation de la cofiline était nécessaire à la fluidisation du cytosquelette en réponse à un étirement mécanique [159]. Ainsi, l'activation de la cofiline permettrait le clivage des filaments déjà polymérisés afin de permettre : 1- un changement dans l'organisation des filaments et des structures d'actine existantes et 2- une fluidisation du cytosquelette d'actine suite à un étirement du muscle lors d'une inspiration profonde. C'est pourquoi l'inhibition de cette protéine durant une période de tonus permettrait d'augmenter la stabilité des structures d'actine polymérisée. De plus, l'inhibition de cette protéine suivant un tonus pourrait également expliquer en partie l'augmentation de la vitesse de reconstruction suivant l'inspiration profonde qui a été observée chez les sujets préexposés à un tonus dans l'étude présentée au chapitre III. De fait, une inhibition de l'activation de la cofiline diminuerait le clivage des filaments d'actine lors de l'étirement du muscle, conservant ainsi les structures contractiles mises en place durant les 30 minutes de tonus. Si les structures contractiles sont conservées, la reconstruction du muscle lisse s'effectuerait sur une échelle de temps plus rapide.

Très peu de choses sont décrites dans la littérature concernant le rôle de la cofiline dans le muscle lisse des voies aériennes. Ainsi, comprendre quelles sont les protéines impliquées dans l'activation de la cofiline au sein des cellules du muscle lisse des voies aériennes représente de nouvelles voies de recherche qu'il serait intéressant d'explorer. Les fonctions de cette protéine décrites dans d'autres types cellulaires sont nombreuses. En fonction de la concentration de G-actine et de cofiline, cette protéine peut : 1- induire la polymérisation en s'associant à des protéines de G-actine riches en ATP ; 2- provoquer la dépolymérisation via le clivage des filaments de F-actine ; 3- générer de nouvelles extrémités libres

nécessaires à l'élongation des filaments existants ; 4- stabiliser les filaments de F-actine et 5- réguler la phospholipase D1 [334]. De plus, les mécanismes qui régulent son activation et son inhibition sont également nombreux [334]. Elle peut être activé par la déphosphorylation de son résidu sérine 3 par les protéines *slingshot* (SSH) [335], *chronophin* (CIN) [336], et *protein phosphatase 1* et *2A* (PP1 & PP2A) [337]. A l'inverse, elle peut être inactivée par la rapide phosphorylation du résidu sérine 3 par les protéines LIM kinase 1 et 2 (LIMK1 & LIMK2) [338] ainsi que les *testicular protein kinase 1* et *2* (TESK1 & TSK2) [339, 340]. Ainsi, étudier le rôle de l'une ou plusieurs de ces protéines dans le phénomène du gain de force permettrait d'apporter de nouvelles clefs dans la compréhension de l'augmentation des capacités contractiles provoqué par la préexposition à un tonus.

Enfin, les résultats obtenus dans l'ensemble de cette étude, illustrent parfaitement la plasticité du muscle lisse des voies aériennes. L'exposition à un tonus permettrait d'augmenter les capacités contractiles du muscle lisse des voies aériennes en réponse à une réorganisation du cytosquelette d'actine provoquée par : 1- une déstructuration des filaments existants grâce à l'activation de la cofiline ; 2- une augmentation du nombre de filaments polymérisés ou une élongation des filaments déjà existants et 3- une inhibition des mécanismes de dégradation des filaments tels que l'inhibition de la cofiline afin de conserver la mise en place de ces structures contractiles. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'exposition à un tonus augmente la filamentogénèse d'actine grâce à une augmentation du nombre de filaments, et une inhibition de leur dégradation. Dans un contexte plus global, étudier ces mécanismes dans la contractilité du muscle lisse des voies aériennes, permettrait d'augmenter nos connaissances sur la mécanique moléculaire qui régit la plasticité de ce tissu.

Désormais, comprendre comment l'inflammation dans l'asthme peut influencer le phénomène du gain de force, et comment ce phénomène pourrait être impliqué dans l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme s'avère nécessaire.

Le gain de force du muscle lisse des voies aériennes : un lien dans l'asthme ?

Les études présentées dans cette thèse ont permis de démontrer que le gain de force du muscle lisse des voies aériennes est responsable d'une augmentation de la réactivité bronchique *in vivo* chez l'humain. Ces études ont également démontré que ce phénomène semble être provoqué par une augmentation de la polymérisation d'actine au sein des cellules musculaires lisses. En revanche, les liens potentiels de causalité entre l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme et le phénomène du gain de force du muscle lisse demeurent toujours méconnus.

Une étude réalisée en 2006 a démontré qu'une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes est bien corrélée avec l'augmentation de la réactivité bronchique chez l'humain [107]. Différentes études ont également démontré que le tonus du muscle lisse des voies aériennes était plus élevé chez les individus asthmatiques [108-110]. Dans l'asthme, une augmentation du tonus du muscle lisse pourrait provenir d'une élévation du nombre de médiateurs contractiles présents lors d'épisodes inflammatoires [19, 112]. C'est pourquoi une élévation du tonus du muscle lisse provoquée par la présence de ces différents médiateurs inflammatoires pourrait mener à la mise en place du phénomène du gain de force et ainsi à une hyperréactivité bronchique [247, 294]. De plus, l'augmentation des capacités contractiles du muscle lisse provoqué par la préexposition à un tonus est un phénomène labile [104, 106]. Cette labilité est consistante avec la variabilité de l'inflammation et des exacerbations épisodiques dans la pathologie de l'asthme.

Afin d'étudier l'effet de l'inflammation sur le phénomène du gain de force, nous avons mesuré l'effet d'un tonus sur la réactivité bronchique en réponse à l'inhalation d'une large dose de MCh dans un modèle murin d'asthme allergique. Dans l'étude présentée au chapitre V de cette thèse, les mesures de réactivité bronchique suivant l'exposition à un tonus ont été réalisées dans 3 différents groupes de souris : 1- des souris non touchées pendant 10 jours ; 2- des souris traitées de façon intranasale à la saline tous les jours durant 10 jours (condition contrôle) ; et 3- des souris traitées de façon intranasale à la saline contenant des extraits de poudre d'acariens (HDM) tous les jours durant 10 jours (condition expérimentale). Le lendemain du dernier traitement (c.-à-d. 24 heures plus tard), la réactivité bronchique des souris en réponse à une dose élevée de MCh suivant ou non une préexposition à une période de tonus a été mesurée à l'aide du flexiVent.

Les résultats que nous avons obtenus dans le groupe de souris non traitées, grâce aux mesures de réactivité bronchique avec ou sans une préexposition à un tonus, concordent

avec les résultats précédemment obtenus dans l'étude présentée au chapitre III. Dans ce groupe de souris, la préexposition à un tonus a provoqué une augmentation de la résistance du système respiratoire (R_{rs}), de l'élastance du système respiratoire (E_{rs}), de résistance tissulaire (G) et de l'élastance tissulaire (H) en réponse à l'inhalation d'une forte dose de MCh en comparaison aux souris non préexposées à un tonus. En revanche, aucune différence de résistance Newtonienne (R_n) n'a pu être mesurée entre les souris préexposées ou non à une période de tonus. Comme décrit dans la littérature, les mesures de G et H reflètent le comportement des voies aériennes périphériques, tandis que les mesures de R_n reflètent le comportement des voies aériennes principales [312]. Ainsi, comme observé dans l'étude présentée au chapitre III, ces travaux ont confirmé que le gain de force du muscle lisse est un phénomène qui affecte majoritairement les voies aériennes périphériques sans affecter les voies aériennes principales.

Lorsque nous avons comparé les groupes de souris traités à la saline et au HDM, nous avons évalué les mêmes paramètres de mécanique du système respiratoire que ceux du groupe de souris non touchées. Le traitement au HDM chez les souris non préexposées à un tonus a provoqué une augmentation de R_{rs} , E_{rs} , G et H en comparaison aux souris traitées à la saline et non préexposées à un tonus. Dans ce groupe de souris également, aucune différence de R_n n'a été mesurée.

Finalement, la plus grande limitation de cette étude correspond à la disparition du phénomène du gain de force, autant dans les groupes de souris traités au HDM, que dans les groupes de souris traités à la saline. La perte de ce phénomène chez ces souris est difficilement compréhensible. Une disparition du gain de force dans les souris traitées au HDM pourrait expliquer l'hyperréactivité bronchique observée dans un contexte inflammatoire. Effectivement, une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes provoqué par une augmentation du nombre de médiateurs contractiles provoquerait la mise en place intrinsèque du phénomène du gain de force. Ainsi, une augmentation du tonus provoquée par l'inhalation de faibles doses de MCh ne provoquerait aucune augmentation supplémentaire. En revanche, la disparition du phénomène à la suite d'un traitement répété avec de la saline est difficilement compréhensible. Plusieurs hypothèses sont envisageables afin d'expliquer la perte du phénomène du gain de force, soit : 1- un traitement répété avec de l'isoflurane pourrait provoquer une diminution de la sensibilité du muscle lisse à la MCh ; et 2- un traitement répété avec de la saline pourrait produire un effet réfractaire à une bronchoprovocation par un spasmogène.

Concernant la bronchodilatation provoquée par l'isoflurane, une étude a démontré que l'effet bronchodilatateur perdure seulement durant 20 à 30 minutes lorsqu'on retire ce composé [315-317]. Concernant l'effet réfractaire que pourrait produire la saline, toutes les études ont été réalisées en réponse à l'inhalation de saline hypertonique [318, 319]. Dans notre étude, le véhicule utilisé est une saline isotonique. À la vue de nos résultats, conclure sur l'effet d'un de ces deux traitements sur le phénomène du gain de force est impossible.

Afin de comprendre l'effet de l'isoflurane sur la réactivité bronchique, nous devrions mesurer l'effet d'une exposition répétée à l'isoflurane seul sur le phénomène du gain de force. Dans le but d'étudier l'impact de l'inflammation dans le phénomène du gain de force du muscle lisse, travailler avec un modèle d'asthme murin sensibilisé à l'ovalbumine est également envisageable. L'utilisation de ce modèle permettrait de s'affranchir d'un traitement intranasal avec de la saline répété durant 10 jours consécutifs. Finalement, une des possibilités serait de changer de souche de souris. Effectivement, les souris des souches BALB/c ou A/J semblent être plus susceptibles au développement de l'hyperréactivité bronchique suite à un traitement répété avec du HDM [243, 341].

La continuité de cette étude permettrait d'établir des liens potentiels entre le phénomène du gain de force du muscle lisse et l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme. Si de tels liens existent, l'utilisation des modèles animaux développés permettrait la recherche de molécules visant à bloquer le gain de force *in vivo*. La découverte d'une ou plusieurs molécules permettrait d'envisager de nouveaux traitements afin de diminuer l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme.

CONCLUSION

Dans son ensemble, cette thèse démontre que le gain de force du muscle lisse des voies aériennes est un phénomène présent à différentes échelles du vivant. Une élévation du tonus augmente les capacités contractiles de cellules musculaires lisses isolées aussi bien que la réactivité bronchique de souris et d'humains en santé. Les travaux réalisés durant cette thèse démontrent également que cette augmentation de capacité contractile est possiblement due à la plasticité des éléments responsable de la transmission de force au sein des cellules musculaires lisses : les filaments d'actine. Ainsi, les recherches réalisées durant mon doctorat s'inscrivent directement dans la compréhension fondamentale de la physiologie du muscle lisse des voies aériennes. L'étude des mécanismes moléculaires du gain de force permet d'accroître les connaissances scientifiques sur les processus qui régissent la plasticité de ce tissu. Ces travaux serviront sans doute de tremplin pour la réalisation de nouvelles études visant à mettre en lumière les rouages de ce phénomène.

Ces travaux s'insèrent également dans l'étude d'un phénomène possiblement impliqué dans le développement de l'hyperréactivité bronchique dans la pathologie de l'asthme. Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, les causes qui peuvent mener à l'hyperréactivité bronchique sont nombreuses. Les résultats de nos travaux démontrent très clairement qu'une élévation du tonus du muscle lisse des voies aériennes augmente la réactivité bronchique *in vivo*. Le tonus du muscle lisse étant augmenté chez les patients asthmatiques pour de nombreuses raisons, le gain de force pourrait être un phénomène en partie responsable de l'hyperréactivité bronchique dans la pathologie de l'asthme. Étudier l'implication potentielle de ce phénomène dans cette pathologie est désormais une nécessité. Ainsi, la réalisation d'une étude avec des patients asthmatiques légers à modérés, ainsi qu'un raffinement des modèles murins d'asthme permettra de répondre à ces questions. De nombreuses recherches sont donc encore nécessaires afin de percer tous les secrets du gain de force du muscle lisse des voies aériennes.

Références

1. Holgate, S.T., *Asthma: a simple concept but in reality a complex disease*. Eur J Clin Invest, 2011. **41**(12): p. 1339-52.
2. Papi, A., et al., *Asthma*. The Lancet, 2018. **391**(10122): p. 783-800.
3. *Conference Board of Canada, Cost Risk Analysis for Chronic Lung Disease in Canada*. 2012.
4. Leynaert, B., et al., *Gender differences in prevalence, diagnosis and incidence of allergic and non-allergic asthma: a population-based cohort*. Thorax, 2012. **67**(7): p. 625-31.
5. *Asthma facts and statistics*. Asthma Canada.
6. Wenzel, S., *Severe Asthma in Adults*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2005. **172**(2): p. 149-160.
7. Israel, E. and H.K. Reddel, *Severe and Difficult-to-Treat Asthma in Adults*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(10): p. 965-976.
8. McGeachie, M.J., et al., *Patterns of Growth and Decline in Lung Function in Persistent Childhood Asthma*. N Engl J Med, 2016. **374**(19): p. 1842-1852.
9. Boulet, L.P. and J. Turmel, *Cough in exercise and athletes*. Pulm Pharmacol Ther, 2019. **55**: p. 67-74.
10. de Nijs, S.B., L.N. Venekamp, and E.H. Bel, *Adult-onset asthma: is it really different?* Eur Respir Rev, 2013. **22**(127): p. 44-52.
11. Legiest, B. and B. Nemery, *Management of work-related asthma: guidelines and challenges*. Eur Respir Rev, 2012. **21**(124): p. 79-81.
12. Chung, K.F., et al., *International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma*. Eur Respir J, 2014. **43**(2): p. 343-73.
13. Ullemar, V., et al., *Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins*. Allergy, 2016. **71**(2): p. 230-8.
14. Ober, C. and T.C. Yao, *The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 10-30.
15. Hernandez-Pacheco, N., M. Pino-Yanes, and C. Flores, *Genomic Predictors of Asthma Phenotypes and Treatment Response*. Front Pediatr, 2019. **7**(6): p. 6.
16. Zhang, Y., M.F. Moffatt, and W.O. Cookson, *Genetic and genomic approaches to asthma: new insights for the origins*. Curr Opin Pulm Med, 2012. **18**(1): p. 6-13.
17. Bosse, Y. and T.J. Hudson, *Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes*. Annu Rev Med, 2007. **58**(1): p. 171-84.
18. Ruggieri, S., et al., *Sensitization to dust mite defines different phenotypes of asthma: A multicenter study*. Pediatr Allergy Immunol, 2017. **28**(7): p. 675-682.
19. Holgate, S.T., *Pathogenesis of asthma*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(6): p. 872-97.
20. Silverman, R.A., et al., *Cigarette Smoking Among Asthmatic Adults Presenting to 64 Emergency Departments*. Chest, 2003. **123**(5): p. 1472-1479.
21. Siroux, V., et al., *Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma*. Eur Respir J, 2000. **15**(3): p. 470-7.

22. Wark, P.A.B., et al., *Respiratory Viruses and Asthma*. Semin Respir Crit Care Med, 2018. **39**(1): p. 45-55.
23. Lo, D., et al., *Modulation of airway hyperresponsiveness by rhinovirus exposure*. Respir Res, 2018. **19**(1): p. 208.
24. Chikaodinaka Ayuk, A., et al., *Use of Global initiative for asthma (GINA) guidelines in asthma management among paediatric residents in a Sub Saharan African country: a cross-sectional descriptive study*. Pan Afr Med J, 2017. **27**: p. 120.
25. *The Global Initiative for Asthma*.
26. Cazzola, M., et al., *beta2-agonist therapy in lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(7): p. 690-6.
27. Ricciardolo, F.L., et al., *Therapeutic novelties of inhaled corticosteroids and bronchodilators in asthma*. Pulm Pharmacol Ther, 2015. **33**: p. 1-10.
28. Hamelmann, E., C. Vogelberg, and S.J. Szefler, *Tiotropium for the treatment of asthma in adolescents*. Expert Opin Pharmacother, 2017. **18**(3): p. 305-312.
29. Gazzola, M., et al., *The underlying physiological mechanisms whereby anticholinergics alleviate asthma*. Can J Physiol Pharmacol, 2018. **96**(5): p. 433-441.
30. Chupp, G.L., et al., *Efficacy of mepolizumab add-on therapy on health-related quality of life and markers of asthma control in severe eosinophilic asthma (MUSCA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicentre, phase 3b trial*. Lancet Respir Med, 2017. **5**(5): p. 390-400.
31. Barnes, P.J., *Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(7): p. 454-466.
32. Chang, A. and Y. Bosse, *Targeting Single Molecules in Asthma Benefits Few*. Trends Mol Med, 2016. **22**(11): p. 935-945.
33. Chakir, J., et al., *Effects of Bronchial Thermoplasty on Airway Smooth Muscle and Collagen Deposition in Asthma*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12**(11): p. 1612-8.
34. Pretolani, M., et al., *Reduction of airway smooth muscle mass by bronchial thermoplasty in patients with severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **190**(12): p. 1452-4.
35. Seeley, E.J., et al., *The Impact of Bronchial Thermoplasty on Asthma-Related Quality of Life and Controller Medication Use*. Respiration, 2019: p. 1-6.
36. HUBER, H.L. and K.K. KOESSLER, *THE PATHOLOGY OF BRONCHIAL ASTHMA*. Archives of Internal Medicine, 1922. **30**(6): p. 689-760.
37. Hoffmann, F., et al., *Origin, Localization, and Immunoregulatory Properties of Pulmonary Phagocytes in Allergic Asthma*. Front Immunol, 2016. **7**(107): p. 107.
38. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The immunology of asthma*. Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 45-56.
39. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3125-37.
40. Perros, F., et al., *Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation*. Allergy, 2009. **64**(7): p. 995-1002.
41. Zaslona, Z. and M. Peters-Golden, *Prostanoids in Asthma and COPD: Actions, Dysregulation, and Therapeutic Opportunities*. Chest, 2015. **148**(5): p. 1300-1306.

42. Allen, I.C., et al., *Thromboxane A2 induces airway constriction through an M3 muscarinic acetylcholine receptor-dependent mechanism*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **290**(3): p. L526-33.
43. Devillier, P. and G. Bessard, *Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways*. *Fundam Clin Pharmacol*, 1997. **11**(1): p. 2-18.
44. Underwood, D.C., et al., *Differential antagonism of airway contractile responses to prostaglandin (PG)D2 and 9 alpha, 11 beta-PGF2 by atropine, SK&F 88046 and SQ 29,548 in the guinea pig*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **268**(1): p. 304-10.
45. Robinson, C., C.C. Hardy, and S.T. Holgate, *Pulmonary synthesis, release, and metabolism of prostaglandins*. *J Allergy Clin Immunol*, 1985. **76**(2 Pt 2): p. 265-71.
46. Lambrecht, B.N., E.K. Persson, and H. Hammad, *Myeloid Cells in Asthma*. *Microbiology Spectrum*, 2017. **5**(1).
47. Lambrecht, B.N. and S.J. Galli, *SnapShot: Integrated Type 2 Immune Responses*. *Immunity*, 2015. **43**(2): p. 408-408.e1.
48. Bhalla, A., M. Mukherjee, and P. Nair, *Airway Eosinophilopoietic and Autoimmune Mechanisms of Eosinophilia in Severe Asthma*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2018. **38**(4): p. 639-654.
49. Brusselle, G.G., et al., *Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice*. *Clin Exp Allergy*, 1994. **24**(1): p. 73-80.
50. Jatakanon, A., S. Lim, and P.J. Barnes, *Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(1): p. 64-72.
51. Mukherjee, M. and P. Nair, *Autoimmune Responses in Severe Asthma*. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2018. **10**(5): p. 428-447.
52. Panettieri, R.A., Jr., *The Role of Neutrophils in Asthma*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2018. **38**(4): p. 629-638.
53. Wood, L.G., et al., *The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma*. *Chest*, 2012. **142**(1): p. 86-93.
54. Moreira, A.P. and C.M. Hogaboam, *Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution*. *J Interferon Cytokine Res*, 2011. **31**(6): p. 485-91.
55. Zaslona, Z., et al., *Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma*. *J Immunol*, 2014. **193**(8): p. 4245-53.
56. Nieuwenhuizen, N.E., et al., *Allergic airway disease is unaffected by the absence of IL-4Ralpha-dependently activated macrophages*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **130**(3): p. 743-750 e8.
57. Han, H., et al., *Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages*. *J Immunol*, 2013. **190**(3): p. 904-12.
58. Gras, D., et al., *Remodelage bronchique dans l'asthme*. *Med Sci (Paris)*, 2011. **27**(11): p. 959-965.
59. Elliot, J.G., et al., *Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation*. *Respirology*, 2015. **20**(1): p. 66-72.

60. Wadsworth, S., D. Sin, and D. Dorscheid, *Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma*. J Asthma Allergy, 2011. **4**: p. 77-86.
61. Holgate, S.T., et al., *Asthma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15025.
62. Bergeron, C. and L.P. Boulet, *Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation*. Chest, 2006. **129**(4): p. 1068-87.
63. Gillis, H.L. and K.R. Lutchen, *Airway remodeling in asthma amplifies heterogeneities in smooth muscle shortening causing hyperresponsiveness*. J Appl Physiol, 1999. **86**(6): p. 2001-12.
64. Jeffery, P.K., et al., *Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(6): p. 1745-53.
65. Laitinen, L.A., et al., *Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(4): p. 599-606.
66. Hackett, T.L. and D.A. Knight, *The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007. **7**(1): p. 63-8.
67. Park, J.A., et al., *Unjamming and cell shape in the asthmatic airway epithelium*. Nat Mater, 2015. **14**(10): p. 1040-8.
68. Aikawa, T., et al., *Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack*. Chest, 1992. **101**(4): p. 916-21.
69. Fahy, J.V., *Remodeling of the airway epithelium in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S46-51.
70. Kuyper, L.M., et al., *Characterization of airway plugging in fatal asthma*. The American Journal of Medicine, 2003. **115**.
71. Boulet, L.P., et al., *Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine*. Chest, 1997. **112**(1): p. 45-52.
72. Roche, W.R., et al., *Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics*. Lancet, 1989. **1**(8637): p. 520-4.
73. Gueders, M.M., et al., *Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases*. Eur J Pharmacol, 2006. **533**(1-3): p. 133-44.
74. Al-Muhsen, S., J.R. Johnson, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 451-62; quiz 463-4.
75. Hostettler, K.E., et al., *Airway epithelium-derived transforming growth factor-beta is a regulator of fibroblast proliferation in both fibrotic and normal subjects*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(8): p. 1309-17.
76. James, A., *Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have?* Clin Exp Allergy, 2005. **35**(6): p. 703-7.
77. Joubert, P. and Q. Hamid, *Role of airway smooth muscle in airway remodeling*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(3): p. 713-6.
78. Grainge, C.L., et al., *Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma*. N Engl J Med, 2011. **364**(21): p. 2006-15.

79. Mailhot-Larouche, S., et al., *Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function*. J Appl Physiol (1985), 2018. **124**(6): p. 1483-1490.
80. Noble, P.B., et al., *Airway smooth muscle in asthma: linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodelling*. Pulm Pharmacol Ther, 2014. **29**(2): p. 96-107.
81. Huang, J., et al., *Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 725-9.
82. Pini, L., et al., *Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics*. Eur Respir J, 2007. **29**(1): p. 71-7.
83. Teague, W.G., N.J. Tustison, and T.A. Altes, *Ventilation heterogeneity in asthma*. J Asthma, 2014. **51**(7): p. 677-84.
84. Downie, S.R., et al., *Ventilation heterogeneity is a major determinant of airway hyperresponsiveness in asthma, independent of airway inflammation*. Thorax, 2007. **62**(8): p. 684-9.
85. Lui, J.K. and K.R. Lutchen, *The role of heterogeneity in asthma: a structure-to-function perspective*. Clinical and Translational Medicine, 2017. **6**(1): p. 29.
86. Bramley, A., et al., *Hypothesis: excessive bronchoconstriction in asthma is due to decreased airway elastance*. European Respiratory Journal, 1994. **7**(2): p. 337-341.
87. Bai, T.R., *Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. A comparison between trachea and bronchus*. Am Rev Respir Dis, 1991. **143**(2): p. 441-3.
88. Bjorck, T., L.E. Gustafsson, and S.E. Dahlen, *Isolated bronchi from asthmatics are hyperresponsive to adenosine, which apparently acts indirectly by liberation of leukotrienes and histamine*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(5): p. 1087-91.
89. Roberts, J.A., et al., *Comparison of in vivo airway responsiveness and in vitro smooth muscle sensitivity to methacholine in man*. Thorax, 1984. **39**(11): p. 837-43.
90. Ijpmma, G., et al., *Human trachealis and main bronchi smooth muscle are normoresponsive in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(8): p. 884-93.
91. Cerrina, J., et al., *Comparison of human bronchial muscle responses to histamine in vivo with histamine and isoproterenol agonists in vitro*. Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(1): p. 57-61.
92. Matusovsky, O.S., et al., *Peripheral Airway Smooth Muscle, but Not the Trachealis, Is Hypercontractile in an Equine Model of Asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016. **54**(5): p. 718-27.
93. Chin, L.Y., et al., *Mechanical properties of asthmatic airway smooth muscle*. Eur Respir J, 2012. **40**(1): p. 45-54.
94. Berair, R., F. Hollins, and C. Brightling, *Airway smooth muscle hypercontractility in asthma*. J Allergy (Cairo), 2013. **2013**: p. 185971.
95. Bosse, Y., et al., *Smooth muscle hypercontractility in airway hyperresponsiveness: innate, acquired, or nonexistent?* J Allergy (Cairo), 2013. **2013**: p. 938046.
96. Lutchen, K.R., P.D. Pare, and C.Y. Seow, *Hyperresponsiveness: Relating the Intact Airway to the Whole Lung*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 322-331.
97. Norris, B.A., et al., *Biphasic force response to iso-velocity stretch in airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **309**(7): p. L653-61.

98. Kapsali, T., et al., *Potent bronchoprotective effect of deep inspiration and its absence in asthma*. J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(2): p. 711-20.
99. Fish, J.E., et al., *Regulation of bronchomotor tone by lung inflation in asthmatic and nonasthmatic subjects*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1981. **50**(5): p. 1079-86.
100. Bosse, Y., et al., *Length adaptation of airway smooth muscle*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(1): p. 62-7.
101. Ali, F., et al., *Mechanism of partial adaptation in airway smooth muscle after a step change in length*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(2): p. 569-77.
102. Wang, L., P.D. Pare, and C.Y. Seow, *Selected contribution: effect of chronic passive length change on airway smooth muscle length-tension relationship*. J Appl Physiol (1985), 2001. **90**(2): p. 734-40.
103. Bosse, Y., et al., *Adaptation of airway smooth muscle to basal tone: relevance to airway hyperresponsiveness*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(1): p. 13-8.
104. Lee-Gosselin, A., et al., *The gain of smooth muscle's contractile capacity induced by tone on in vivo airway responsiveness in mice*. J Appl Physiol (1985), 2015. **118**(6): p. 692-8.
105. Pascoe, C., et al., *Force oscillations simulating breathing maneuvers do not prevent force adaptation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **47**(1): p. 44-9.
106. Bosse, Y., et al., *A 'Good' muscle in a 'Bad' environment: the importance of airway smooth muscle force adaptation to airway hyperresponsiveness*. Respir Physiol Neurobiol, 2011. **179**(2-3): p. 269-75.
107. Bergner A, et al., *Bronchial hyperreactivity is correlated with increased baseline airway tone*. Eur J Med Res, 2006.
108. Canning, B.J. and A. Fischer, *Neural regulation of airway smooth muscle tone*. Respir Physiol, 2001. **125**(1-2): p. 113-27.
109. Molfino, N.A., et al., *Assessment of airway tone in asthma. Comparison between double lung transplant patients and healthy subjects*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(5): p. 1238-43.
110. Kikuchi, R., et al., *Effect of vagal tone on airway smooth muscle force and peribronchial pressure in dogs*. Tohoku J Exp Med, 1982. **136**(2): p. 157-62.
111. FREDBERG, J.J., et al., *Perturbed Equilibrium of Myosin Binding in Airway Smooth Muscle and Its Implications in Bronchospasm*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1999. **159**(3): p. 959-967.
112. Auger, L., et al., *The contractile lability of smooth muscle in asthmatic airway hyperresponsiveness*. Expert Rev Respir Med, 2016. **10**(1): p. 19-27.
113. Otis, A.B., *A perspective of respiratory mechanics*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983. **54**(5): p. 1183-7.
114. Smiley-Jewell, S.M., et al., *Three-dimensional mapping of smooth muscle in the distal conducting airways of mouse, rabbit, and monkey*. J Appl Physiol (1985), 2002. **93**(4): p. 1506-14.
115. Ijpm, G., et al., *Directional preference of airway smooth muscle mass increase in human asthmatic airways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **312**(6): p. L845-L854.

116. Douglas, C.G. and J.S. Haldane, *The capacity of the air passages under varying physiological conditions*. J Physiol, 1912. **45**(4): p. 235-8.
117. Permutt, S., et al., *Effect of lung inflation on static pressure-volume characteristics of pulmonary vessels*. J Appl Physiol, 1961. **16**(1): p. 64-70.
118. Howell, J.B., et al., *Effect of inflation of the lung on different parts of pulmonary vascular bed*. J Appl Physiol, 1961. **16**(1): p. 71-6.
119. Macklin, C.C., *The Musculature of the Bronchi and Lungs: A Retrospect*. Can Med Assoc J, 1929. **20**(4): p. 404.
120. FG, F., *Bronchial peristalsis*. Am J Roentgenol Radium Ther, 1949. **62**: p. 65-9.
121. Schittny, J.C., G. Miserocchi, and M.P. Sparrow, *Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(1): p. 11-8.
122. Mitzner, W., *Airway smooth muscle: the appendix of the lung*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(7): p. 787-90.
123. Fredberg, J.J., *Counterpoint: airway smooth muscle is not useful*. J Appl Physiol (1985), 2007. **102**(4): p. 1709-10; discussion 1710-1.
124. Gazzola, M., et al., *Smooth muscle in human bronchi is disposed to resist airway distension*. Respir Physiol Neurobiol, 2016. **229**: p. 51-8.
125. Tang, D.D., *Critical role of actin-associated proteins in smooth muscle contraction, cell proliferation, airway hyperresponsiveness and airway remodeling*. Respir Res, 2015. **16**: p. 134.
126. Gunst, S.J. and W. Zhang, *Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(3): p. C576-87.
127. Andre-Gregoire, G., et al., *Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **142**(3): p. 824-833 e3.
128. Salari, H., et al., *Effect of phospholipase C inhibitor U-73122 on antigen-induced airway smooth muscle contraction in guinea pigs*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **9**(4): p. 405-10.
129. Penn, R.B., R.A. Bond, and J.K. Walker, *GPCRs and arrestins in airways: implications for asthma*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **219**: p. 387-403.
130. Mukherjee, S., et al., *Ca²⁺ oscillations, Ca²⁺ sensitization, and contraction activated by protein kinase C in small airway smooth muscle*. J Gen Physiol, 2013. **141**(2): p. 165-78.
131. Haick, J.M., et al., *PKC-dependent regulation of Kv7.5 channels by the bronchoconstrictor histamine in human airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **312**(6): p. L822-L834.
132. Dixon, R.E. and L.F. Santana, *A Ca²⁺- and PKC-driven regulatory network in airway smooth muscle*. J Gen Physiol, 2013. **141**(2): p. 161-4.
133. Mitchell, R.W., et al., *Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M(3) receptors in contractile cultured airway myocytes*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(5): p. L1091-100.
134. Spinelli, A.M. and M. Trebak, *Orai channel-mediated Ca²⁺ signals in vascular and airway smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(6): p. C402-13.

135. Soboloff, J., et al., *Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(11): p. 1161-8.
136. Hirota, S., P. Helli, and L.J. Janssen, *Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle*. *Eur Respir J*, 2007. **30**(1): p. 114-33.
137. Prakash, Y.S., et al., *Spatial and temporal aspects of ACh-induced [Ca²⁺]_i oscillations in porcine tracheal smooth muscle*. *Cell Calcium*, 2000. **27**(3): p. 153-162.
138. Jiang, X., et al., *Phosphoinositide 3-kinase pathway activation in phosphate and tensin homolog (PTEN)-deficient prostate cancer cells is independent of receptor tyrosine kinases and mediated by the p110beta and p110delta catalytic subunits*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(20): p. 14980-9.
139. Liu, Q.-H., et al., *Membrane depolarization causes a direct activation of G protein-coupled receptors leading to local Ca²⁺ release in smooth muscle*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(27): p. 11418-11423.
140. Deshpande, D.A., et al., *CD38/cADPR Signaling Pathway in Airway Disease: Regulatory Mechanisms*. *Mediators of Inflammation*, 2018. **2018**: p. 10.
141. Deshpande, D.A., et al., *CD38/cyclic ADP-ribose signaling: role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005. **288**(5): p. L773-L788.
142. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. *Nature*, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
143. Kamm, K.E., et al., *Phosphorylation of smooth muscle myosin heavy and light chains. Effects of phorbol dibutyrate and agonists*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(35): p. 21223-9.
144. Somlyo, A.V., et al., *Smooth muscle myosin: regulation and properties*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. **359**(1452): p. 1921-30.
145. Prakash, Y.S., *Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016. **311**(6): p. L1113-L1140.
146. Ip, K., et al., *Physical Integrity of Smooth Muscle Myosin Filaments is Enhanced by Phosphorylation of the Regulatory Myosin Light Chain*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2007. **20**(5): p. 649-658.
147. Bradley, S.J., et al., *Mapping physiological G protein-coupled receptor signaling pathways reveals a role for receptor phosphorylation in airway contraction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(16): p. 4524-9.
148. Carr, R., 3rd, et al., *Interdicting Gq Activation in Airway Disease by Receptor-Dependent and Receptor-Independent Mechanisms*. *Mol Pharmacol*, 2016. **89**(1): p. 94-104.
149. Varland, S., J. Vandekerckhove, and A. Drazic, *Actin Post-translational Modifications: The Cinderella of Cytoskeletal Control*. *Trends Biochem Sci*, 2019. **44**(6): p. 502-516.

150. Zhang, W. and S.J. Gunst, *Non-muscle (NM) myosin heavy chain phosphorylation regulates the formation of NM myosin filaments, adhesome assembly and smooth muscle contraction*. J Physiol, 2017. **595**(13): p. 4279-4300.
151. Zhang, W., et al., *Activation of the Arp2/3 complex by N-WASp is required for actin polymerization and contraction in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(5): p. C1145-60.
152. Tang, D.D. and S.J. Gunst, *The small GTPase Cdc42 regulates actin polymerization and tension development during contractile stimulation of smooth muscle*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 51722-8.
153. Zhang, W., Y. Huang, and S.J. Gunst, *The small GTPase RhoA regulates the contraction of smooth muscle tissues by catalyzing the assembly of cytoskeletal signaling complexes at membrane adhesion sites*. J Biol Chem, 2012. **287**(41): p. 33996-4008.
154. Hoover, W.C., et al., *Inhibition of p21 activated kinase (PAK) reduces airway responsiveness in vivo and in vitro in murine and human airways*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42601.
155. Wu, Y. and S.J. Gunst, *Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) regulates actin polymerization and contraction in airway smooth muscle by a vinculin-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2015. **290**(18): p. 11403-16.
156. Zhang, W., Y. Huang, and S.J. Gunst, *p21-Activated kinase (Pak) regulates airway smooth muscle contraction by regulating paxillin complexes that mediate actin polymerization*. J Physiol, 2016. **594**(17): p. 4879-900.
157. Zhang, W., et al., *A novel role for RhoA GTPase in the regulation of airway smooth muscle contraction*. Can J Physiol Pharmacol, 2015. **93**(2): p. 129-36.
158. Zhao, R., et al., *Actin depolymerization factor/cofilin activation regulates actin polymerization and tension development in canine tracheal smooth muscle*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36522-31.
159. Lan, B., et al., *Transient stretch induces cytoskeletal fluidization through the severing action of cofilin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018. **314**(5): p. L799-L807.
160. Tang, D.D., *Chapter One - The Dynamic Actin Cytoskeleton in Smooth Muscle*, in *Advances in Pharmacology*, R.A. Khalil, Editor. 2018, Academic Press. p. 1-38.
161. Billington, C.K., et al., *cAMP regulation of airway smooth muscle function*. Pulm Pharmacol Ther, 2013. **26**(1): p. 112-20.
162. Morgan, S.J., et al., *beta-Agonist-mediated relaxation of airway smooth muscle is protein kinase A-dependent*. J Biol Chem, 2014. **289**(33): p. 23065-74.
163. Pera, T. and R.B. Penn, *Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones*. Pharmacol Ther, 2016. **164**: p. 82-96.
164. Ba, M., et al., *HSP20 phosphorylation and airway smooth muscle relaxation*. Cell Health Cytoskelet, 2009. **2009**(1): p. 27-42.
165. Komalavilas, P., et al., *The small heat shock-related protein, HSP20, is a cAMP-dependent protein kinase substrate that is involved in airway smooth muscle relaxation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(1): p. L69-78.

166. Banathy, A., et al., *Heat Shock-Related Protein 20 Peptide Decreases Human Airway Constriction Downstream of beta2-Adrenergic Receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016. **55**(2): p. 225-33.
167. Roscioni, S.S., et al., *Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation*. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(7): p. 1551-63.
168. Pacini, E.S.A., S. Sanders-Silveira, and O.G. R, *The Extracellular cAMP-Adenosine Pathway in Airway Smooth Muscle*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018. **366**(1): p. 75-83.
169. Billington, C.K. and R.B. Penn, *Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle*. *Respir Res*, 2003. **4**(1): p. 2.
170. Johnson, M., *The beta-adrenoceptor*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(5 Pt 3): p. S146-53.
171. Amrani, Y. and P. Bradding, *Chapter One - beta2-Adrenoceptor Function in Asthma*, in *Advances in Immunology*, A.K. Shukla, Editor. 2017, Academic Press. p. 1-28.
172. Gupta, M.K., et al., *Defective Resensitization in Human Airway Smooth Muscle Cells Evokes beta-Adrenergic Receptor Dysfunction in Severe Asthma*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0125803.
173. Johnstone, T.B., et al., *PDE8 Is Expressed in Human Airway Smooth Muscle and Selectively Regulates cAMP Signaling by beta2-Adrenergic Receptors and Adenylyl Cyclase 6*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018. **58**(4): p. 530-541.
174. Mikami, M., et al., *Impaired Relaxation of Airway Smooth Muscle in Mice Lacking the Actin-Binding Protein Gelsolin*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017. **56**(5): p. 628-636.
175. Hamad, A.M., et al., *Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **285**(5): p. L973-83.
176. Deshpande, D.A., et al., *Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction*. *Nat Med*, 2010. **16**(11): p. 1299-304.
177. An, S.S. and S.B. Liggett, *Taste and smell GPCRs in the lung: Evidence for a previously unrecognized widespread chemosensory system*. *Cell Signal*, 2018. **41**: p. 82-88.
178. Haick, J.M. and K.L. Byron, *Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels*. *Pharmacol Ther*, 2016. **165**: p. 14-25.
179. Brueggemann, L.I., et al., *Mechanisms of PKA-Dependent Potentiation of Kv7.5 Channel Activity in Human Airway Smooth Muscle Cells*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(8): p. 2223.
180. Brueggemann, L.I., et al., *Kv7 potassium channels in airway smooth muscle cells: signal transduction intermediates and pharmacological targets for bronchodilator therapy*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012. **302**(1): p. L120-32.
181. Rosner, S.R., et al., *The actin regulator zyxin reinforces airway smooth muscle and accumulates in airways of fatal asthmatics*. *PLoS One*, 2017. **12**(3): p. e0171728.
182. Lan, B., et al., *Force maintenance and myosin filament assembly regulated by Rho-kinase in airway smooth muscle*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. **308**(1): p. L1-10.

183. Zurawski, S.M., et al., *Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction*. EMBO J, 1993. **12**(7): p. 2663-70.
184. Takeda, K., et al., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 627-30.
185. Farghaly, H.S., et al., *Interleukin 13 increases contractility of murine tracheal smooth muscle by a phosphoinositide 3-kinase p110delta-dependent mechanism*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1530-7.
186. Risse, P.A., et al., *Interleukin-13 inhibits proliferation and enhances contractility of human airway smooth muscle cells without change in contractile phenotype*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(6): p. L958-66.
187. Gao, Y.D., et al., *Promoting effects of IL-13 on Ca²⁺ release and store-operated Ca²⁺ entry in airway smooth muscle cells*. Pulm Pharmacol Ther, 2010. **23**(3): p. 182-9.
188. Deshpande, D.A., et al., *Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 36-42.
189. Sathish, V., et al., *Caveolin-1 in cytokine-induced enhancement of intracellular Ca(2+) in human airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(4): p. L607-14.
190. Eum, S.Y., et al., *IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(3): p. L576-84.
191. Tliba, O., et al., *IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle*. British Journal of Pharmacology, 2003. **140**(7): p. 1159-1162.
192. Jiang, H., et al., *Targeting phosphoinositide 3-kinase gamma in airway smooth muscle cells to suppress interleukin-13-induced mouse airway hyperresponsiveness*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **342**(2): p. 305-11.
193. Kellner, J., et al., *IL-13Rα2 Reverses the Effects of IL-13 and IL-4 on Bronchial Reactivity and Acetylcholine-Induced Ca²⁺ Signaling*. International Archives of Allergy and Immunology, 2007. **142**(3): p. 199-210.
194. Chiba, Y., et al., *Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(2): p. 159-67.
195. Kudo, M., et al., *Mfge8 suppresses airway hyperresponsiveness in asthma by regulating smooth muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(2): p. 660-5.
196. Chiba, Y., et al., *A novel STAT6 inhibitor AS1517499 ameliorates antigen-induced bronchial hypercontractility in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **41**(5): p. 516-24.
197. Nino, G., et al., *G Protein betagamma-subunit signaling mediates airway hyperresponsiveness and inflammation in allergic asthma*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32078.

198. Grunstein, M.M., et al., *IL-13-dependent autocrine signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(3): p. L520-8.
199. Josephson, M.B., et al., *IL-13-induced changes in endogenous glucocorticoid metabolism in the lung regulate the proasthmatic response*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(5): p. L382-90.
200. Jia, L., et al., *Effects of the inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-13 on stromal interaction molecule-1 aggregation in human airway smooth muscle intracellular Ca(2+) regulation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **49**(4): p. 601-8.
201. Sathish, V., et al., *Effect of proinflammatory cytokines on regulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ reuptake in human airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(1): p. L26-34.
202. Matsumoto, H., et al., *Interleukin-13 enhanced Ca2+ oscillations in airway smooth muscle cells*. Cytokine, 2012. **57**(1): p. 19-24.
203. Sakai, H., et al., *Mechanisms underlying the pathogenesis of hyper-contractility of bronchial smooth muscle in allergic asthma*. J Smooth Muscle Res, 2017. **53**(0): p. 37-47.
204. Sakai, H., Y. Chiba, and M. Misawa, *Role of Rho kinase in endothelin-1-induced phosphorylation of CPI-17 in rat bronchial smooth muscle*. Pulm Pharmacol Ther, 2007. **20**(6): p. 734-9.
205. Croxton, T.L., B. Lande, and C.A. Hirshman, *Role of G proteins in agonist-induced Ca2+ sensitization of tracheal smooth muscle*. Am J Physiol, 1998. **275**(4): p. L748-55.
206. Suto, W., et al., *Prostaglandin D2 Induces Ca2+ Sensitization of Contraction without Affecting Cytosolic Ca2+ Level in Bronchial Smooth Muscle*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(10): p. 3036.
207. Koziol-White, C.J., et al., *Inhibition of PI3K promotes dilation of human small airways in a rho kinase-dependent manner*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(18): p. 2726-38.
208. Bhattacharya, M., et al., *IQGAP1-dependent scaffold suppresses RhoA and inhibits airway smooth muscle contraction*. J Clin Invest, 2014. **124**(11): p. 4895-8.
209. Chen, J., et al., *Orosomucoid-like 3 (ORMDL3) upregulates airway smooth muscle proliferation, contraction, and Ca(2+) oscillations in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **142**(1): p. 207-218 e6.
210. Weibel, E.R. and D.M. Gomez, *Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures*. Science, 1962. **137**(3530): p. 577-85.
211. Scarpelli, E.M., *Physiology of the alveolar surface network*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **135**(1): p. 39-104.
212. Bosse, Y., et al., *It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 437-62.
213. Asthma, G.I.f., *Global strategy for asthma management and prevention*. Version updated in April 2015: p. Available at: <http://www.ginasthma.org/documents/4>.

214. Carter PM, H.T., Yates SW, Lieberman PL, *Asthma: the irreversible airways disease*. J investig Allergol Clin Immunol, 1997.
215. Sim, Y.S., et al., *Spirometry and Bronchodilator Test*. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2017. **80**(2): p. 105-112.
216. Rietveld, S. and W. Everaerd, *Perceptions of Asthma by Adolescents at Home*. CHEST, 2000. **117**(2): p. 434-439.
217. Rietveld, S., *Symptom perception in asthma: a multidisciplinary review*. J Asthma, 1998. **35**(2): p. 137-46.
218. Gallucci, M., et al., *Use of Symptoms Scores, Spirometry, and Other Pulmonary Function Testing for Asthma Monitoring*. Frontiers in Pediatrics, 2019. **7**(54).
219. Yanai, M., et al., *Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure*. J Appl Physiol (1985), 1992. **72**(3): p. 1016-23.
220. Dubois, A.B., S.Y. Botelho, and J.H. Comroe, Jr., *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, 1956. **35**(3): p. 327-35.
221. Criece, C.P., et al., *Body plethysmography--its principles and clinical use*. Respir Med, 2011. **105**(7): p. 959-71.
222. Tattersfield, A.E. and I.M. Keeping, *Assessing change in airway calibre-- measurement of airway resistance*. Br J Clin Pharmacol, 1979. **8**(4): p. 307-19.
223. de Mir Messa, I., et al., *[Body plethysmography (I): Standardisation and quality criteria]*. An Pediatr (Barc), 2015. **83**(2): p. 136 e1-7.
224. Shore, S., J. Milic-Emili, and J.G. Martin, *Reassessment of body plethysmographic technique for the measurement of thoracic gas volume in asthmatics*. Am Rev Respir Dis, 1982. **126**(3): p. 515-20.
225. Kaminsky, D.A., *What does airway resistance tell us about lung function?* Respir Care, 2012. **57**(1): p. 85-96; discussion 96-9.
226. DuBois, A.B., et al., *Oscillation Mechanics of Lungs and Chest in Man*. Journal of Applied Physiology, 1956. **8**(6): p. 587-594.
227. *Oscillation Mechanics of the Respiratory System*, in *Comprehensive Physiology*.
228. Oostveen, E., et al., *The forced oscillation technique in clinical practice: methodology, recommendations and future developments*. Eur Respir J, 2003. **22**(6): p. 1026-41.
229. Clement, J., F.J. Landser, and K.P. Van de Woestijne, *Total resistance and reactance in patients with respiratory complaints with and without airways obstruction*. Chest, 1983. **83**(2): p. 215-20.
230. Duggan, C.J., et al., *Bronchodilatation induced by deep breaths in relation to transpulmonary pressure and lung volume*. Thorax, 1990. **45**(12): p. 930-4.
231. Hanafi Alamdari, H., K. El-Sankary, and G.N. Maksym, *Time-varying respiratory mechanics as a novel mechanism behind frequency dependence of impedance: A modeling approach*. IEEE Trans Biomed Eng, 2018: p. 1-1.
232. Paredi, P., et al., *Comparison of inspiratory and expiratory resistance and reactance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 2010. **65**(3): p. 263-7.

233. Kanda, S., et al., *Evaluation of respiratory impedance in asthma and COPD by an impulse oscillation system*. Intern Med, 2010. **49**(1): p. 23-30.
234. Beydon, N., et al., *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(12): p. 1304-45.
235. Oostveen, E., et al., *Respiratory impedance in healthy subjects: baseline values and bronchodilator response*. Eur Respir J, 2013. **42**(6): p. 1513-23.
236. Irvin, C.G. and J.H. Bates, *Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size*. Respir Res, 2003. **4**(1): p. 4.
237. Gomes, R.F. and J.H. Bates, *Geometric determinants of airway resistance in two isomorphic rodent species*. Respir Physiol Neurobiol, 2002. **130**(3): p. 317-25.
238. Bennett, F.M. and S.M. Tenney, *Comparative mechanics of mammalian respiratory system*. Respir Physiol, 1982. **49**(2): p. 131-40.
239. Bates, J.H.T., *CORP: Measurement of lung function in small animals*. J Appl Physiol (1985), 2017. **123**(5): p. 1039-1046.
240. Bates, J.H. and C.G. Irvin, *Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle*. J Appl Physiol (1985), 2003. **94**(4): p. 1297-306.
241. Hantos, Z., et al., *Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs*. J Appl Physiol (1985), 1992. **72**(1): p. 168-78.
242. Fredberg, J.J. and D. Stamenovic, *On the imperfect elasticity of lung tissue*. J Appl Physiol (1985), 1989. **67**(6): p. 2408-19.
243. Mailhot-Larouche, S., et al., *Assessment of Respiratory Function in Conscious Mice by Double-chamber Plethysmography*. J Vis Exp, 2018(137): p. e57778.
244. Pennock, B.E., et al., *A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979. **46**(2): p. 399-406.
245. Nabe, T., et al., *Roles of basophils and mast cells infiltrating the lung by multiple antigen challenges in asthmatic responses of mice*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(2): p. 462-76.
246. Desmet, C., et al., *Treatment of experimental asthma by decoy-mediated local inhibition of activator protein-1*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(6): p. 671-8.
247. Bosse, Y., *Asthmatic airway hyperresponsiveness: the ants in the tree*. Trends Mol Med, 2012. **18**(11): p. 627-33.
248. Black, J.L., et al., *Airway smooth muscle in asthma: just a target for bronchodilation?* Clin Chest Med, 2012. **33**(3): p. 543-58.
249. Busse, W.W., *The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance*. Chest, 2010. **138**(2 Suppl): p. 4S-10S.
250. Cockcroft, D.W., et al., *Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity*. Clin Allergy, 1977. **7**(6): p. 503-13.
251. Mapp, C.E., et al., *Time course of the increase in airway responsiveness associated with late asthmatic reactions to toluene diisocyanate in sensitized subjects*. J Allergy Clin Immunol, 1985. **75**(5): p. 568-72.

252. Bosse, Y., et al., *Chronic activation in shortened airway smooth muscle: a synergistic combination underlying airway hyperresponsiveness?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(3): p. 341-8.
253. Benson, M.K., *Bronchial responsiveness to inhaled histamine and isoprenaline in patients with airway obstruction.* Thorax, 1978. **33**(2): p. 211-3.
254. Bergner, A., et al., *Bronchial hyperreactivity is correlated with increased baseline airway tone.* Eur J Med Res, 2006. **11**(2): p. 77-84.
255. Crapo, R.O., et al., *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, 2000. **161**(1): p. 309-29.
256. Hida, W., et al., *Effect of inspiratory flow rate on bronchomotor tone in normal and asthmatic subjects.* Thorax, 1984. **39**(2): p. 86-92.
257. Salerno, F.G., et al., *Attenuation of induced bronchoconstriction in healthy subjects: effects of breathing depth.* J Appl Physiol, 2005. **98**(3): p. 817-21.
258. Nadel, J.A. and D.F. Tierney, *Effect of a previous deep inspiration on airway resistance in man.* J Appl Physiol, 1961. **16**: p. 717-9.
259. Gobbi, A., et al., *Short-term variability in respiratory impedance and effect of deep breath in asthmatic and healthy subjects with airway smooth muscle activation and unloading.* J Appl Physiol (1985), 2013. **115**(5): p. 708-15.
260. Lee-Gosselin, A., et al., *Does the length dependency of airway smooth muscle force contribute to airway hyperresponsiveness?* J Appl Physiol (1985), 2013. **115**(9): p. 1304-15.
261. Lee-Gosselin, A., et al., *The gain of smooth muscle's contractile capacity induced by tone on in vivo airway responsiveness in mice.* J Appl Physiol (1985), 2015: p. jap 00645 2014.
262. Lappas, A.S., A. Tzorti, and P.K. Behrakis, *Forced oscillations in applied respiratory physiology: Theoretical Principles.* Pneumon, 2013. **26**(4): p. 327-45.
263. Salome, C.M., et al., *Airway re-narrowing following deep inspiration in asthmatic and nonasthmatic subjects.* Eur Respir J, 2003. **22**(1): p. 62-8.
264. Jensen, A., et al., *Selected contribution: airway caliber in healthy and asthmatic subjects: effects of bronchial challenge and deep inspirations.* J Appl Physiol, 2001. **91**(1): p. 506-15; discussion 504-5.
265. Brown, R.H., et al., *Airway distension with lung inflation measured by HRCT.* Acad Radiol, 2003. **10**(10): p. 1097-103.
266. Mendonca, N.T., et al., *Airway resistance at maximum inhalation as a marker of asthma and airway hyperresponsiveness.* Respir Res, 2011. **12**: p. 96.
267. Jackson, A.C., et al., *Deep breath reversal and exponential return of methacholine-induced obstruction in asthmatic and nonasthmatic subjects.* J Appl Physiol, 2004. **96**(1): p. 137-42.
268. Chapman, D.G., et al., *Smooth muscle in the maintenance of increased airway resistance elicited by methacholine in humans.* Am J Respir Crit Care Med, 2014. **190**(8): p. 879-85.

269. Seow, C.Y., *Myosin filament assembly in an ever-changing myofilament lattice of smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(6): p. C1363-8.
270. Brackel, H.J., et al., *Central airways behave more stiffly during forced expiration in patients with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(3 Pt 1): p. 896-904.
271. Kelly, V.J., et al., *A method to determine in vivo, specific airway compliance, in humans*. Med Biol Eng Comput, 2010. **48**(5): p. 489-96.
272. Noble, P.B., D.J. Turner, and H.W. Mitchell, *Relationship of airway narrowing, compliance, and cartilage in isolated bronchial segments*. J Appl Physiol, 2002. **92**(3): p. 1119-24.
273. Jiang, H. and N.L. Stephens, *Contractile properties of bronchial smooth muscle with and without cartilage*. J Appl Physiol, 1990. **69**(1): p. 120-6.
274. McParland, B.E., et al., *The role of airway smooth muscle during an attack of asthma simulated in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(5): p. 500-4.
275. Black, L.D., et al., *Relating maximum airway dilation and subsequent reconstriction to reactivity in human lungs*. J Appl Physiol (1985), 2004. **96**(5): p. 1808-14.
276. Chapman, D.G., et al., *Effect of deep inspiration avoidance on ventilation heterogeneity and airway responsiveness in healthy adults*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(5): p. 1400-5.
277. Lutchen, K.R., et al., *Airway constriction pattern is a central component of asthma severity: the role of deep inspirations*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(2): p. 207-15.
278. Venegas, J.G., et al., *Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts*. Nature, 2005. **434**(7034): p. 777-82.
279. Tgavalekos, N.T., et al., *Identifying airways responsible for heterogeneous ventilation and mechanical dysfunction in asthma: an image functional modeling approach*. J Appl Physiol (1985), 2005. **99**(6): p. 2388-97.
280. Hardaker, K.M., et al., *Predictors of airway hyperresponsiveness differ between old and young patients with asthma*. Chest, 2011. **139**(6): p. 1395-401.
281. Lutchen, K.R. and H. Gillis, *Relationship between heterogeneous changes in airway morphometry and lung resistance and elastance*. J Appl Physiol, 1997. **83**(4): p. 1192-201.
282. Lutchen, K.R., et al., *Airway inhomogeneities contribute to apparent lung tissue mechanics during constriction*. J Appl Physiol (1985), 1996. **80**(5): p. 1841-9.
283. Downie, S.R., et al., *Effect of methacholine on peripheral lung mechanics and ventilation heterogeneity in asthma*. J Appl Physiol, 2013. **114**(6): p. 770-7.
284. Tsuda, A., F.S. Henry, and J.P. Butler, *Particle transport and deposition: basic physics of particle kinetics*. Compr Physiol, 2013. **3**(4): p. 1437-71.
285. Amin, S.D., et al., *Modeling the dynamics of airway constriction: effects of agonist transport and binding*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(2): p. 553-63.
286. Schmekel, B., et al., *The bronchial response, but not the pulmonary response to inhaled methacholine is dependent on the aerosol deposition pattern*. Chest, 1994. **106**(6): p. 1781-7.
287. Wagner, E.M. and W.A. Mitzner, *Bronchial circulatory reversal of methacholine-induced airway constriction*. J Appl Physiol (1985), 1990. **69**(4): p. 1220-4.

288. Kelly, L., et al., *Bronchial blood flow affects recovery from constriction in dog lung periphery*. J Appl Physiol (1985), 1986. **60**(6): p. 1954-9.
289. Fredberg, J.J., *Frozen objects: small airways, big breaths, and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(4): p. 615-24.
290. Ansell, T.K., et al., *Pharmacological bronchodilation is partially mediated by reduced airway wall stiffness*. Br J Pharmacol, 2014.
291. Lauzon, A. and J. Martin, *Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor [version 1; referees: 2 approved]*. Vol. 5. 2016.
292. An, S.S., et al., *Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma*. Eur Respir J, 2007. **29**(5): p. 834-60.
293. An, S.S., et al., *An inflammation-independent contraction mechanophenotype of airway smooth muscle in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(1): p. 294-297 e4.
294. Gazzola, M., et al., *Airway smooth muscle tone increases airway responsiveness in healthy young adults*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **312**(3): p. L348-L357.
295. Mahn, K., et al., *Ca(2+) homeostasis and structural and functional remodelling of airway smooth muscle in asthma*. Thorax, 2010. **65**(6): p. 547-52.
296. Brook, B.S., *Emergence of airway smooth muscle mechanical behavior through dynamic reorganization of contractile units and force transmission pathways*. J Appl Physiol (1985), 2014. **116**(8): p. 980-97.
297. Wang, T., et al., *Recruitment of beta-catenin to N-cadherin is necessary for smooth muscle contraction*. J Biol Chem, 2015. **290**(14): p. 8913-24.
298. Halayko, A.J., et al., *Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes*. Am J Physiol, 1999. **276**(1): p. L197-206.
299. Park, C.Y., et al., *High-throughput screening for modulators of cellular contractile force*. Integr Biol (Camb), 2015. **7**(10): p. 1318-24.
300. Bosse, Y., et al., *Airway hyperresponsiveness in asthma: A better understanding yet to yield clinical benefit*. J Allergy Ther, 2013. **4**(5): p. 10 pages.
301. Lauzon, A.M., et al., *A multi-scale approach to airway hyperresponsiveness: from molecule to organ*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 191.
302. Puetz, S., L.T. Lubomirov, and G. Pfitzer, *Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**(6): p. 342-56.
303. Polio, S.R., et al., *Extracellular matrix stiffness regulates force transmission pathways in multicellular ensembles of human airway smooth muscle cells*. bioRxiv, 2018: p. 402842.
304. Lockett, A.D., Y. Wu, and S.J. Gunst, *Elastase alters contractility and promotes an inflammatory synthetic phenotype in airway smooth muscle tissues*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018. **314**(4): p. L626-L634.
305. Zhang, W., B.P. Bhetwal, and S.J. Gunst, *Rho kinase collaborates with p21-activated kinase to regulate actin polymerization and contraction in airway smooth muscle*. J Physiol, 2018. **596**(16): p. 3617-3635.

306. Reyhani, V., et al., *PDGF-BB enhances collagen gel contraction through a PI3K-PLCgamma-PKC-cofilin pathway*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8924.
307. Gandhi, V.D., et al., *House dust mite interactions with airway epithelium: role in allergic airway inflammation*. Curr Allergy Asthma Rep, 2013. **13**(3): p. 262-70.
308. Lortie, K., et al., *CD34 Differentially Regulates Contractile and Noncontractile Elements of Airway Reactivity*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018. **58**(1): p. 79-88.
309. Gendron, D., et al., *Treatment with a sphingosine analog after the inception of house dust mite-induced airway inflammation alleviates key features of experimental asthma*. Respir Res, 2015. **16**(1): p. 7.
310. Gregory, L.G. and C.M. Lloyd, *Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung*. Trends Immunol, 2011. **32**(9): p. 402-11.
311. Yocum, G.T., et al., *GABAA receptor $\alpha 4$ -subunit knockout enhances lung inflammation and airway reactivity in a murine asthma model*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2017. **313**(2): p. L406-L415.
312. Kaczka, D.W. and J.L. Smallwood, *Constant-phase descriptions of canine lung, chest wall, and total respiratory system viscoelasticity: effects of distending pressure*. Respiratory physiology & neurobiology, 2012. **183**(2): p. 75-84.
313. Riesenfeld, E.P., et al., *Inhaled salmeterol and/or fluticasone alters structure/function in a murine model of allergic airways disease*. Respir Res, 2010. **11**(1): p. 22.
314. Bates, J.H., et al., *The synergistic interactions of allergic lung inflammation and intratracheal cationic protein*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(3): p. 261-8.
315. Katoh, T. and K. Ikeda, *A comparison of sevoflurane with halothane, enflurane, and isoflurane on bronchoconstriction caused by histamine*. Can J Anaesth, 1994. **41**(12): p. 1214-9.
316. Duracher, C., et al., *The effects of isoflurane on airway smooth muscle crossbridge kinetics in Fisher and Lewis rats*. Anesth Analg, 2005. **101**(1): p. 136-42, table of contents.
317. Mercier, F.J. and A. Denjean, *Guinea-pig tracheal responsiveness in vitro following general anaesthesia with halothane*. Eur Respir J, 1996. **9**(7): p. 1451-5.
318. Belcher, N.G., et al., *A comparison of the refractory periods induced by hypertonic airway challenge and exercise in bronchial asthma*. Am Rev Respir Dis, 1987. **135**(4): p. 822-5.
319. Borges, M.C., et al., *Protective effect of bronchial challenge with hypertonic saline on nocturnal asthma*. Braz J Med Biol Res, 2008. **41**(3): p. 209-14.
320. Pineiro-Hermida, S., et al., *Characterization of the acute inflammatory profile and resolution of airway inflammation after Igf1r-gene targeting in a murine model of HDM-induced asthma*. PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0190159.
321. Solway, J. and J.J. Fredberg, *Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(2): p. 144-6.
322. Noble, P.B., D.J. Turner, and H.W. Mitchell, *Relationship of airway narrowing, compliance, and cartilage in isolated bronchial segments*. Journal of Applied Physiology, 2002. **92**(3): p. 1119-1124.

323. Bhatawadekar, S.A., D. Leary, and G.N. Maksym, *Modelling resistance and reactance with heterogeneous airway narrowing in mild to severe asthma*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015. **93**(3): p. 207-14.
324. King, M. and N. Viires, *Effect of methacholine chloride on rheology and transport of canine tracheal mucus*. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1979. **47**(1): p. 26-31.
325. Nadel, J.A. and D.F. Tierney, *Effect of a previous deep inspiration on airway resistance in man*. *J Appl Physiol*, 1961. **16**(4): p. 717-9.
326. Rogers, D.F. and P.J. Barnes, *Treatment of airway mucus hypersecretion*. *Ann Med*, 2006. **38**(2): p. 116-25.
327. Adler, K.B., M.J. Tuvim, and B.F. Dickey, *Regulated mucin secretion from airway epithelial cells*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013. **4**(129): p. 129.
328. Clarke, S.W. and D. Pavia, *Lung mucus production and mucociliary clearance: methods of assessment*. *Br J Clin Pharmacol*, 1980. **9**(6): p. 537-46.
329. Seow, C.Y. and J. Solway, *Mechanical and Structural Plasticity*, in *Comprehensive Physiology*. 2011. p. 283-293.
330. Gunst, S.J., et al., *Mechanisms for the mechanical plasticity of tracheal smooth muscle*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1995. **268**(5): p. C1267-C1276.
331. Huang, Y., W. Zhang, and S.J. Gunst, *Activation of vinculin induced by cholinergic stimulation regulates contraction of tracheal smooth muscle tissue*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(5): p. 3630-44.
332. Wang, Y., et al., *Role and regulation of Abelson tyrosine kinase in Crk-associated substrate/profilin-1 interaction and airway smooth muscle contraction*. *Respir Res*, 2018. **19**(1): p. 4.
333. Wang, R., et al., *The association of cortactin with profilin-1 is critical for smooth muscle contraction*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(20): p. 14157-69.
334. Bravo-Cordero, J.J., et al., *Functions of cofilin in cell locomotion and invasion*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013. **14**: p. 405.
335. Niwa, R., et al., *Control of Actin Reorganization by Slingshot, a Family of Phosphatases that Dephosphorylate ADF/Cofilin*. *Cell*, 2002. **108**(2): p. 233-246.
336. Gohla, A., J. Birkenfeld, and G.M. Bokoch, *Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics*. *Nature Cell Biology*, 2005. **7**(1): p. 21-29.
337. Ambach, A., et al., *The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes*. *European Journal of Immunology*, 2000. **30**(12): p. 3422-3431.
338. Scott, R.W., et al., *LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells*. *The Journal of Cell Biology*, 2010. **191**(1): p. 169-185.
339. Toshima, J., et al., *Cofilin Phosphorylation by Protein Kinase Testicular Protein Kinase 1 and Its Role in Integrin-mediated Actin Reorganization and Focal Adhesion Formation*. *Molecular Biology of the Cell*, 2001. **12**(4): p. 1131-1145.

340. Toshima, J., et al., *Cofilin Phosphorylation and Actin Reorganization Activities of Testicular Protein Kinase 2 and Its Predominant Expression in Testicular Sertoli Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(33): p. 31449-31458.
341. Scoville, D.K., et al., *Quantum dots and mouse strain influence house dust mite-induced allergic airway disease*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2019. **368**: p. 55-62.
342. Carr, T.F. and E. Bleecker, *Asthma heterogeneity and severity*. World Allergy Organ J, 2016. **9**(1): p. 41.
343. Busse, W.W., et al., *Long-acting muscarinic antagonists: a potential add-on therapy in the treatment of asthma?* Eur Respir Rev, 2016. **25**(139): p. 54-64.
344. Bateman, E.D., et al., *Tiotropium is noninferior to salmeterol in maintaining improved lung function in B16-Arg/Arg patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(2): p. 315-22.
345. Kerstjens, H.A., et al., *Tiotropium or salmeterol as add-on therapy to inhaled corticosteroids for patients with moderate symptomatic asthma: two replicate, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, active-comparator, randomised trials*. Lancet Respir Med, 2015. **3**(5): p. 367-76.
346. Fryer, A.D., et al., *Neuronal eotaxin and the effects of CCR3 antagonist on airway hyperreactivity and M2 receptor dysfunction*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 228-36.
347. Minette, P.A., et al., *A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects*. J Appl Physiol (1985), 1989. **67**(6): p. 2461-5.
348. Mitchell, R.W., E. Kelly, and A.R. Leff, *Reduced activity of acetylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle homogenates after active immune-sensitization*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **5**(1): p. 56-62.
349. Canning, B.J., *Reflex regulation of airway smooth muscle tone*. J Appl Physiol, 2006. **101**(3): p. 971-85.
350. West, P.W., et al., *Morphologic Characterization of Nerves in Whole-Mount Airway Biopsies*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(1): p. 30-9.
351. Pieper, M.P., *The non-neuronal cholinergic system as novel drug target in the airways*. Life Sci, 2012. **91**(21-22): p. 1113-8.
352. Lambert, R.K., et al., *Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD*. J Appl Physiol, 1993. **74**(6): p. 2771-81.
353. Herrera, A.M., et al., *'Sarcomeres' of smooth muscle: functional characteristics and ultrastructural evidence*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 11): p. 2381-92.
354. Fredberg, J.J., et al., *Airway smooth muscle, tidal stretches, and dynamically determined contractile states*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(6): p. 1752-9.
355. Bossé, Y. and P.D. Paré, *The contractile properties of airway smooth muscle: How their defects can be linked to asthmatic airway hyperresponsiveness?* Curr Respir Med Rev, 2013. **9**(1): p. 42-68.
356. Ijpm, G., O. Matusovsky, and A.M. Lauzon, *Accumulating evidence for increased velocity of airway smooth muscle shortening in asthmatic airway hyperresponsiveness*. J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 156909.

357. Oliver, M.N., et al., *Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(3): p. 264-72.
358. Ijpma, G., et al., *Directional preference of airway smooth muscle mass increase in human asthmatic airways.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017: p. ajplung 00353 2016.
359. Bates, J.H., *Stochastic model of the pulmonary airway tree and its implications for bronchial responsiveness.* J Appl Physiol, 1993. **75**(6): p. 2493-9.
360. King, G.G., et al., *Heterogeneity of narrowing in normal and asthmatic airways measured by HRCT.* Eur Respir J, 2004. **24**(2): p. 211-8.
361. Chen, B.T. and G.A. Johnson, *Dynamic lung morphology of methacholine-induced heterogeneous bronchoconstriction.* Magn Reson Med, 2004. **52**(5): p. 1080-6.
362. Dame Carroll, J.R., et al., *Greater parallel heterogeneity of airway narrowing and airway closure in asthma measured by high-resolution CT.* Thorax, 2015. **70**(12): p. 1163-70.
363. King, G.G., et al., *Differences in airway closure between normal and asthmatic subjects measured with single-photon emission computed tomography and technegas.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1900-6.
364. de Lange, E.E., et al., *The variability of regional airflow obstruction within the lungs of patients with asthma: assessment with hyperpolarized helium-3 magnetic resonance imaging.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1072-8.
365. Campana, L., et al., *Probing airway conditions governing ventilation defects in asthma via hyperpolarized MRI image functional modeling.* J Appl Physiol, 2009. **106**(4): p. 1293-300.
366. Bosse, Y., et al., *It's not all smooth muscle: Nonsmooth muscle elements in control of resistance to airflow.* Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 437-62.
367. White, J. and N.M. Eiser, *The role of histamine and its receptors in the pathogenesis of asthma.* Br J Dis Chest, 1983. **77**(3): p. 215-26.
368. Lam, S., et al., *Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma.* J Allergy Clin Immunol, 1988. **81**(4): p. 711-7.
369. Mattoli, S., et al., *Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction.* J Allergy Clin Immunol, 1991. **88**(3 Pt 1): p. 376-84.
370. Murray, J.J., et al., *Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge.* N Engl J Med, 1986. **315**(13): p. 800-4.
371. Wenzel, S.E., J.Y. Westcott, and G.L. Larsen, *Bronchoalveolar lavage fluid mediator levels 5 minutes after allergen challenge in atopic subjects with asthma: relationship to the development of late asthmatic responses.* J Allergy Clin Immunol, 1991. **87**(2): p. 540-8.
372. Driver, A.G., et al., *Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma.* Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(1): p. 91-7.
373. Liu, M.C., et al., *Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes.* Am Rev Respir Dis, 1991. **144**(1): p. 51-8.

374. Krug, N., et al., *Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1841-3.
375. Tomaki, M., et al., *Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(3 Pt 1): p. 613-7.
376. Ammit, A.J., et al., *Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma*. Faseb J, 2001. **15**(7): p. 1212-4.
377. Grandel, K.E., et al., *Association of platelet-activating factor with primary acquired cold urticaria*. N Engl J Med, 1985. **313**(7): p. 405-9.
378. Leff, A.R. and N.M. Munoz, *Cholinergic and alpha adrenergic augmentation of histamine-induced contraction of canine airway smooth muscle*. J Pharmacol Exp Ther, 1981. **218**(3): p. 582-7.
379. Jones, G.L., et al., *Effect of an inhaled thromboxane mimetic (U46619) on airway function in human subjects*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(6): p. 1270-4.
380. Kanazawa, H., et al., *Low concentration endothelin-1 enhanced histamine-mediated bronchial contractions of guinea pigs in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(2): p. 717-21.
381. Mitchell, C. and A. Bouhuys, *Interaction between bronchoconstrictor stimuli on human airway smooth muscle*. Yale J Biol Med, 1976. **49**(4): p. 317-25.
382. Watanabe, K., et al., *Importance of the angiotensin type 1 receptor in angiotensin II-induced bronchoconstriction and bronchial hyperresponsiveness in the guinea pig*. Exp Lung Res, 2004. **30**(3): p. 207-21.
383. Gerthoffer, W.T., *Agonist synergism in airway smooth muscle contraction*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(2): p. 800-7.
384. Gunst, S.J., J.Q. Stropp, and N.A. Flavahan, *Interaction of contractile responses in canine tracheal smooth muscle*. J Appl Physiol, 1987. **63**(2): p. 514-20.
385. Liu, C., T. Tazzeo, and L.J. Janssen, *Isoprostane-induced airway hyperresponsiveness is dependent on internal Ca²⁺ handling and Rho/ROCK signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(6): p. L1177-84.
386. Catalli, A. and L.J. Janssen, *Augmentation of bovine airway smooth muscle responsiveness to carbachol, KCl, and histamine by the isoprostane 8-iso-PGE₂*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(5): p. L1035-41.
387. Creese, B.R. and M.K. Bach, *Hyperreactivity of airways smooth muscle produced in vitro by leukotrienes*. Prostaglandins Leukot Med, 1983. **11**(2): p. 161-9.
388. Millar, E.A., J.E. Nally, and N.C. Thomson, *Angiotensin II potentiates methacholine-induced bronchoconstriction in human airway both in vitro and in vivo*. Eur Respir J, 1995. **8**(11): p. 1838-41.
389. Oguma, T., et al., *Roles of P2X receptors and Ca²⁺ sensitization in extracellular adenosine triphosphate-induced hyperresponsiveness in airway smooth muscle*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(6): p. 893-900.
390. Gold, W.M., G.F. Kessler, and D.Y. Yu, *Role of vagus nerves in experimental asthma in allergic dogs*. J Appl Physiol, 1972. **33**(6): p. 719-25.

391. Canning, B.J., S.M. Reynolds, and S.B. Mazzone, *Multiple mechanisms of reflex bronchospasm in guinea pigs*. J Appl Physiol, 2001. **91**(6): p. 2642-53.
392. Dixon, M., D.M. Jackson, and I.M. Richards, *The effects of histamine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on lung mechanics and irritant receptors in the dog*. J Physiol, 1979. **287**: p. 393-403.
393. Mills, J.E. and J.G. Widdicombe, *Role of the vagus nerves in anaphylaxis and histamine-induced bronchoconstrictions in guinea-pigs*. Br J Pharmacol, 1970. **39**(4): p. 724-31.
394. Rynko, A.E., A.D. Fryer, and D.B. Jacoby, *Interleukin-1beta mediates virus-induced m2 muscarinic receptor dysfunction and airway hyperreactivity*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **51**(4): p. 494-501.
395. Pare, P.D. and W. Mitzner, *Airway-parenchymal interdependence*. Compr Physiol, 2012. **2**: p. 1921-1935.
396. Gelb, A.F., et al., *Unsuspected loss of lung elastic recoil in chronic persistent asthma*. Chest, 2002. **121**(3): p. 715-21.
397. Mauad, T., et al., *Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(8): p. 857-62.
398. Pare, P.D. and T.R. Bai, *The consequences of chronic allergic inflammation*. Thorax, 1995. **50**(4): p. 328-32.
399. Pare, P.D., *Airway hyperresponsiveness in asthma: geometry is not everything!* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(8): p. 913-4.
400. Wagers, S.S., et al., *Extravascular fibrin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitors, and airway hyperresponsiveness*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 104-11.
401. Bosse, Y., P.D. Pare, and C.Y. Seow, *Airway wall remodeling in asthma: from the epithelial layer to the adventitia*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(4): p. 357-66.
402. Pare, P.D., B.E. McParland, and C.Y. Seow, *Structural basis for exaggerated airway narrowing*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. **85**(7): p. 653-8.
403. Van de Graaf, E.A., et al., *Respiratory membrane permeability and bronchial hyperreactivity in patients with stable asthma. Effects of therapy with inhaled steroids*. Am Rev Respir Dis, 1991. **143**(2): p. 362-8.
404. Kuyper, L.M., et al., *Characterization of airway plugging in fatal asthma*. Am J Med, 2003. **115**(1): p. 6-11.
405. Richmond, I., et al., *Intrasubject variability in airway inflammation in biopsies in mild to moderate stable asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(3): p. 899-903.
406. Wagers, S., et al., *The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung?* J Appl Physiol, 2004. **96**(6): p. 2019-27.
407. Fredberg, J.J., *Counterpoint: airway smooth muscle is not useful*. J Appl Physiol, 2007. **102**(4): p. 1709-10; discussion 1710-1.
408. Seow, C.Y. and J.J. Fredberg, *Historical perspective on airway smooth muscle: the saga of a frustrated cell*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 938-52.

409. Olsen, C.R., A.E. Stevens, and M.B. McIlroy, *Rigidity of tracheae and bronchi during muscular constriction*. J Appl Physiol, 1967. **23**(1): p. 27-34.
410. Sasaki, H. and F.G. Hoppin, Jr., *Hysteresis of contracted airway smooth muscle*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979. **47**(6): p. 1251-62.
411. Gunst, S.J., *Contractile force of canine airway smooth muscle during cyclical length changes*. J Appl Physiol, 1983. **55**(3): p. 759-69.
412. Krishnan, R., et al., *Airway smooth muscle and bronchospasm: fluctuating, fluidizing, freezing*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **163**(1-3): p. 17-24.
413. Bullimore, S.R., et al., *Could an increase in airway smooth muscle shortening velocity cause airway hyperresponsiveness?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(1): p. L121-31.
414. Pratusевич, V.R., C.Y. Seow, and L.E. Ford, *Plasticity in canine airway smooth muscle*. J Gen Physiol, 1995. **105**(1): p. 73-94.
415. Dowell, M.L., et al., *Latrunculin B increases force fluctuation-induced relengthening of ACh-contracted, isotonicly shortened canine tracheal smooth muscle*. J Appl Physiol, 2005. **98**(2): p. 489-97.
416. Chapman, D.G., et al., *Smooth Muscle in the Maintenance of Increased Airway Resistance Elicited by Methacholine in Humans*. Am J Respir Crit Care Med, 2014.
417. Noble, P.B., et al., *Airway narrowing and bronchodilation to deep inspiration in bronchial segments from subjects with and without reported asthma*. J Appl Physiol, 2013. **114**(10): p. 1460-71.
418. Noble, P.B., et al., *Responsiveness of the human airway in vitro during deep inspiration and tidal oscillation*. J Appl Physiol, 2011. **110**(6): p. 1510-8.
419. Ijpm, G., et al., *Human Trachealis and Main Bronchi Smooth Muscle Are Normo-Responsive in Asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2015.
420. Chin, L.Y., et al., *Human airway smooth muscle is structurally and mechanically similar to that of other species*. Eur Respir J, 2010. **36**(1): p. 170-7.
421. Lavoie, T.L., et al., *Dilatation of the constricted human airway by tidal expansion of lung parenchyma*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(3): p. 225-32.
422. Harvey, B.C., H. Parameswaran, and K.R. Lutchen, *Can breathing-like pressure oscillations reverse or prevent narrowing of small intact airways?* J Appl Physiol (1985), 2015. **119**(1): p. 47-54.
423. Tawhai, M.H., et al., *Supine and prone differences in regional lung density and pleural pressure gradients in the human lung with constant shape*. J Appl Physiol, 2009. **107**(3): p. 912-20.
424. Taylor, S.M., P.D. Pare, and R.R. Schellenberg, *Cholinergic and nonadrenergic mechanisms in human and guinea pig airways*. J Appl Physiol, 1984. **56**(4): p. 958-65.
425. Ellis, J.L. and B.J. Udem, *Role of cysteinyl-leukotrienes and histamine in mediating intrinsic tone in isolated human bronchi*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(1): p. 118-22.
426. Watson, N., H. Magnussen, and K.F. Rabe, *The relevance of resting tension to responsiveness and inherent tone of human bronchial smooth muscle*. Br J Pharmacol, 1998. **123**(4): p. 694-700.

427. Gunst, S.J. and J.J. Fredberg, *The first three minutes: smooth muscle contraction, cytoskeletal events, and soft glasses*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(1): p. 413-25.
428. Seow, C.Y., *Passive stiffness of airway smooth muscle: the next target for improving airway distensibility and treatment for asthma?* Pulm Pharmacol Ther, 2013. **26**(1): p. 37-41.
429. Tiddens, H.A., et al., *Compliance, hysteresis, and collapsibility of human small airways*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(4): p. 1110-8.
430. Ito, S., et al., *Viscoelastic and dynamic nonlinear properties of airway smooth muscle tissue: roles of mechanical force and the cytoskeleton*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1227-37.
431. Pyrgos, G., et al., *Bronchodilation response to deep inspirations in asthma is dependent on airway distensibility and air trapping*. J Appl Physiol, 2011. **110**(2): p. 472-9.
432. Shen, X., et al., *Greater airway narrowing in immature than in mature rabbits during methacholine challenge*. J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(6): p. 2637-43.
433. Kott, K.S., et al., *Methacholine responsiveness of proximal and distal airways of monkeys and rats using videomicroscopy*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(3): p. 989-96.
434. Panitch, H.B., et al., *Maturation changes in airway smooth muscle structure-function relationships*. Pediatr Res, 1992. **31**(2): p. 151-6.
435. Chitano, P. and T.M. Murphy, *Maturation changes in airway smooth muscle shortening and relaxation. Implications for asthma*. Respir Physiol Neurobiol, 2003. **137**(2-3): p. 347-59.
436. Tokuyama, K., et al., *Attenuation of tachykinin-induced airflow obstruction and microvascular leakage in immature airways*. Br J Pharmacol, 1993. **108**(1): p. 23-9.
437. Sparrow, M.P. and H.W. Mitchell, *Contraction of smooth muscle of pig airway tissues from before birth to maturity*. J Appl Physiol (1985), 1990. **68**(2): p. 468-77.
438. Haxhiu-Poskurica, B., et al., *Tracheal smooth muscle responses to substance P and neurokinin A in the piglet*. J Appl Physiol (1985), 1992. **72**(3): p. 1090-5.
439. Fredberg, J.J., et al., *Friction in airway smooth muscle: mechanism, latch, and implications in asthma*. J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(6): p. 2703-12.
440. Fredberg, J.J., et al., *Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma*. J Appl Physiol (1985), 1993. **74**(3): p. 1387-97.
441. Ludwig, M.S., et al., *Lung tissue resistance during contractile stimulation: structural damping decomposition*. J Appl Physiol (1985), 1992. **72**(4): p. 1332-7.
442. Mijailovich, S.M., J.P. Butler, and J.J. Fredberg, *Perturbed equilibria of myosin binding in airway smooth muscle: bond-length distributions, mechanics, and ATP metabolism*. Biophys J, 2000. **79**(5): p. 2667-81.
443. Wang, L., P.D. Pare, and C.Y. Seow, *Effects of length oscillation on the subsequent force development in swine tracheal smooth muscle*. J Appl Physiol, 2000. **88**(6): p. 2246-50.
444. Ansell, T.K., et al., *Bronchodilatory response to deep inspiration in bronchial segments: the effects of stress vs. strain*. J Appl Physiol, 2013. **115**(4): p. 505-13.

445. Mitchell, R.A., D.A. Herbert, and D.G. Baker, *Inspiratory rhythm in airway smooth muscle tone*. Journal of Applied Physiology, 1985. **58**(3): p. 911-920.
446. Jammes, Y. and N. Mei, *Assessment of the pulmonary origin of bronchoconstrictor vagal tone*. The Journal of Physiology, 1979. **291**(1): p. 305-316.
447. Crawford, A.B., M. Makowska, and L.A. Engel, *Effect of bronchomotor tone on static mechanical properties of lung and ventilation distribution*. J Appl Physiol (1985), 1987. **63**(6): p. 2278-85.
448. Widdicombe, J.G. and J.A. Nadel, *Reflex effects of lung inflation on tracheal volume*. J Appl Physiol, 1963. **18**: p. 681-6.
449. Froeb, H.F. and J. Mead, *Relative hysteresis of the dead space and lung in vivo*. J Appl Physiol, 1968. **25**(3): p. 244-8.
450. Woolcock, A.J., C.M. Salome, and K. Yan, *The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(1): p. 71-5.
451. Hospers, J.J., et al., *Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study*. Lancet, 2000. **356**(9238): p. 1313-7.
452. Cockcroft, D.W. and S. Wenzel, *Airway hyperresponsiveness and chronic obstructive pulmonary disease outcomes*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(6): p. 1580-1581.
453. Cook, D.P., et al., *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Sarcoplasmic Reticulum of Airway Smooth Muscle. Implications for Airway Contractility*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **193**(4): p. 417-26.
454. Weinberger, M., *Airways reactivity in patients with CF*. Clin Rev Allergy Immunol, 2002. **23**(1): p. 77-85.
455. Lauzon, A.M. and J.G. Martin, *Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor*. F1000Res, 2016. **5**.
456. Bosse, Y., *Endocrine regulation of airway contractility is overlooked*. J Endocrinol, 2014. **222**(2): p. R61-73.
457. Zhou, J., et al., *Adenosine A1 and prostaglandin e receptor 3 receptors mediate global airway contraction after local epithelial injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **48**(3): p. 299-305.
458. Gallos, G., et al., *Airway epithelium is a predominant source of endogenous airway GABA and contributes to relaxation of airway smooth muscle tone*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **304**(3): p. L191-7.
459. Matera, M.G., et al., *Epithelium integrity is crucial for the relaxant activity of brain natriuretic peptide in human isolated bronchi*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(8): p. 1740-54.
460. Howarth, P.H., et al., *Synthetic responses in airway smooth muscle*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(2 Suppl): p. S32-50.
461. Aravamudan, B., et al., *Mechanisms of BDNF regulation in asthmatic airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(2): p. L270-9.

462. Hichami, A., et al., *Diacylglycerol-containing docosahexaenoic acid in acyl chain modulates airway smooth muscle tone*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(4): p. 378-86.
463. Anaparti, V., et al., *NMDA receptors mediate contractile responses in human airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(12): p. L1253-64.
464. Saxena, H., et al., *The GPCR OGR1 (GPR68) mediates diverse signalling and contraction of airway smooth muscle in response to small reductions in extracellular pH*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(3): p. 981-90.
465. Faiz, A., et al., *Latrophilin receptors: novel bronchodilator targets in asthma*. Thorax, 2017. **72**(1): p. 74-82.
466. Yarova, P.L., et al., *Calcium-sensing receptor antagonists abrogate airway hyperresponsiveness and inflammation in allergic asthma*. Sci Transl Med, 2015. **7**(284): p. 284ra60.
467. Fitzgerald, R., et al., *H2S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal K(ATP) channel*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **446**(1): p. 393-8.
468. Que, L.G., et al., *Protection from experimental asthma by an endogenous bronchodilator*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1618-21.
469. Stamler, J.S., *S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 414-7.
470. Mizuta, K., et al., *The dopamine D1 receptor is expressed and facilitates relaxation in airway smooth muscle*. Respir Res, 2013. **14**: p. 89.
471. Fodor, G.H., et al., *Dopamine ameliorates bronchoconstriction induced by histaminergic and cholinergic pathways in rabbits*. Respir Physiol Neurobiol, 2019. **259**: p. 156-161.
472. Al-Ayed, M.S.Z., *Relaxant effect of ghrelin on guinea pig isolated tracheal smooth muscle: role of epithelial NO and PGE2*. Pflugers Arch, 2018. **470**(6): p. 949-958.
473. Wu, T., et al., *Identification of BPIFA1/SPLUNC1 as an epithelium-derived smooth muscle relaxing factor*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14118.
474. Chu, H.W., et al., *Function and regulation of SPLUNC1 protein in Mycoplasma infection and allergic inflammation*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3995-4002.
475. Yim, P.D., et al., *Novel expression of a functional glycine receptor chloride channel that attenuates contraction in airway smooth muscle*. FASEB J, 2011. **25**(5): p. 1706-17.
476. Bozkurt, T.E., O. Larsson, and M. Adner, *Stimulation of cannabinoid CB1 receptors prevents nerve-mediated airway hyperreactivity in NGF-induced inflammation in mouse airways*. Eur J Pharmacol, 2016. **776**: p. 132-8.
477. Yousif, M.H. and M.A. Oriowo, *Inhibitory effects of cannabinoid receptor ligands on electrically-evoked responses in rat isolated tracheal ring segments*. Pharmacol Res, 1999. **40**(5): p. 415-21.
478. Makwana, R., et al., *The effect of phytocannabinoids on airway hyper-responsiveness, airway inflammation, and cough*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **353**(1): p. 169-80.

479. Nieri, P., et al., *R⁺-methanandamide inhibits tracheal response to endogenously released acetylcholine via capsaizepine-sensitive receptors*. Eur J Pharmacol, 2003. **459**(1): p. 75-81.
480. Nieri, P., et al., *Effects of cannabinoids on non-adrenergic non-cholinergic-mediated relaxation in guinea-pig trachea*. Eur J Pharmacol, 2003. **475**(1-3): p. 115-8.
481. Grassin-Delyle, S., et al., *Cannabinoids inhibit cholinergic contraction in human airways through prejunctional CB1 receptors*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(11): p. 2767-77.
482. Drake, M.G., et al., *Toll-like receptor 7 rapidly relaxes human airways*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(6): p. 664-72.
483. Gallos, G., et al., *Targeting the restricted alpha-subunit repertoire of airway smooth muscle GABAA receptors augments airway smooth muscle relaxation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **302**(2): p. L248-56.
484. Yocum, G.T., et al., *Targeting the gamma-Aminobutyric Acid A Receptor alpha4 Subunit in Airway Smooth Muscle to Alleviate Bronchoconstriction*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016. **54**(4): p. 546-53.
485. Gallos, G., et al., *Selective targeting of the alpha5-subunit of GABAA receptors relaxes airway smooth muscle and inhibits cellular calcium handling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(9): p. L931-42.
486. Senouvo, F.Y., et al., *Improved bioavailability of epoxyeicosatrienoic acids reduces TP-receptor agonist-induced tension in human bronchi*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(5): p. L675-82.
487. Morin, C., et al., *17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets PPARgamma and p38 mitogen-activated protein kinase to mediate its anti-inflammatory effects in the lung: role of soluble epoxide hydrolase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **43**(5): p. 564-75.
488. Khaddaj-Mallat, R. and E. Rousseau, *MAG-EPA and 17,18-EpETE target cytoplasmic signalling pathways to reduce short-term airway hyperresponsiveness*. Pflugers Arch, 2015. **467**(7): p. 1591-1605.
489. Tamaoki, J., et al., *Pertussis toxin-sensitive airway beta-adrenergic dysfunction by somatostatin*. Respir Physiol, 1994. **95**(1): p. 99-108.
490. Gallos, G., et al., *Activation of endogenous GABAA channels on airway smooth muscle potentiates isoproterenol-mediated relaxation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(6): p. L1040-7.
491. Mizuta, K., et al., *The dopamine D(2) receptor is expressed and sensitizes adenylyl cyclase activity in airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **302**(3): p. L316-24.
492. Dimitropoulou, C., et al., *Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large-conductance voltage and calcium-dependent potassium channels*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(3): p. 239-47.
493. Degano, B., et al., *Differential effects of low and high-dose estradiol on airway reactivity in ovariectomized rats*. Respir Physiol Neurobiol, 2003. **138**(2-3): p. 265-74.

494. Arteaga-Solis, E., et al., *Inhibition of leptin regulation of parasympathetic signaling as a cause of extreme body weight-associated asthma*. *Cell Metab*, 2013. **17**(1): p. 35-48.
495. Angus, R.M., et al., *Effect of inhaled atrial natriuretic peptide and a neutral endopeptidase inhibitor on histamine-induced bronchoconstriction*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **151**(6): p. 2003-5.
496. Angus, R.M., et al., *Effect of inhaled thiorphan, a neutral endopeptidase inhibitor, on the bronchodilator response to inhaled atrial natriuretic peptide (ANP)*. *Thorax*, 1996. **51**(1): p. 71-4.
497. Ono, E., et al., *Lipoxin generation is related to soluble epoxide hydrolase activity in severe asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **190**(8): p. 886-97.
498. Morin, C., et al., *EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: putative role of CPI-17*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **38**(2): p. 192-201.
499. Khaddaj-Mallat, R., et al., *MAG-DPA curbs inflammatory biomarkers and pharmacological reactivity in cytokine-triggered hyperresponsive airway models*. *Pharmacol Res Perspect*, 2016. **4**(6): p. e00263.
500. Morin, C., et al., *Docosahexaenoic acid derivative prevents inflammation and hyperreactivity in lung: implication of PKC-Potentiated inhibitory protein for heterotrimeric myosin light chain phosphatase of 17 kD in asthma*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **45**(2): p. 366-75.
501. Khaddaj-Mallat, R., et al., *Pro-Resolving Effects of Resolvin D2 in LTD4 and TNF-alpha Pre-Treated Human Bronchi*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0167058.
502. Khaddaj-Mallat, R., et al., *Reversal of IL-13-induced inflammation and Ca(2+) sensitivity by resolvin and MAG-DHA in association with ASA in human bronchi*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015. **121**(Pt B): p. 145-54.
503. Morin, C., S. Fortin, and E. Rousseau, *Bronchial inflammation induced PKCzeta over-expression: involvement in mechanical properties of airway smooth muscle*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012. **90**(2): p. 261-9.
504. Li, S., et al., *Epithelium-generated neuropeptide Y induces smooth muscle contraction to promote airway hyperresponsiveness*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(5): p. 1978-82.
505. Koopmans, T., et al., *Regulation of actin dynamics by WNT-5A: implications for human airway smooth muscle contraction*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30676.
506. Ding, S., et al., *Inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 enhance airway smooth muscle contraction by increasing L-type Ca(2+) channel expression*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018.
507. Xu, Y.D., et al., *S100A8 protein attenuates airway hyperresponsiveness by suppressing the contraction of airway smooth muscle*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **484**(1): p. 184-188.
508. Mizuta, K., et al., *Novel identification of the free fatty acid receptor FFAR1 that promotes contraction in airway smooth muscle*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. **309**(9): p. L970-82.

509. Wood, L.G., M.L. Garg, and P.G. Gibson, *A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1133-40.
510. Yocum, G.T., et al., *GABAA receptor alpha4-subunit knockout enhances lung inflammation and airway reactivity in a murine asthma model*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **313**(2): p. L406-L415.
511. Huang, F., et al., *Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16354-9.
512. Wang, P., et al., *Inflammatory mediators mediate airway smooth muscle contraction through a G protein-coupled receptor-transmembrane protein 16A-voltage-dependent Ca(2+) channel axis and contribute to bronchial hyperresponsiveness in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(4): p. 1259-1268 e11.
513. Zhang, C.H., et al., *The transmembrane protein 16A Ca(2+)-activated Cl- channel in airway smooth muscle contributes to airway hyperresponsiveness*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(4): p. 374-81.
514. Sundaram, A., et al., *Targeting integrin alpha5beta1 ameliorates severe airway hyperresponsiveness in experimental asthma*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 365-374.
515. Sugimoto, K., et al., *The alphavbeta6 integrin modulates airway hyperresponsiveness in mice by regulating intraepithelial mast cells*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 748-58.
516. Duan, Y., et al., *Overexpression of soluble ADAM33 promotes a hypercontractile phenotype of the airway smooth muscle cell in rat*. Exp Cell Res, 2016. **349**(1): p. 109-118.
517. Shigemura, M., et al., *Hypercapnia increases airway smooth muscle contractility via caspase-7-mediated miR-133a-RhoA signaling*. Sci Transl Med, 2018. **10**(457).
518. Ghosh, A., et al., *Soluble guanylate cyclase as an alternative target for bronchodilator therapy in asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(17): p. E2355-62.

Annexes

The underlying physiological mechanisms whereby anti cholinergics alleviate asthma

Morgan Gazzola*, Samuel Mailhot-Larouche*, Clémentine Beucher, Ynuk Bossé

Quebec Heart and Lung Institute, affiliated to *Université Laval*, Quebec, Quebec, Canada

*These authors have contributed equally to this work.

Morgan Gazzola is supported by a bursary from the Respiratory Health Network of the FRQS (*Fonds de Recherche du Québec – Santé*), Samuel Mailhot-Larouche is supported by a bursary from the Canadian Institutes of Health Research and Ynuk Bossé is a research scholar from FRQS.

Abstract (197 words)

The mechanisms whereby anti-cholinergics improve asthma outcomes, such as lung function, symptoms and rate of exacerbation, can be numerous. The most obvious is by affecting the contraction of airway smooth muscle (ASM). The acetylcholine released from the cholinergic nerves is the most important bronchoconstrictor that sets the baseline degree of contractile activation of ASM in healthy individuals. Although the degree of ASM's contractile activation can also be fine-tuned by a plethora of other bronchoconstrictors and bronchodilators in asthma, blocking the ceaseless effect of acetylcholine on ASM by anti-cholinergics reduces, at any given moment, the overall degree of contractile activation. Since the relationships that exist between the degree of contractile activation, ASM force, ASM shortening, airway narrowing, airflow resistance and respiratory resistance are not linear, small decreases in the contractile activation of ASM can be greatly amplified and thus translate into important benefits on patient's well-being. Plus, many inflammatory and remodeling features that are often found in asthmatic lungs synergize with the contractile activation of ASM to increase respiratory resistance. This review recalls that the proven effectiveness of anti-cholinergics in the treatment of asthma could be merely attributed to a small reduction in the contractile activation of ASM.

Key words: Long-acting muscarinic antagonists, airway smooth muscle, airway narrowing, airway hyperresponsiveness, respiratory resistance

Introduction

The symptoms of asthma are either persistent or episodic and generally coincide with perennial or time-varying exposure to environmental factor(s). The diagnosis of asthma is usually straightforward as it is established based on common symptoms such as respiratory distress, cough, wheezing and thoracic oppression. However, the molecular pathogenesis that drives asthma is characterized by inter-individual variability, as well as within-individual complexity and instability [342]. The inter-individual variability mainly stems from the fact that the offending environmental factors in asthma vary greatly between afflicted individuals. In turn, this largely depends on a number of host factors, such as genetic and epigenetic susceptibilities, history of environmental exposures, age, hormones, smoking status and comorbidities. The within-individual instability mainly stems from the fact that the severity of asthma at any given moment is determined by the total number of triggering and aggravating environmental factors involved, as well as by their respective concentration and sequence of exposure and co-exposure. In turn, this distinct but intricate and ever-changing offending environmental exposure elicits symptoms of varying sort and varying intensity by regulating several endogenous inflammatory molecules. Again, the assortment of endogenous inflammatory molecules involved is different between patients and depends on host factors and the pattern of exposure to environmental factor(s).

Given that the molecular pathogenesis of asthma is variable between patients, as well as complex and unstable in each patient, it may not be surprising that targeting a single molecular defect at a given point in time benefits only slightly, and only a few [32]. Indeed, many attempts were made with new drugs to block individually the endogenous molecules that are thought to be transiently or persistently dysregulated in asthma. The outcomes of these trials thus far are trivial, even when the patients were enrolled based on well-defined clinical, phenotypical and endotypical characteristics [32]. Based on recent large clinical trials, the only exceptions to this rule seem to be the anti-cholinergics. Indeed, the anti-cholinergics provide significant improvements in symptoms and lung function in broad populations of asthmatic individuals [343].

Although vagal activity has always been thought to be more important in chronic obstructive pulmonary disease than in asthma, the anti-cholinergics are increasingly used to treat asthma today. The most successful in asthma are the ones that antagonize the function of the muscarinic receptors for an extended period of time. They are generally active throughout the day and are thus prescribed in a once-daily dosing regimen. They are commonly called the long-acting muscarinic antagonists (LAMAs). A list of LAMAs, along with other drugs that are currently approved in Canada to treat asthma, is presented in Table 1.

The LAMAs listed in Table 1 are all approved to treat chronic obstructive pulmonary disease. However, tiotropium is the only LAMAs that is currently approved in Canada to treat asthma. It was approved in May 2015. Tiotropium is indicated as add-on maintenance bronchodilator treatment in adult patients who remain symptomatic despite the combination of an inhaled corticosteroid and a long-acting β_2 -agonist (LABAs) and who experienced at least one severe exacerbation in the previous year.

The efficacy of LAMAs in asthma was shown to be comparable to the LABAs in recent large clinical trials [344, 345]. The LABAs actively relax ASM and thereby bronchodilate the airways no matter the bronchoconstrictor(s) involved in ASM contraction. It may thus sound surprising that the LAMAs, which can merely block one bronchoconstrictor, namely

acetylcholine, are sometimes as effective as the LABAs. Plus, evidence pointing toward derangements in cholinergic regulation in asthma is scarce, albeit existent and discussed later in this chapter [109, 346-348]. However, it is important to remember that cholinergic input originating from the vagal nerves is omnipresent in human lungs [349]. In fact, an elaborated network of nerves interweaves the ASM bundles [350]. Although a better description of the anatomy and the function of these nerves throughout the airway tree is eagerly needed, physiological studies clearly demonstrated that the release of acetylcholine by the nerve endings constantly contributes to raise the degree of ASM's contractile activation [349]. The non-neuronal cholinergic system may also contribute [351]. The LAMAs are thus expected to reduce, at any given moment, the contractile activation of ASM that is attributed to cholinergic tone. For that very reason, the therapeutic benefits of LAMAs may not be surprising after all. This is because the contractile activation of ASM is at the very base of a chain of events that raises respiratory resistance. This chain of events is described in the first part of this review. Importantly, this chain of events is further amplified by diverse arrays of aberrations seen in asthmatic lungs. This latter topic is specifically covered in the second part of this review. Overall, this review expatiates on the many ways by which a small additive reduction in ASM's contractile activation, such as the one induced by LAMAs, may culminate into significant improvement in patient's well-being.

A chain of events amplifying the effect of ASM's contractile activation

ASM stress

The stress, which is exclusively defined herein as the force per cross-sectional area generated by ASM, depends on the degree of ASM's contractile activation. In turn, the degree of contractile activation depends on the potency, the efficacy and the concentration of the bronchoconstrictor involved. The relationship that exists between the degree of contractile activation and ASM stress is described by a sigmoidal curve (Figure 1.1). This implies that the degree of activation needs to reach a certain threshold in order to instigate the generation of stress. Passed this threshold, further increases in activation then translate into important changes in stress. This is true until the rate of gain in stress per unit increase in activation tapers down to attain a plateau, beyond which point additional increases in contractile activation cause no additional gain in stress. Taken alone, this sigmoidal relationship between the degree of ASM's contractile activation and the stress can explain why small changes in bronchoconstrictor concentration can sometimes exert large changes in stress, while large changes in bronchoconstrictor concentration can sometimes exert no effect at all.

It is important to emphasize that the degree of ASM's contractile activation *in vivo* is not solely determined by the concentration of one bronchoconstrictor. It is rather determined by the collective effect of all the bronchoconstrictors and all the bronchodilators that are acting simultaneously on ASM. Owing to the sigmoidal activation-stress curve described above, an additive effect of two bronchoconstrictors in terms of ASM activation can sometimes be perceived as a synergistic effect in terms of stress generation. For example, the use of two bronchoconstrictors, each at concentration under the threshold required to generate stress when used alone, can have a measurable effect when combined. Similarly, if the concentration of a bronchoconstrictor raises the degree of activation just above the threshold needed to instigate the generation of stress, the subsequent addition of a different

bronchoconstrictor is expected to cause a greater gain in stress simply because it is now acting on a steeper part of the activation-stress curve. For the same reason, blocking the contractile activation of ASM induced by one bronchoconstrictor can also decrease the stress generated by other bronchoconstrictors.

By blocking the bronchoconstricting effect of acetylcholine, the LAMAs move the degree of ASM's contractile activation leftward on the sigmoidal activation-stress curve. Depending on the position on the activation-stress curve at which this overall decrease in ASM activation occurs, and depending on the magnitude of the cholinergic tone, this can substantially decrease ASM stress. As alluded to above, this can also reduce the stress generated by other bronchoconstrictors. In fact, it can eliminate the effect of other bronchoconstrictors completely if the overall degree of ASM's contractile activation is brought sufficiently below the threshold needed to instigate the generation of stress. Importantly, this effect of LAMAs is expected to occur regardless of the molecular defects leading to excessive bronchoconstriction in asthma.

ASM shortening

Once activated to contract, ASM strives to shorten. Shortening is a major contractile property of ASM as it ultimately determines the amount of airway narrowing. The amount of ASM shortening within an airway depends on the total tension (stress per unit of airway length) generated by ASM, which is not only determined by the stress generated by ASM, but also by the orientation of the ASM bundles, the fraction of the total airway length containing ASM bundles and the thickness of the ASM bundles. The amount of ASM shortening is also greatly influenced by the load opposing airway constriction. The load impeding ASM shortening is auxotonic; *i.e.*, it increases non-linearly as the muscle shortens [352]. A typical ASM length-load curve is depicted in Figure 1.2. The load impeding ASM shortening *in vivo* mainly stems from its surrounding structures. It takes into account three components. The first component is the transmural distending pressure afforded by the transpulmonary pressure, which also dictates the initial (pre-constricted) length of ASM at the far right of the length-load curve. The two other components are only manifested during and after ASM shortening. They include: 1- The progressive transfer of the load that is initially carried by the passive components of the airway wall prior to the constriction to the ASM; and 2- the stress required to deform the parenchyma surrounding the airway wall during constriction [352]. More specifically, the load increases approximately hyperbolically upon ASM shortening until it reaches a critical point, where the load stabilizes or even slightly descends with further ASM shortening. Beyond that critical load, ASM shortening can go uninterrupted for a while as the load is relatively constant over a large range of airway narrowing before it rises again. The steep rise at the far left of the length-load curve occurs due to closure, when constriction-induced epithelium apposition completely obstructs the lumen with the mucus and the airway lining fluid. At such point, further ASM shortening would need to compress the material internal to ASM.

The shortening can also be limited by the differing capacity of ASM to generate stress at different lengths. Indeed, the stress-generating capacity of ASM instantaneously diminishes as its operating length decreases [353]. It is also clear that shorter ASM generate less stress for any given bronchoconstrictor concentration [124, 260]. Therefore, shortening can

sometimes be limited because the stress generated at higher lengths suddenly reaches a shortened length that can no longer exert a stress exceeding the load. This occurs even more often in the portion of the length-load curve where the load is stable or slightly descending; simply because of the large length reduction that ASM undergoes once the stress it generates surpasses the critical load.

It is also important to mention that the auxotonic load that impedes ASM shortening is always fluctuating due to breathing maneuvers. The fluctuating load and the consequent strain that ASM undergoes during breathing maneuvers significantly impact the contractile capacity of ASM [354]. The dynamic environment within which ASM operates also implies that other contractile properties than the stress-generating capacity may contribute to set the caliber of the airways. These include shortening velocity, as well as the ability to tolerate and recover from the fluctuating load inflicted by breathing maneuvers. These topics were reviewed elsewhere and will not be described in detail herein [355, 356]. Altogether, the shortening of ASM in response to any given contractile stimulus proceeds until the stress generated by ASM within a range of oscillating lengths equals the dynamic load impeding ASM shortening [357].

Regardless of the magnitude by which breathing maneuvers strain and weaken ASM, the shape of the ASM length-load curve clearly illustrates how a change in ASM stress, which is the load that ASM is acting against, impacts the amount of shortening (Figure 1.2). By decreasing the stress generated by ASM in response to acetylcholine, the LAMAs thus reduce the load that can be overcome by ASM and thus move ASM length rightward on the length-load curve. Depending on the position on the length-load curve at which this overall decline in stress occurs, this can substantially improve airway patency. The major impact occurs when the decline is just enough to bring ASM stress below the critical load.

Airway constriction

The constriction of the airway induced by ASM shortening is amplified for geometrical reasons. The relationship between airway wall perimeter and the cross-sectional area of the airway is not linear. Assuming a cylindrical geometry for the airway, the luminal cross-sectional area changes according to the square of changes in the perimeter of the airway wall (Figure 1.3). Since the ASM bundles are not oriented perfectly perpendicular to the length axis of the airway, the changes of luminal area induced by ASM shortening is slightly less than that. More specifically, the ASM bundles are on average oriented 75 degrees off the length axis of the airway [114, 358]. This number is highly variable though and largely depends on the localization of the airway within the lung. The angle is on average 90 degrees in the trachea and the main bronchi, where the ASM bundles occupy approximately 1/3 and 2/3 of the total airway circumference, respectively. The angle then tends to decrease progressively while moving deeper along the airway tree, where the ASM bundles spiral along the entire circumference of the airway wall. The orientation of the ASM bundles is also different at airway bifurcations, on average 25 degrees off the length axis of the airways [114]. The effect of ASM shortening on airway wall perimeter is thus highly variable, depending on the orientation of the ASM bundles and the proportion of the total airway wall circumference containing ASM bundles. Nevertheless, assuming an average orientation of 75 degrees in an airway in which the ASM bundles are present along the entire circumference, the changes in wall perimeter amount to 96.6% the changes in ASM length. The average in luminal area thus changes according to the square of 0.966 times the changes in ASM length. This also assumes that the orientation of the ASM bundles remains constant during shortening.

The exponential relationship that exists between ASM shortening and the cross-sectional area of the airway also indicates that a given percentage of ASM lengthening translates into a larger percentage of airway dilation. By reducing ASM shortening caused by acetylcholine, LAMAs can thus exponentially decrease airway constriction. In absolute terms, the major impact of this geometrical effect occurs when the cross-sectional area of the airway is small; *viz.*, when ASM lengthening occurs in either a small sized airway or a very constricted airway.

Resistance to airflow in a single airway

The resistance to airflow within an airway, hereafter called airflow resistance (R), is calculated by measuring the pressure drop between two points (ΔP) within an airway and by then dividing by airflow (V) ($R = \Delta P/V$). Airflow resistance is not simply proportional to the cross-sectional area of the lumen. Assuming a laminar flow and a luminal volume with a cylindrical geometry, Poiseuille's equation predicts that the change in pressure between two points within an airway is proportional to the length of the airway (l) and the viscosity of the fluid (μ) and inversely proportional to the radius (r) at the fourth power ($\Delta P = 8l\mu/\pi r^4$). Airflow resistance during a laminar flow can thus be estimated by $R = 8l\mu V/\pi r^4$. Because radius at the denominator is raised to the fourth power, airflow resistance increases dramatically during luminal narrowing. In fact, halving the radius increases airflow resistance by 16-fold. When related to the cross-sectional area of the airway lumen, airflow resistance changes inversely according to the square of changes in luminal area (Figure 1.4).

As ventilation increases, the propensity for flow to transit from a laminar to a turbulent flow increases. In fact, this transition occurs when the Reynolds number is between 2000 and 3000. The Reynolds number is dimensionless and calculated as follows: gas density x gas velocity x airway diameter/gas viscosity. During turbulent flow, airflow resistance becomes more dependent on flow and affected by air density (ρ) rather than viscosity ($R_{aw} = 8l\rho V^2/\pi r^4$). Any structural deviation from a perfectly cylindrical geometry of the airway lumen, as well as the many bifurcations within the tracheobronchial tree, also increase the propensity of turbulence in flow. Nevertheless, the inverse relationship that exists between airflow resistance and the radius to the fourth power remains. This suggests that, regardless of the flow regime, small decreases in airway luminal radius always translate into disproportionately larger increases in airflow resistance.

The exponential change in airflow resistance induced by constriction of the airway lumen also indicates that a given percentage of airway dilation translates into a larger percentage decrease in airflow resistance. By reducing airway constriction caused by acetylcholine, LAMAs can thus exponentially decrease airway resistance. Once again, the impact of this effect is greater in airways with a smaller cross-sectional luminal area, although it only applies to convective airways (*i.e.*, airways within which air is transported by convection).

Respiratory resistance

Respiratory resistance refers to the resistance of the entire respiratory system, including the resistance required to displace the chest wall and the lung tissue, as well as the resistance to accommodate airflow within the entire tracheobronchial tree. Because of the geometrical considerations mentioned above, mere heterogeneity in airway patency for any given

average in airway caliber increases the resistance to airflow within the tracheobronchial tree [359]. This is because the increase in resistance caused by narrowing of some airways is not compensated by the decrease in resistance caused by dilation of other airways. Obviously, this is only true when the flow is not redistributed into the more patent airways.

Yet, compelling empirical data demonstrated that airway caliber heterogeneity, at baseline or induced by bronchoconstriction, is associated with increased respiratory resistance [360-362] (Figure 1.5). This is now attributed to closure or near closure of peripheral airways [281, 363] and the consequent appearance of sizable ventilation defects [278, 364, 365]. A mathematical model, which takes into account flow redistribution towards the more patent airways, has also provided a tentative explanation for the mechanisms underlying this phenomenon [278]. According to this model, initial heterogeneity between two daughter airways can suddenly foster a dichotomic response to a rising degree of ASM activation, where one daughter airway constricts excessively while the other dilates. This is because airflow is redistributed into the more conductant daughter airway, which raises the insufflation pressure in the regional lung subtended by this airway and thereby increases the load impeding ASM shortening. Contrastingly, diminution of flow in the other daughter airway causes regional lung deflation and a consequent decline in parenchymal tethering recoil. The load impeding ASM shortening in this latter thus decreases, which fosters more narrowing for any degree of ASM's contractile activation. Because of the interdependence of airways in series, all the smaller airways downstream of both the excessively closed daughter airway and the paradoxically dilated daughter airway are also affected. In fact, the size of the ventilation defects depends on the first airway generation afflicted by this dichotomic response. Overall, the model demonstrates how a degree of heterogeneity at baseline can trigger a self-perpetuating feedback loop of flow redistribution that renders downstream pathways unstable because of changes in parenchymal elastic recoil. This ultimately leads to cluster of peripheral airway constriction, the emergence of sizable ventilation defects and a consequent increase in respiratory resistance. In support to the results of this model, the degree of ventilation heterogeneity correlates with the increased respiratory resistance elicited by challenging the lung with inhaled methacholine [84, 280].

The heterogeneity of airway caliber at baseline and provoked by bronchoconstriction are examples showing that the behavior of the whole system is not merely the sum of its parts. Indeed, closure or near closure of a few airways markedly increases the resistance of the respiratory system. By reducing the overall constriction of the airways caused by acetylcholine and thereby the propensity for airway closure, LAMAs can thus decrease respiratory resistance substantially.

To reiterate, this part of the review describes how: 1- a small decrease in ASM's contractile activation can greatly reduce stress; 2- a small decrease in stress can greatly reduce ASM shortening; 3- a small decrease in shortening can greatly reduce airway constriction; 4- a small decrease in airway luminal constriction can greatly reduce resistance to airflow; and 5- a small decrease in closure of a few airways throughout the lung can greatly reduce respiratory resistance. At the very base of this chain of events is the degree of contractile activation of ASM. Thus, the net impact of a small decrease in the overall degree of contractile activation caused by a LAMA should not be underestimated.

Additional amplifying factors in asthma

The chain of events described above is effective with or without asthma. However, many steps within this chain of events can be further amplified in the presence of lung aberrations that are commonly found in asthma. This topic was previously reviewed in detail and is only briefly examined herein [366].

At the level of ASM activation, many bronchoconstrictors are dysregulated in asthma, such as histamine [367], leukotrienes [368], endothelin-1 [369], prostaglandin D₂ [370], thromboxane A₂ [371], adenosine [372], bradykinin [373], anaphylatoxin C3a and C5a [374], substance P [375], sphingosine-1-phosphate [376] and platelet-activating factor [377]. As explained above, some bronchoconstrictors act additively on ASM's contractile activation and may thus be perceived as synergistic in terms of stress generation. This occurs especially when the concentrations of bronchoconstrictors used are low. Indeed, many of the previously documented examples of synergism between two bronchoconstrictors in studies conducted either *in vivo* [378-382] or *in vitro* [383-386] were involving low concentrations of bronchoconstrictors. Concordantly, some of the reported combinations of bronchoconstrictors were not synergistic at higher concentrations [378, 383, 384]. However, other interactions between bronchoconstrictors, including bronchoconstrictors acting through muscarinic receptors, truly act synergistically at the level of ASM's contractile activation [385-389]. In these synergisms, the degree of contractile activation that is achieved by stimulating ASM with two bronchoconstrictors is beyond the one predicted by the additive effect of each of them. The convergence of diverse intracellular pathways, which transduce the contractile signal downstream from each of the two distinct G protein-coupled receptors that are being activated by the combined bronchoconstrictors, seems to be at the heart of these synergisms. By blocking the cholinergic tone, LAMAs are thus expected to abrogate the synergistic enhancement of ASM's contractile activation caused by the co-activation of the muscarinic receptors with some of the other bronchoconstrictor receptors.

Still at the level of ASM activation, other environmental triggers and endogenous inflammatory molecules act through the nerves, causing a bronchoconstrictive reflex and/or an increased efficiency of cholinergic neurotransmission [42, 390-393]. Either way, the result is a net increase in the release of acetylcholine. Many cells or mediators in asthma also decrease neuronal acetylcholine reuptake by altering the function of the M₂ receptor [346, 347, 394]. Some observations also suggested that acetylcholine half-life is increased in asthma because of a decreased expression of acetylcholinesterase [348]. All of which may contribute to the elevated cholinergic tone observed in asthma [109] and should be directly inhibited by LAMAs.

At the level of ASM stress, many molecular inflammatory mediators increase the stress-generating capacity of ASM. This rather quick lability of ASM's contractile capacity was recently described in detail [112]. The potentiating effect of all these mediators on the stress generated in response to acetylcholine is expected to be blocked by LAMAs. Interestingly, ASM tone (*i.e.*, the sustained contraction of ASM with bronchoconstrictors) itself can also increase the contractile capacity of ASM through a phenomenon dubbed 'force adaptation' [294]. Therefore, beyond blocking directly the constriction induced by acetylcholine, LAMAs should also prevent the gain in ASM's contractile capacity induced by cholinergic tone. Similarly, LAMAs should also block the gain in ASM stress acquired through a process dubbed 'length adaptation', at least when length adaptation arises following ASM shortening induced by acetylcholine [274].

At the level of ASM shortening, many alterations in asthmatic lung may affect the force of interdependence between the airway wall and the parenchyma [395]. A reduced force of interdependence decreases the load impeding ASM shortening and thereby triggers more airway narrowing for the same amount of ASM stress. Loss of lung recoil [396], physical decoupling caused by breakages of the parenchymal attachments on the abluminal side of the airway wall [397] and geometrical decoupling caused by thickening of the adventitia [398], are aberrations sometimes found in asthma that reduce the force of interdependence and should thus accentuate ASM shortening. Other aberrations in the mechanical properties of the airway wall can also modify the load impeding ASM shortening and thereby affect the degree of ASM shortening caused by any given degree of cholinergic activation [399]. Inflammation within the lumen, as well as altered mucus content and composition, can also alter the surfactant and thereby increase surface tension. In turn, this enhances shortening because the surface tension conspires with ASM to overcome the load [400]. The amplifying effects of all these aberrations on acetylcholine-induced ASM shortening are expected to be blocked by LAMAs.

At the level of airway constriction, thickening of the airway wall enhances luminal narrowing induced by ASM shortening. This occurs purely because of geometrical reasons. The space occupied by air (*i.e.*, the lumen) is easier to compress than the space occupied by the rest of the materials enclosed by ASM. Therefore, the changes in the luminal space during ASM shortening are exaggerated when a greater fraction of the total space internal to ASM is occupied by less compressible materials (*i.e.*, the space containing everything but air). All the layers that constitute the airway wall are thicker in asthma, including the epithelium, the basal lamina, the lamina propria and the ASM itself [401]. This geometrical effect is thus likely to contribute to airway hyperresponsiveness in asthma [402]. Various materials inside the airway lumen, such as mucus, inflammatory cells, plasma exudates, desquamated epithelial cells and creola bodies exert the same detrimental effect; *i.e.*, increase constriction of the airway lumen for any given degree of ASM shortening [403, 404]. Altogether, many inflammatory and remodeling features can aggravate the obstruction of the airway lumen elicited by ASM shortening. At the level of airway resistance to airflow, these effects are further potentiated because, as explained above, the changes in airflow resistance are inversely related to the square of changes in the cross-sectional area of the airway lumen. All of these potentiating effects are expected to be blocked by LAMAs when airway luminal narrowing and the subsequent increased resistance to airflow are elicited by acetylcholine-induced ASM shortening.

At the level of respiratory resistance, the patchy nature of the ventilation defects observed in asthma implies that an important degree of spatial heterogeneity exists [278, 363-365]. Indeed, asthma is characterized by focal zones showing a wide spectrum of disease severity, encompassing zones of very sick bronchi to zones of virtually normal bronchi [405]. This heterogeneity can stem from a diversity of factors, such as focal variations in the degree of inflammation, ASM's contractile activation, ASM stress, ASM shortening, structural remodeling, edema and/or mucus. Beyond the effect of each of these factors on the luminal narrowing of individual airways, the heterogeneity that they collectively provoke is, by itself, a major determinant of increased respiratory resistance and lung dysfunction in asthma. The materials inside the lumen of asthmatic airways is particularly alarming as they seriously augment the propensity of plugging and thus the risk of complete airway closure [404]. Any

means by which the cholinergic activation of ASM aggravates heterogeneity might be relevant to the demonstrated benefits of LAMAs in asthma.

To reiterate, this part of the review describes how diverse arrays of aberrations in asthma serially interact with an amplifying chain of events to adversely potentiate the effect of abnormal (or perhaps normal [406]) contractile activation of ASM on respiratory resistance. This further reinforces the aforementioned notion stating that the net impact of a small decrease in the overall degree of ASM's contractile activation caused by a LAMA should not be underestimated.

Conclusion

This review recalls that the proven effectiveness of anti-cholinergics in the treatment of asthma could be merely attributed to a small reduction in the contractile activation of ASM. The molecular signature of asthma pathogenesis is highly variable between patients and is constantly changing and complex within every patient. Treating a group of asthmatic individuals with a drug that specifically targets one inflammation-derived molecule at a given point in time is not tenable [32]. This is because a single molecular defect that is accountable for a significant part of symptoms in all, or a sub-group of, asthmatic patients may simply not exist. In contradistinction, the cholinergic tone is omnipresent, even in individual devoid of respiratory disorders [349]. This implies that, although it is the concerted action of all the bronchoconstrictors and bronchodilators in asthma that dictates the contractile degree of ASM's activation, the binding of acetylcholine on the muscarinic receptors always contributes to raise this degree of contractile activation. Anti-cholinergics, such as the LAMAs, are thus expected to decrease the overall contractile activation of ASM irrespective of their timing of administration and irrespective of the disparities in the molecular defects leading to asthma between patients. This may concurrently explain why a broad population of asthmatic individuals benefits from LABAs [343].

We have seen that the effect of small changes at the level of ASM's contractile activation should not be underestimated. The non-linear relationship that exists between the degree of contractile activation and ASM stress implies that small changes in the contractile activation can greatly affect the stress generated by ASM. Plus, the stress is non-linearly related to ASM shortening and the changes in both airway constriction and resistance to airflow are greatly amplified during ASM shortening due to geometrical reasons. Moreover, other mechanisms not necessarily apparent in individual airways are operational at higher biological scales and can exaggerate the responses of the respiratory system to changes in the contractile activation of ASM. Finally, many aberrations found in asthma further potentiate the gain in respiratory resistance induced by the contractile activation of ASM by acting at one or several levels within this amplifying chain of events.

It is also important to underline that a decrease in ASM's contractile activation can only be favorable in asthma, irrespective of the degree of contractile activation at which it arises. Further relaxation is even beneficial on ASM that is already at a degree of contractile activation below the threshold needed to instigate stress, as this elevates the bronchoconstrictor burden that is required on a subsequent asthma attack to elicit a response. The degree of ASM's contractile activation is also likely to be variable between airways within the same individual. Therefore, supplemental relaxation may exert very little effect in some airways but may be dilating other airways substantially. In fact, it is more likely that only the more affected airways may benefit from additional relaxation conferred by

LAMAs. Yet, the importance of relieving a few airways should not be lowballed, as this simultaneously re-establishes homogeneity in airway patency and thereby decreases respiratory resistance substantially.

Of course, the benefits of LAMAs in asthma may be ascribed to alternative mechanisms. Notwithstanding these other possibilities, we surmise that merely moving the contractile activation of ASM leftward on the activation-stress curve by blocking the cholinergic tone, alone or in combination with a supplemental leftward displacement by a LABA, may account for a major part of the reported benefits of LAMAs in asthma.

Table 1 – Asthma medication

Type of drugs	Class of drugs	Generic name	Dosing regimen [#]
Bronchodilators	SABAs	albuterol	100 or 200 µg, inhaled, prn
		terbutaline	0.5 mg, inhaled, prn
	LAMAs	aclidinium [†]	400 µg, inhaled, bid
		glycopyrronium [†]	50 µg, inhaled qd
		tiotropium	18 µg, inhaled, qd
	umeclidinium [†]	62.5µg, inhaled, qd	
Anti-inflammatory	Inhaled corticosteroids	beclomethasone	variable dose (≤250 to >500 µg/day), inhaled, bid
		budesonide	variable dose (≤400 to >800 µg/day), inhaled, bid
		ciclesonide	variable dose (≤200 to >400 µg/day), inhaled, bid
		fluticasone	variable dose (100 to >500 µg/day), inhaled, bid
		mometasone	variable dose (≤200 to >800 µg/day), inhaled, bid
	Oral corticosteroids	prednisone	Variable dose (5 to 60 mg), PO, qd
Anti-leukotrienes	LTRAs	montelukast	10 mg, PO, qd
Combination therapies	Inhaled corticosteroids + LABAs	budesonide + formoterol	variable doses (200/12 to 800/24 µg), inhaled, bid
		fluticasone + salmeterol	variable doses (200/100 to 1000/100 µg), inhaled, bid
		mometasone + formoterol	variable doses (400/20 or 800/20 µg), inhaled, bid
		fluticasone + vilanterol	variable doses (100/25 or 200/25 µg), inhaled, qd
Biologics	Anti-IgE	omalizumab	150 to 375 mg SC every 2 or 4 weeks*
	Anti-IL-5	mepolizumab	100 mg SC every 4 weeks
		reslizumab	3 mg/kg IV every 4 weeks

Abbreviations: IgE, immunoglobulin E; IL-5, interleukin-5; IV, intravenous; LAMAs, long-acting β₂-agonists; LTRAs, leukotriene-receptor antagonists; SABAs, short-acting β₂-agonists; SAMAs, short-acting muscarinic antagonists; SC, subcutaneous

[#]Dosing regimens are for adults. [†]Not approved for asthma. *The dose depends on body weight and the serum concentration of total IgE.

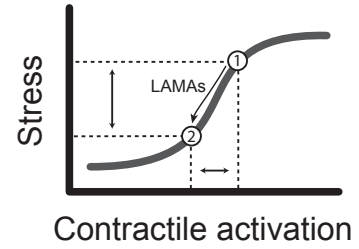
Contractile Activation



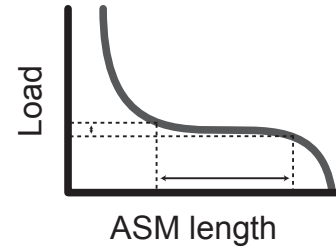
Sequential Amplifying Effects



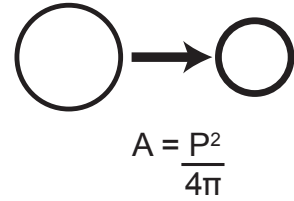
1. ASM Stress



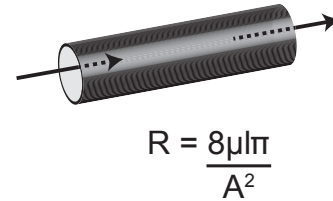
2. Load as a Function of ASM Shortening



3. Airway Constriction



4. Airflow Resistance



5. Respiratory Resistance (Heterogeneity)

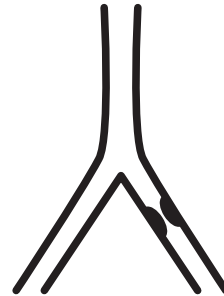


Figure 1 legend. Sequential amplifying mechanisms whereby small changes in the contractile activation of airway smooth muscle (ASM) can translate into large changes in patient's well-being. **1.** The stress generated by the contractile activation of ASM can be amplified depending of the position on the activation-stress curve at which it occurs. The dashed lines illustrate how a small change in bronchoconstrictor concentration translates into a large increase in stress when it occurs on a steep portion of the activation-stress curve. By reducing the degree of ASM activation by a small extent, for example from the position labeled 1 on the curve to the position labeled 2, the LAMAs can dramatically change the amount of stress generated by ASM. **2.** The amount of ASM shortening elicited by ASM stress can be amplified depending of the position on the ASM length-load curve at which it occurs. The dashed lines illustrate how a small increase in ASM stress that surpasses a critical load translates into a substantial amount of ASM shortening. **3.** The constriction of the airway is amplified by ASM shortening due to geometrical reasons. This is because the cross-sectional area of the airway changes according to the square of changes in the perimeter of the airway wall (\sim ASM length). **4.** The resistance to airflow is also amplified during luminal narrowing. This is because the resistance to airflow is inversely related to the cross-sectional area of the airway lumen at the second power. **5.** Finally, respiratory resistance can be amplified depending on the pattern of constriction throughout the airway tree. In particular, an heterogeneous pattern of constriction increases respiratory resistance by distributing airflow into the more patent airways and thereby fostering ventilation defects by decreasing parenchymal tethering in the parts of the lung subtended by very constricted airways. Abbreviations: A, area; l, length; P, perimeter; R, airway resistance to airflow; μ , fluid viscosity.

Smooth muscle in human bronchi is disposed to resist airway distension

Morgan Gazzola¹, Cyndi Henry¹, Christian Couture¹, David Marsolais¹, Gregory G King^{2,3,4}, Jeffrey J Fredberg⁵, Ynuk Bossé¹

¹Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ), Université Laval, Québec, Canada; ²Woolcock Institute of Medical Research, ³University of Sydney, ⁴CRC for Asthma, Sydney, Australia; ⁵Department of Environmental Health, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, United States

Running title: Smooth muscle resists airway dilation during inspiration

Word count: 3782

Abstract

Studying airway smooth muscle (ASM) in conditions that emulate the *in vivo* environment within which the bronchi normally operate may provide important clues regarding the elusive physiological function of ASM. The present study examines the effect of lengthening and shortening of ASM on tension development in human bronchial segments. ASM from each bronchial segment was set at a length approximating *in situ* length ($L_{in\ situ}$). Bronchial tension was then measured during a slow cyclical strain (0.004 Hz, from 0.7 $L_{in\ situ}$ to 1.3 $L_{in\ situ}$) in the relaxed state and at graded levels of activation by methacholine. In all cases, tension was greater at longer ASM lengths, and greater during lengthening than shortening. The threshold of methacholine concentration that was required for ASM to account for bronchial tension across the entire range of ASM lengths tested was on average smaller by 2.8 logs during lengthening than during shortening. The length-dependency of ASM tension, together with this lower threshold of methacholine concentration during lengthening *versus* shortening, suggest that ASM has a greater ability to resist airway dilation during lung inflation than to narrow the airways during lung deflation. More than serving to narrow the airway, as has long been thought, these data suggest that the main function of ASM contraction be to limit airway wall distension during lung inflation.

Keywords: Human bronchi, oscillatory mechanics, intrinsic tone, contractile capacity, hysteresis

Introduction

Airway smooth muscle (ASM) is a structure found along the airway tree from the trachea down to the respiratory bronchioles. Because ASM cells and bundles are oriented nearly circumferentially around the airways [114], and because ASM shortens when activated, ASM seems well disposed to narrow the airway. Many putative roles have been assigned to bronchoconstriction induced by ASM [122, 407, 408]. However, none have reached unanimity.

To better understand the potential function of ASM, one may need to consider that it normally operates in a dynamic environment. Indeed, lung volume excursions that are required for breathing impose oscillatory stress on the airway wall and the ASM embedded within it [409, 410]. Studies emerging from work on the oscillatory mechanics of ASM have demonstrated that tidal straining of ASM decreases its contractile capacity markedly, thus acting like a bronchodilator [354, 411]. These findings heralded a new era in the field of ASM mechanics wherein interest turned toward the understanding of the bronchodilator effect of breathing. In fact, the ability of oscillating strain to attenuate the contractile capacity of ASM has arguably become a mechanism by which deep inspiration relieve respiratory distress [258, 412]. Emanating from this concept were newly discovered contractile properties of ASM, such as the ability to tolerate or recover from oscillating strain [93], the velocity of shortening [413], the length-dependency [260] and plasticity [414] of ASM force, the re-lengthening induced by imposed force fluctuations [357, 415] and the maintenance of ASM shortening [416]. It was suggested, further, that any impairment in these newly identified contractile properties may ultimately contribute to airway hyperresponsiveness in asthma [355]. Because the physiological function of ASM is uncertain, it remains unclear whether targeting the molecular mechanisms underlying these newly discovered contractile properties would be helpful in respiratory diseases.

In human tissues, the effects of oscillating stress that simulates breathing maneuvers, such as tidal breathing and deep inspiration, have been studied in intact bronchi [417, 418], isolated bronchial and tracheal ASM strips [93, 419, 420], as well as in lung slices [421]. Another study conducted with human bronchi in isometric conditions have demonstrated that, within the physiological range of lengths that ASM undergoes *in vivo*, the length of ASM greatly influences its capacity to generate force [260]. In isolation, each of these studies substantially improved our understanding of ASM on airway mechanics. However, a single study performed with human tissues in which all the elements that affect ASM's contractile capacity are considered together has never been conducted. Herein, human bronchial segments were studied at different levels of ASM activation, which spans across a fully relaxed to a maximally activated ASM, during imposed strain that spreads across the entire range of lengths that ASM susceptibly undergoes *in vivo*. Herein, we hypothesized that smooth muscle is better disposed to limit airway dilation during simulated lung inflation than to narrow the airway lumen during simulated lung deflation.

Methods

Human bronchial segments

Bronchial segments were isolated from lung specimens derived from patients undergoing lobectomy or segmentectomy for tumor removal. Consent was obtained and the use of human lung tissue was approved by the ethics committee of the IUCPQ (*Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec*). In the days prior to surgery, spirometry was

obtained (Table 1). The onsite tissue bank of the Respiratory Health Network of the FRQS (www.tissuebank.ca) was in charge of supplying resected lung specimens of gross healthy appearance (*i.e.*, away from tumors) the day of the surgery. From each lung specimen, bronchial segment with a mean length of 5.6 ± 0.2 mm were isolated.

Experimental setting

The airways studied are too small (average internal luminal diameter of 2.0 ± 0.4 mm) to use a setting where the internal pressure is controlled [422], which would be the ideal setting to simulate physiological loading. The bronchial segment was thus mounted in an organ bath attached to a servo-controlled force-length transducer (300B model of dual-mode lever arm systems from Aurora Scientific Inc.) in between platinum electrodes. A schematic of the setup is shown in Figure 1. More precisely, one side of each of two stainless steel triangles was inserted into the bronchial lumen. The bronchial segment was held in place by applying a distending force (the resting tension) that simulated a transpulmonary pressure at functional residual capacity (FRC) (*i.e.*, 5 cmH₂O) as described before [260]. The length at which ASM freely adjusted to in response to this distending force is called $L_{in\ situ}$ because it is assumed to be the length at which ASM operates *in vivo* when the lung is at FRC. The bronchial segment was then subjected to a period of equilibration, which consisted of repetitive 20-second electrical field stimulations at 5-min intervals until the bronchial segment generated a stable isometric force [260].

Experimental protocol

The ASM was then submitted to length oscillations. During one cycle, the length of ASM fluctuated from 0.7 to 1.3 $L_{in\ situ}$, which represent the extreme limits of the physiological range of lengths that ASM can experience *in vivo* due to both breathing maneuvers [354] and changes in body posture [423]. The rate of length change was set at 30% $L_{in\ situ}/\text{min}$ (the cycling frequency was thus 0.004 Hz).

Length oscillations were initially performed until a steady-state loop was obtained (Figure 2). The intrinsic state of ASM activation was then assessed. This is because intrinsic tone is often observed in excised human bronchi [424-426]. To fully control the magnitude of ASM activation, it was necessary to inhibit (or to confirm the absence of) intrinsic tone. A set of experiments was thus undertaken to assess the origin of intrinsic tone. Different pharmacological agents were added cumulatively into the organ bath during the length oscillations in the following sequence: atropine, indomethacin, montelukast and fexofenadine in order to block the muscarinic receptors, the generation of endogenous prostaglandins, the CysLT₁ receptor of cysteinyl-leukotrienes and the H₁ receptor of histamine, respectively. Cycling proceeded after the addition of each agent until a new steady-state loop was achieved. Atropine and indomethacin had no effect (not shown), suggesting that acetylcholine and endogenous cyclooxygenase products are not involved in the generation of intrinsic tone. However, fexofenadine and more importantly montelukast attenuated bronchial tension, suggesting that intrinsic tone in human bronchi is mediated by histamine and, more importantly, leukotrienes (Figure 3A). In a different set of experiments, the order of montelukast and fexofenadine was swapped. The results were similar. However, in that particular order, fexofenadine had the greatest effect, suggesting that the collective action of both antagonists is required to inhibit intrinsic tone. Isoproterenol at 10^{-5} M was then added to confirm the complete inhibition of ASM activation. As seen in Figure 3A, isoproterenol did not further diminish tension, suggesting that complete inhibition of intrinsic tone was achieved with the combination of H₁ and CysLT₁ antagonists. In another set of experiments, we also confirmed that 10^{-5} M of isoproterenol was sufficient to completely inhibit the intrinsic tone, as a further log increment to 10^{-4} M did not decrease tension further

(Figure 3B). Together, these results ascertained that, in the presence of H₁ and CysLT₁ antagonists, the remaining tension was purely passive.

In all subsequent experiments, isoproterenol was first added at 10⁻⁵ M to assess the presence of intrinsic tone. The time taken to complete 2 loops was generally long enough for isoproterenol to abate intrinsic tone (Figure 3C). Regardless of the presence or the absence of tone, isoproterenol was then washed away. However, when tone was detected, montelukast and fexofenadine were added and maintained in the Krebs solution for the entire duration of the experiments. This procedure was to ensure that the level of ASM activation started at zero and that it was fully controlled during added concentrations of MCh; *viz.*, not confounded by intrinsic tone.

Once the steady-state loop with fully relaxed ASM was achieved, MCh was then added by log increments in a cumulative fashion at 0.7 L_{*in situ*}, and a full back-and-forth excursion to 1.3 L_{*in situ*} at the rate described above was performed at each concentration. Since the interest was on the tonic (sustained) phase of ASM contraction, 3 min was awaited after the addition of each MCh concentration prior the outset of the length cycle [427]. Our aim was to simulate length excursions of physiological magnitude after a given level of ASM activation had been set.

Histology

Following the mechanical measurements, the bronchial segments were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. The block of paraffin was then sliced in 5 µm-thick sections in order to visualize the bronchial segment cross-sectionally. The sections were stained with Masson's Trichrome (Sigma), scanned (NanoZoomer Digital slide scanner) and the components of the bronchial wall were quantified with NDP view software.

Data and Statistical analyses

The recorded force (in mN) was converted to tension (in mN/mm) by dividing the force by the length of the bronchial segment (in mm). The average tension over a cycle was calculated by integrating the tension over time divided by the period according to the following equation:

$$T = \int T(t) dt / P, \text{ where } T \text{ is tension and } P \text{ is the period.}$$

Data shown are means ± SE. For both the lengthening and the shortening, two-way repeated measures ANOVAs were used to assess the effects of MCh concentration, ASM length and their interaction on tension. A two-way repeated measures ANOVA was also used to assess the effect of MCh concentration, and the direction of the length change (lengthening *versus* shortening) and their interaction on the smallest lengths at which every MCh concentrations contributed to bronchial tension. In the presence of MCh, a 2% upward vertical deviation from the steady-state loop obtained in the relaxed state (*i.e.*, in the absence of MCh) was arbitrarily considered as a contribution from MCh-induced ASM activation on total bronchial tension. All statistical analyses were performed using Prism 4 (GraphPad Software, San Diego CA) and $p \leq 0.05$ was deemed significant.

Results

Demographics and lung function of the patients from whom the bronchial segments were derived are given in Table 1. All but one were ex-smokers. Lung function parameters were on average within the normal range.

Three out of 7 bronchial segments demonstrated intrinsic tone and were therefore exposed to montelukast and fexofenadine during the experiments. The length-tension relationships at every MCh concentration during length oscillations are presented in Figure 4. The tension shown in the inset represents the average tension over 1 cycle. As expected, the tension generated was concentration-dependent ($p < 0.0001$).

The length-tension loops also reveal other interesting features, the most prominent being the length-dependency of bronchial tension during both lengthening and shortening ($p < 0.0001$). As can be seen in the absence of MCh (Figure 4), part of this increased tension at longer lengths is purely passive (*i.e.*, independent from ASM activation). This passive part of tension is likely determined predominantly by components of the preparation other than ASM, although passive ASM stiffness may also contribute [428]. The tension afforded exclusively by MCh-induced ASM activation is the total tension minus the passive tension (Figure 5; each coloured loop minus the black loop). Although significant, the tension generated by activating ASM with MCh represents a rather small fraction of the total tension (note scales change between Figure 4 and 5). The contribution of ASM activation in the total bronchial tension is not surprising owing the small amount of ASM relative to other airway wall components within human bronchi (Figure 6 and Table 2). On average, ASM accounted for only $1.4 \pm 0.2\%$ of the total bronchial wall area. We previously demonstrated that increasing MCh concentration by an additional log (at 10^{-3} M) does not further increase human bronchial tension at 0.7, 1.0 or 1.3 $L_{in situ}$ [260], thus suggesting that 10^{-4} M of MCh generates the maximal achievable tone in this preparation.

A second feature common to all the loops (Figure 4) is the greater tension at any given length during lengthening *versus* during shortening. The area between the ascending and descending limb of the loops (*i.e.*, the fatness of the loop) denotes tissue hysteresis. Our results demonstrate that the area contained in the loop increased as the level of ASM activation increased. This was exclusively due to incremental tension with increasing concentrations of MCh. In order to normalize for greater tension, hysteresis was expressed in relation to the maximal theoretical hysteresis (delta tension x delta length), which is then referred to as specific hysteresis [429]. In our experiments, specific hysteresis was almost invariably 13.7% ($SE \pm 0.1\%$) regardless of the level of ASM activation. In fact, specific hysteresis was virtually identical when ASM was fully relaxed (13.8%). This is in accordance to the results obtained with guinea pig tracheal strips over a wide range of conditions [430].

A final feature of the loops in Figure 4 is that the threshold concentration of MCh at any given length varies according to whether ASM is in the process of lengthening or shortening ($p = 0.01$ for the direction of the length change; Figure 8). In order to quantify this effect, we determined the length at which the presence of MCh deviates upward the lengthening and the shortening curves by more than 2% at every MCh concentration. 2% was chosen given that it was the earliest point clearly above the noise in every experiment. A representative example with MCh at 10^{-4} M is illustrated in Figure 7. This was done at every MCh concentration (Figure 8). The mean difference in MCh concentration (in logs) that was necessary for ASM to contribute to bronchial tension between lengthening and shortening was 2.84. To calculate that, we integrated MCh concentration in logs (on the x axis) over the

in situ length (on the y axis) at 0.7 and 1.3 $L_{in situ}$ for both the shortening and the lengthening. We then subtracted one over the other and divided by the length excursion (0.6 $L_{in situ}$). This provides the mean horizontal displacement (2.84 logs) between the 2 regression lines shown in Figure 8.

Discussion

As observed in isometric conditions [260], the force generated by ASM in response to any given concentration of MCh increases as ASM length increases. More surprisingly, the threshold concentration of MCh that was required for ASM to respond was many fold lower during lengthening than during shortening. Together, the results suggest that ASM is well disposed to limit airway dilation during the increasing distending stresses that occur during tidal lung inflation or deep inspirations, and thus acts to defend the airway against phasic changes in caliber during breathing. The fact that albuterol increases airway caliber at any lung volume supports that statement [431]. It remains unclear if this behavior of ASM is protective of airway function, and whether it is altered in asthmatic airways due to increased ASM volume [417] or derangements in ASM's contractile properties [355].

Limitations

The relatively old age of patients from whom the bronchial segments were derived is a limitation. Although ontogenic studies with human tissues are still lacking, the contractile capacity of ASM decreases with age in rabbits [432] and monkeys [433], but increases in sheep [434] and either increases or decreases in guinea pigs [435, 436] and pigs [437, 438]. Clearly, more studies are warranted to determine the effect of age on ASM contractility. The effect of cancer, history of smoking and current medication on the contractile capacity of ASM is also ill-defined, but may have affected our results.

Dynamics of ASM

The oscillatory mechanics of ASM have been well studied. However, no single study has yet performed oscillation that encompassed the entire physiological range of ASM lengths in the presence of different levels of ASM activation that spread across a fully relaxed to a near maximal state. We confirmed a recent study performed in isometric conditions, in which it was demonstrated that within a physiological range of lengths, the tension generated in response to MCh is greater at longer lengths [260]. Indeed, the present results indicate that the length-dependency of MCh-induced tension is also evident in dynamic conditions. In fact, at the shortest length studied (0.7 $L_{in situ}$), MCh had no effect, even at 10^{-4} M. In stark contrast, ASM stretched at 1.3 $L_{in situ}$ exhibited a measurable response to 10^{-9} M.

We also confirmed the results of earlier studies showing that the force generated by ASM at any given length is greater during imposed lengthening *versus* controlled shortening [354, 357, 409-411]. Owing to the slow rate of length change in our study (4 min per loop), this effect is unlikely due to hysteresis caused by the slow kinetics of ASM shortening [409]. The difference between lengthening *versus* shortening is even more impressive when the threshold of MCh concentration at any given length was considered. Figure 8 shows that the threshold of MCh concentration is almost 3 logs smaller when ASM is in the process of lengthening *versus* shortening. This difference is huge, and its physiological corollary is thus expected to be commensurately important.

To ensure that ASM embedded in the bronchial segment was fully inactive, we first tested for intrinsic tone. Our results confirmed earlier studies showing that both histamine and leukotrienes are responsible for the generation of intrinsic tone in human bronchi [425, 426]. As observed here, the activation of ASM was previously shown to increase the absolute hysteresis in a variety of lung preparations [242, 439-441]. However, the peak hysteresis elicited by ASM activation is always momentary, lasting minutes at most depending on the preparation. With longer duration of stimulation, hysteresis usually returns to near pre-stimulation level [439, 440]. Since hysteresis was measured during the tonic phase of contraction in the present study, the level of MCh-induced hysteresis reported may be somewhat underestimated. The fact that specific hysteresis did not change with ASM activation in our study is also in line with previous observations [429].

The very slow rate was chosen in our *in vitro* study in order to capture the isolated effect of ASM activation. In turn, this facilitated the interpretation of our results with regard to the integrated role of ASM in lung physiology. At breathing rates, other structures of the airway wall would have been more likely to contribute (because of their viscous properties). Experiments carried out at breathing rates would then be more relevant to understand the role of the entire bronchial wall in lung physiology than to dissect out the specific role of ASM. It is understood that the behavior of ASM may also have been affected by the rate of cycling. Indeed, the average force over one cycle decreases with increasing frequencies [411, 442]. Hence, the average force over a cycle would have obviously changed if we had used a different frequency. However, the relaxing (bronchodilating) effect of oscillation is not affected by frequency. Wang and coworkers showed that the magnitude and the duration, but not the frequency, affected the decline in force induced by length oscillations [443]. We thus believe that the bronchodilator effect of oscillatory motions as found in the lung was present in our study and, most importantly, it was of the same magnitude between the different levels of ASM activation. Notably, Ansell and coworkers have recently showed that the rate of strain affected the bronchodilator effect of a simulated deep inspiration [444]. However, the latter were measuring the effect of a punctuated stretch instead of a continuous oscillation, which may explain the conflicting findings.

Our results provide further insights into the stress-bearing elements that mechanistically govern the relationship that exists between dissipative and stored energies in respiratory tissues during oscillation. Indeed, according to the structural damping hypothesis [242], the frictional *versus* elastic components of tension in any respiratory tissue are fundamentally coupled at the level of the stress-bearing elements. Over a wide range of conditions, as elastic stresses increase frictional stresses increase nearly in proportion [354, 439, 442]. In our experiments, the fact that specific hysteresis did not change without or with varying levels of ASM activation suggests that this relationship is maintained over the entire range of ASM activation, at least during the tonic phase of contraction. We thus believe that the molecular motors that drive ASM contraction (*i.e.*, myosin cross-bridges) are the stress-bearing elements or act indirectly on the stress-bearing elements without altering their intrinsic properties (*i.e.*, the way they bear the stress or break upon it).

Physiological implications

These results indicate that bronchial ASM tone increases progressively while ASM is being elongated. In turn, this increase in tone works in a direction that counteracts the increasing distending stress that arises from the increasing transpulmonary pressure, and thus would tend to limit airway dilation during inspiration. Perhaps also important in intact airways *in vivo*, as opposed to the excised tissues studied here, is that cholinergic nerves tend to excite ASM during inspiration [445]. Taken together, it seems that the nerves and the ASM might

act mainly to impede airway dilation during inspiration, and only to a lesser degree act to promote airway narrowing during expiration. In addition to limit the stretch of cells constituting the airway wall, another potential benefit of this behavior is to limit expansion of the dead space, and thereby increase the fraction of inspired gas that reaches the respiratory zone of the lung [446, 447]. In contradistinction, reflex bronchodilation induced by lung inflation-triggered activation of slowly adapting pulmonary stretch receptors would act in the opposite direction [448]. Presumably, ASM may limit dilation during tidal volume breathing in order to optimize ventilation, but deep inspiration may still sufficiently stretch the airway wall and thereby trigger neuronal reflexes that foster dilation when required. Our experiments were carried out on isolated bronchial segments devoid of neuronal and humoral influences. The implications of our finding in relation to fully innervated and irrigated bronchi should thus be interpreted with caution.

As has been suggested previously, yet another potential function of activated ASM may be to match the hysteresivity (relative hysteresis) of the small airways and alveolar ducts to that of the surrounding lung parenchyma [242, 408, 449]. To the extent that the hysteresivity of the parenchyma and the small airways are matched, then those structures will expand and deflate in synchrony during breathing. ASM may thus allow the parenchyma and the airways to stay well matched to the lung parenchyma in hysteretic terms.

Conclusions

Studying ASM in experimental conditions that simulate the dynamic *in vivo* environment within which ASM normally operates may offer important insights into its physiological function. Here, we report that, within the physiological range of lengths that ASM undergoes *in vivo* and across the entire range of activation levels, the tension generated by ASM increases as its length increases. In addition, we demonstrated that the threshold of MCh concentration is 3 logs smaller during lengthening *versus* shortening. Collectively, these results suggest that beside its putative capability to narrow the airways, ASM seems better disposed to prevent excessive airway dilation during lung inflationary maneuvers.

Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the *Réseau en Santé Respiratoire du FRQS (Fonds de Recherche Québec – Santé)*.

Patients	Age	Gender	BMI	Cause of surgery	Smoking status	FEV₁ (% predicted)	FVC (% predicted)	FEV₁/FVC (% predicted)
1	50	F	26.8	adenocarcinoma	Former	97	97	68
2	74	M	28.4	sarcomatoid carcinoma	Former	82	82	94
3	48	M	23.6	adenocarcinoma	Former	102	102	91
4	50	M	22.7	adenocarcinoma	Former	91	91	95
5	77	M	33.2	B cell lymphoma	Never	98	98	101
6	58	F	16.9	adenocarcinoma	Former	96	96	93
7	70	F	22.0	adenocarcinoma	Former	84	84	89
Means ± SE	61 ± 4.7		24.8 ± 2.0			82.4 ± 4.3	92.9 ± 2.8	90.3 ± 4.0

Table 1. Demographics and lung function of patients from whom the bronchial segments were derived.

Table 2. Cross-sectional morphology of the bronchial segments studied.

Patient s	Wall area (mm ²)	Lumina l area (mm ²)	Airway smooth muscle			Cartilage		Epithelium			BM perimete r
			Area (mm ²)	% of WA	Perimete r (mm)	Area (mm ²)	% of WA	Area (mm ²)	% of WA	% of BM covere d by epi	
1	16.26	2.38	0.23	1.3 9	7.39	2.07	12.7 0	0.07	0.4 1	44.14	6.28
2	6.98	0.29	0.07	1.0 4	6.27	0.07	0.96	0.13	1.7 9	42.09	6.28
3	20.13	4.24	0.29	1.4 2	13.50	6.66	33.0 6	0.08	0.4 0	24.14	9.42
4	26.74	6.44	0.47	1.7 5	12.30	6.77	25.3 1	0.19	0.7 0	60.12	9.42
5	35.27	4.46	0.33	0.9 4	10.09	5.86	16.6 1	0.14	0.4 1	46.84	9.42
6	8.25	0.42	0.17	2.1 2	7.73	0.50	6.12	0.10	1.2 1	42.29	6.28
7	46.19	8.63	0.45	0.9 8	18.39	14.39	31.1 6	0.01	0.0 2	1.45	21.99
Mean ± SE	22.83 ± 5.41	3.84 ± 1.16	0.29 ± 0.05	1.3 8 ± 0.1 7	10.81 ± 1.61	5.19 ± 1.88	17.9 9 ± 4.67	0.10 ± 0.02	0.7 0 ± 0.2 3	37.30 ± 7.18	9.87 ± 2.10

Abbreviations: BM, basement membrane; epi, epithelium; WA, wall area

Figures

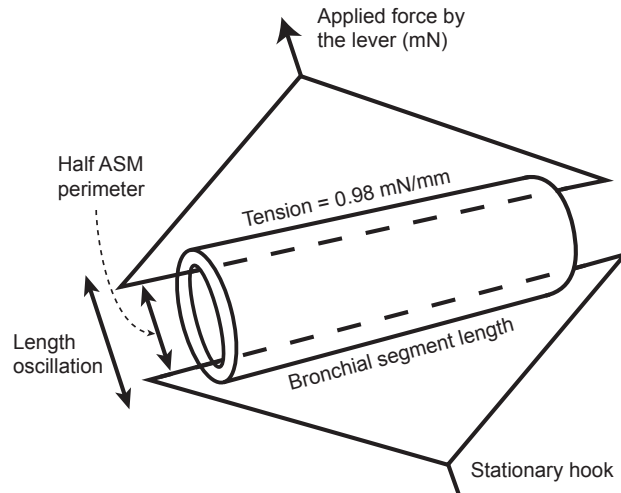


Figure 1. Schematic of the experimental setup used to assess ASM contraction in segments of small bronchi. The distending force applied to the bronchial segment was calculated to simulate a transpulmonary pressure at functional residual capacity (FRC) (*i.e.*, 5 cmH₂O); merely by converting a transmural pressure of 5 cmH₂O into tension based on the radius of the bronchus (tension = pressure x radius). The calculated tension was then multiplied by two. This is because the bronchial segment flattened when exposed to distending stress and the bronchial wall on either side of the stainless-steel triangles' rod has to be exposed to the calculated tension. The tension was then converted to force based on the length of the bronchial segment. In a representative bronchial segment with an internal diameter of 2 mm and bronchial segment length of 5 mm, tension in one side of the bronchial segment = 0.49 KPa x 1 mm. To account for the 2 sides, the total tension was therefore 0.49 mN/mm x 2 sides = 0.98 mN/mm. The force applied by the lever to simulate the calculated tension = 0.98 mN/mm x 5 mm = 4.9 mN. Flattening of the bronchial segment also straightened the ASM. This was convenient to calculate the magnitude of the length oscillation, which was 30% below and above the half-length of ASM perimeter. In the same representative bronchial segment, the half perimeter of ASM is $\pi * \text{diameter} / 2 = 3.14$ mm. The distance excursion between the two stainless-steel triangles that was used to oscillate ASM from 0.7 to 1.3 $L_{in situ}$ was thus 1.88 mm; *i.e.*, from 2.2 to 4.08 mm.

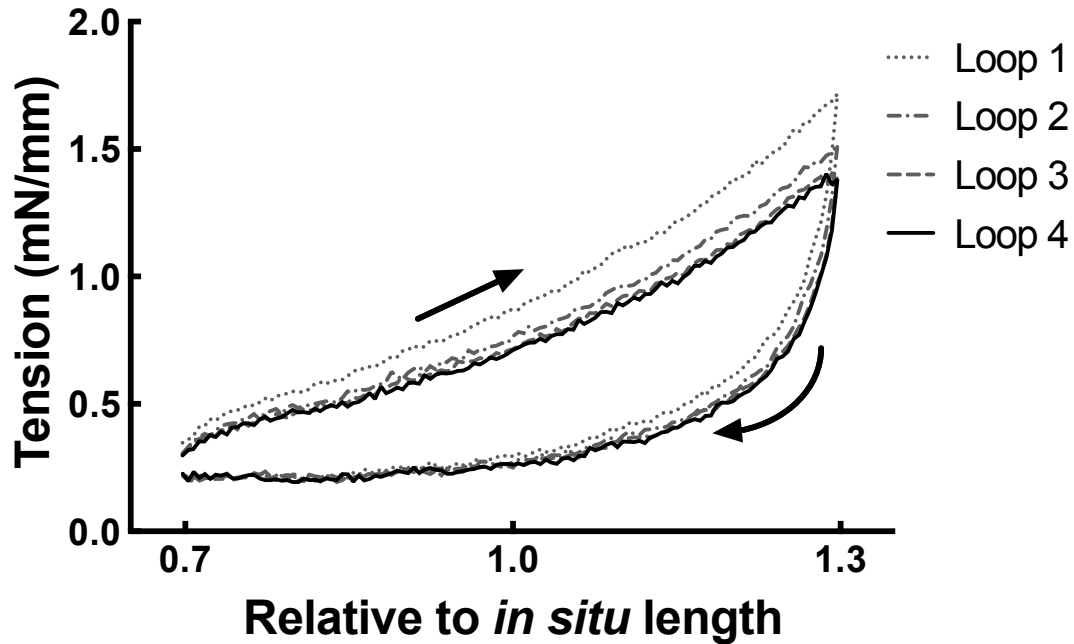


Figure 2. The effect of cyclical strain on bronchial tension-length relationship. The length is normalized to *in situ* length, which is the length ASM freely adjusted to when subjected to a distending force emulating a transpulmonary pressure of 5 cmH₂O; *i.e.*, the approximate transpulmonary pressure at a lung volume around functional residual capacity. Arrows indicate the direction of the imposed length change. The loops are enumerated to follow the sequence in time. The time-dependent decline of tension is readily observed and consistent with the lowering of stiffness by oscillating strain. This is a representative experiment.

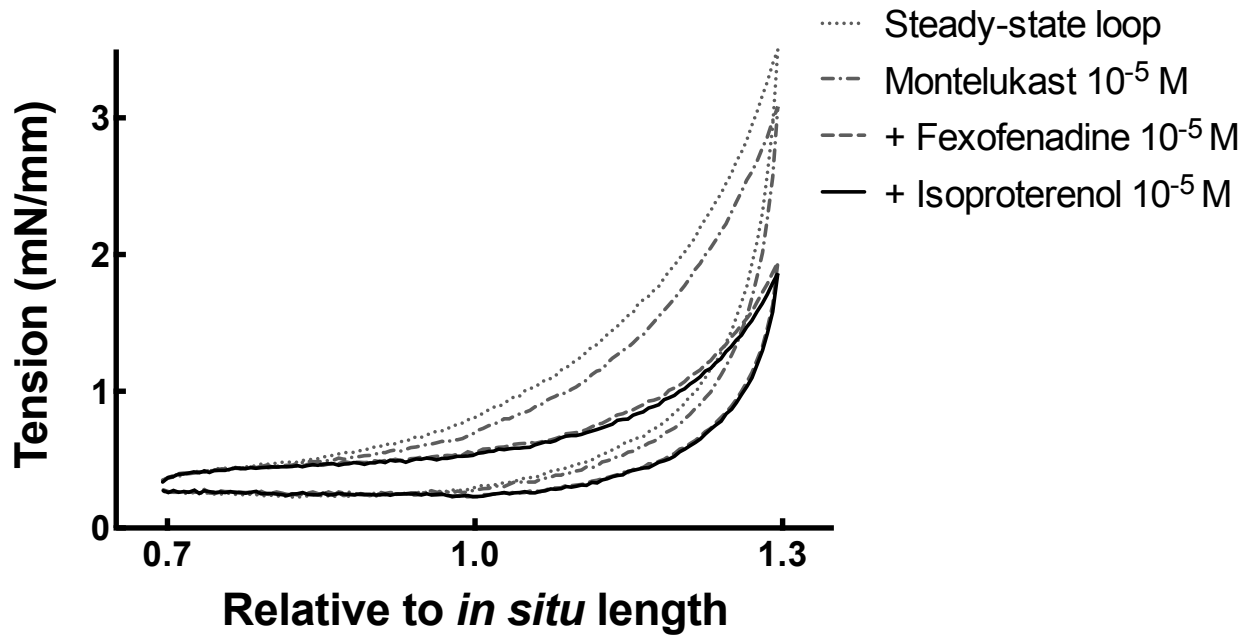
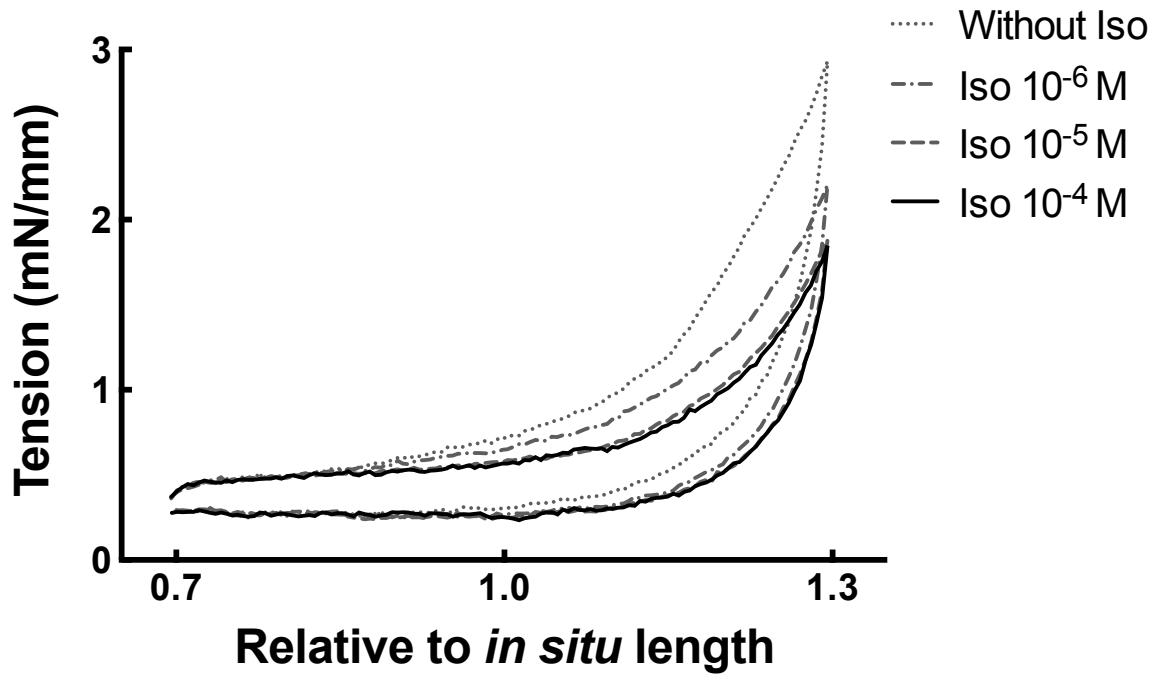
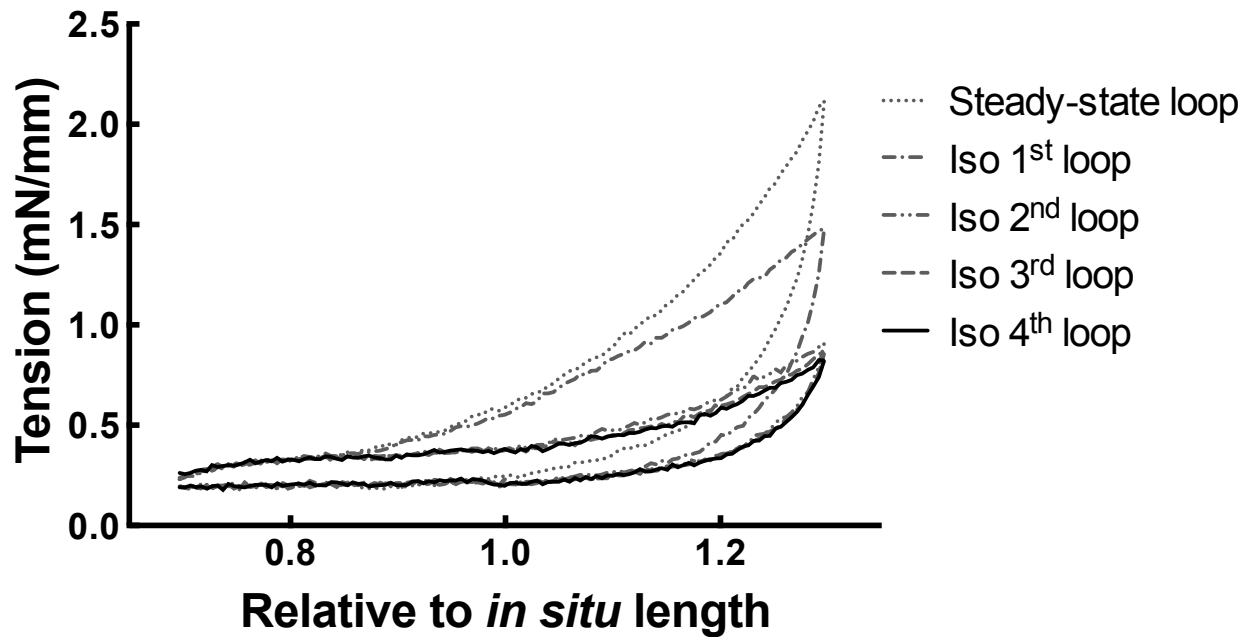


Figure 3A. The mediators involved in the generation of endogenous tone in human bronchi. The cycling from 0.7 to 1.3 $L_{in situ}$ persisted throughout the experiments. The compounds were added in a cumulative fashion in the order depicted in the figure. A steady-state loop was awaited before the addition of each new compound. $n = 3$



B. The detection and quantification of endogenous tone was determined by adding isoproterenol (Iso), a β_2 -adrenoceptor agonist. Shown is the response to increasing concentrations of isoproterenol. The cycling from 0.7 to 1.3 $L_{in situ}$ persisted throughout the experiments. Isoproterenol was added in a cumulative fashion in log increments. A steady-state loop was awaited before adding the first concentration, as well as after the addition of each new concentration. $n = 3$



C. The time-dependent response to 10^{-5} M of isoproterenol. The loops are enumerated to follow the sequence in time. The first cycle is the steady-state loop without isoproterenol. Isoproterenol was then added and the cycling continued for 4 more cycles. The third and fourth loops following the administration of isoproterenol are barely distinguishable from the second one, indicating that a new steady-state loop with 10^{-5} M of isoproterenol was achieved after two loops. This is a representative experiment. $n = 3$

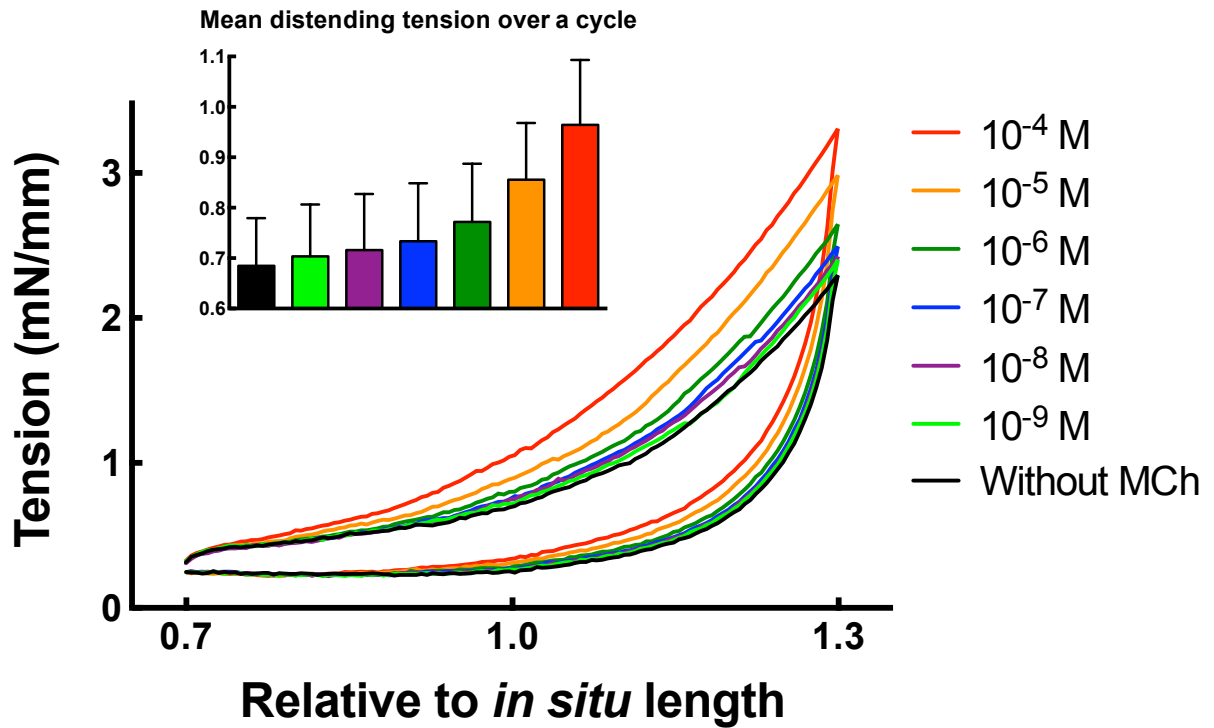


Figure 4. Length-tension loops of human bronchi in the absence or in the presence of different concentrations of methacholine (MCh). The black loop is the steady-state loop in the absence of MCh. It represents the passive tension during dynamic cycling of ASM length. Each of the other loops was obtained with a different MCh concentration. For each loop, the upper part was during lengthening and the lower part was during shortening. The mean tension over a cycle is shown in the inset (note that the y-axis does not start at zero). $n = 7$

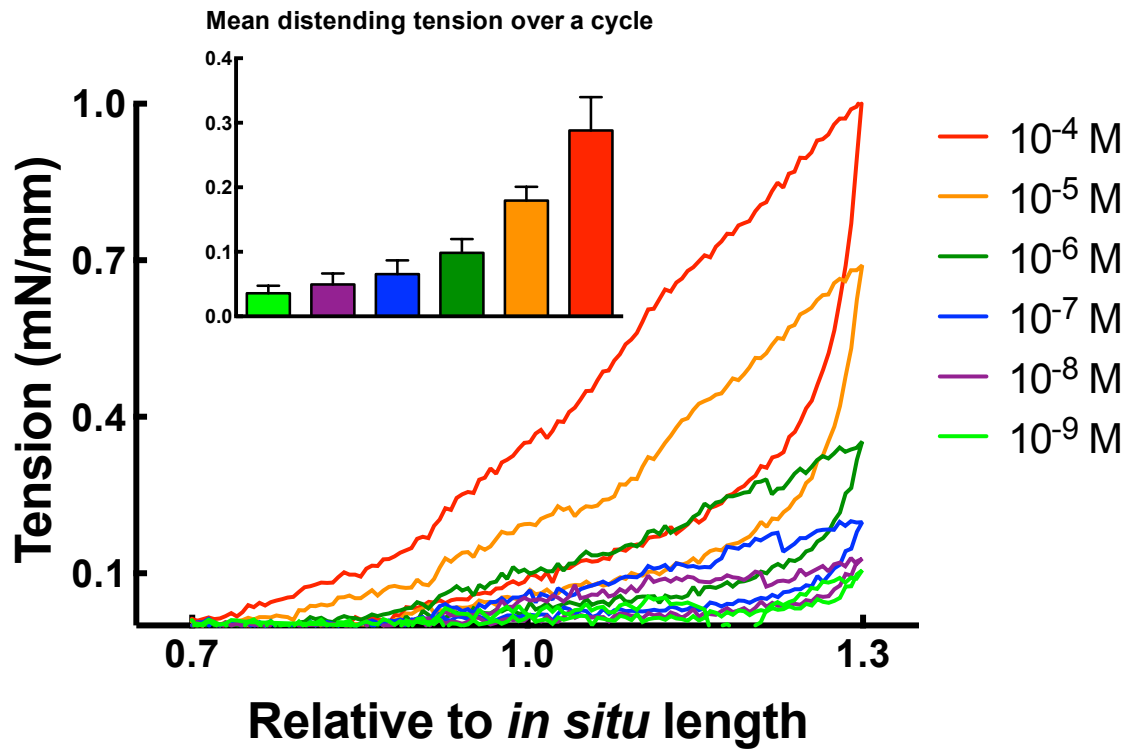


Figure 5. The tension exclusively afforded by the MCh-induced ASM activation. This tension represents the total tension at every MCh concentration minus the passive tension (shown in Figure 4). The mean tensions over a cycle are in the inset. $n = 7$

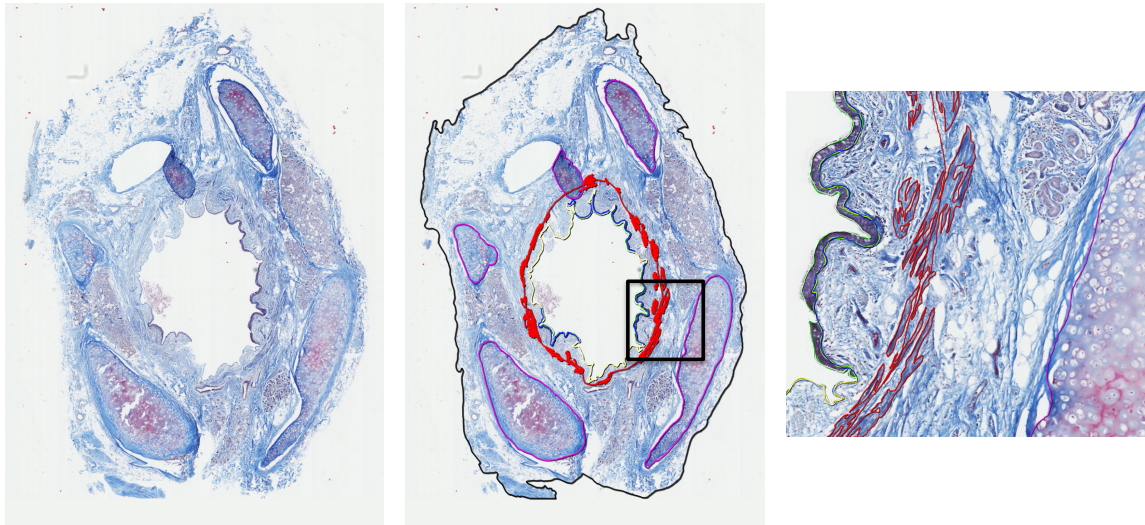


Figure 6. Histological assessment of airway wall components. A representative cross-sectional area of a bronchial segment before (left) and after (middle) the structures of interest were depicted. The red, green and purple encircle ASM, the epithelium and the cartilage, respectively. The yellow demarks the basal lamina. A close-up of the area enclosed by the black square in the middle is shown on the right. The quantitative results are presented in Table 2.

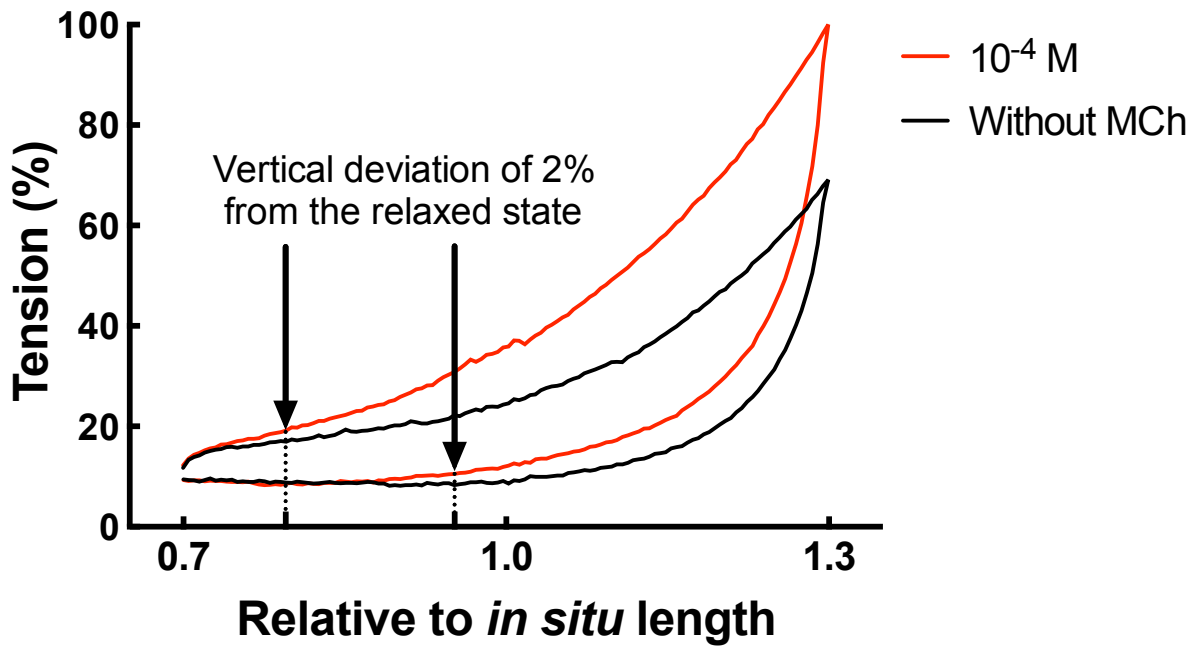


Figure 7. The length at which MCh-induced ASM activation contributes to bronchial tension. At every MCh concentration, the length at which the lengthening and the shortening curves deviated vertically by more than 2% from the steady-state curves with relaxed ASM was identified. The example shown here is from Figure 4 for MCh 10^{-4} M.

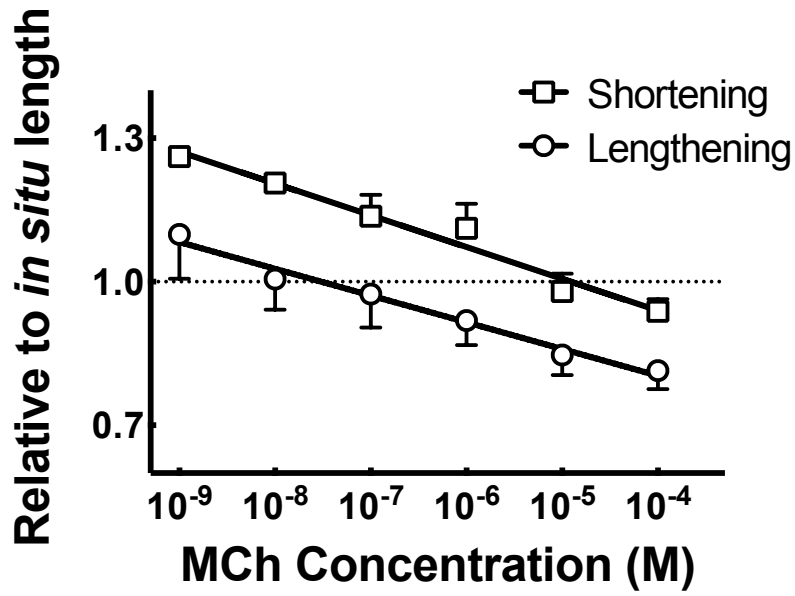


Figure 8. Relationships between MCh concentration and the length at which MCh-induced ASM activation contributes to bronchial tension. The lengths obtained as described in Figure 7 were plotted according to MCh concentrations. The results clearly show that greater is the level of ASM activation smaller is the length at which MCh-induced ASM activation contributes to bronchial tension (the slope of the lines). Another striking feature is the dissociation in that relationship between shortening *versus* lengthening, which is 2.84 logs; *i.e.*, the average horizontal distance between the two lines. This indicates that ASM activation impacts airway wall tension during lengthening with a much greater sensitivity than during shortening.

Les molécules extracellulaires qui régulent la contractilité des voies respiratoires

Morgan Gazzola, Nicolas Flamand, Ynuk Bossé

Université Laval, Québec, Canada

Nombre de mots: 3871

RÉSUMÉ (199 mots)

Introduction: Une portion importante des symptômes de certaines pathologies pulmonaires découle d'une constriction excessive des voies respiratoires due à la contraction du muscle lisse et à l'hyperréactivité bronchique. Une meilleure compréhension de l'ensemble des molécules extracellulaires qui contrôlent la contractilité du muscle lisse est nécessaire afin d'identifier la source du problème.

État des connaissances: Près d'une centaine de molécules, dont certaines nouvellement identifiées, influencent la contractilité du muscle lisse des voies respiratoires. Certaines molécules contractent ou relaxent le muscle lisse directement et agissent donc comme bronchoconstricteurs ou bronchodilatateurs, respectivement. D'autres molécules n'affectent pas la contraction directement mais influencent la contractilité indirectement en modifiant l'effet des bronchoconstricteurs et des bronchodilatateurs. Ces derniers sont appelés des bronchomodulateurs. Certains de ces bronchomodulateurs augmentent l'effet contractile des bronchoconstricteurs et pourraient ainsi contribuer à l'hyperréactivité bronchique.

Perspectives: Considérant le nombre élevé de molécules potentiellement impliquées ainsi que le niveau de chevauchement fonctionnel entre elles, identifier les molécules extracellulaires responsables de la constriction excessive au sein de chaque patient est un défi contemporain de taille.

Conclusions: Le recours à des approches comme la protéomique et la lipidomique sera nécessaire afin de déterminer la source moléculaire des symptômes découlant d'une constriction excessive dans les pathologies pulmonaires.

Mots-clés: Muscle lisse des voies respiratoires, bronchoconstriction, bronchodilatation, hyperréactivité bronchique, asthme

INTRODUCTION

Le muscle lisse des voies respiratoires est le tissu effecteur de la réactivité bronchique. En effet, lorsque le muscle lisse est appelé à se contracter, son raccourcissement diminue le calibre de la lumière des voies respiratoires. Il s'en suit une augmentation de la résistance du flux d'air dans les poumons ainsi qu'un déclin des fonctions pulmonaires. Le déclin des fonctions pulmonaires causé par la contraction du muscle lisse est généralement plus prononcé chez les patients souffrant de pathologies pulmonaires tel que l'asthme [300, 450], la maladie pulmonaire obstructive chronique [451, 452] et la fibrose kystique [453, 454]. Cette hyperréactivité bronchique contribue de façon importante à la manifestation des symptômes respiratoires, tel que la sibilance, la dyspnée et l'oppression thoracique. Bien que la réactivité bronchique soit entièrement dépendante du muscle lisse, les causes de l'hyperréactivité bronchique sont souvent incertaines. Les causes sont vraisemblablement multiples et variables, comprenant des causes musculaires [455] et non-musculaires [366]. Nonobstant, étant donné sa fonction effectrice dans la réactivité, le muscle lisse est un facteur indispensable dans l'équation qui mène à l'hyperréactivité bronchique, d'où l'importance d'étudier les molécules qui provoquent et régulent sa contraction.

Cet article de synthèse vise à décrire les molécules extracellulaires qui régulent la contractilité du muscle lisse des voies respiratoires. Les molécules en question sont d'origine endocrine [456], paracrine [457-459] ou autocrine [457, 460, 461] et peuvent contracter (*i.e.*, les bronchoconstricteurs), relaxer (*i.e.*, les bronchodilatateurs) ou moduler (*i.e.*, les bronchomodulateurs) la contractilité du muscle lisse (Figure 1). Les implications potentielles de ces diverses molécules dans la réactivité et l'hyperréactivité bronchique sont également brièvement abordées. Étant donné la littérature abondante dans ce domaine de recherche, seulement les progrès les plus récents sont décrits. D'autres articles de synthèse qui décrivent les travaux antérieurs sont également cités afin d'offrir une vue plus globale et détaillée de l'ensemble des connaissances actuelles dans ce domaine.

1. LA CONTRACTION

La contraction du muscle lisse des voies respiratoires peut être provoquée par un grand nombre de molécules endogènes [247] (Figure 1). Les bronchoconstricteurs classiques comprennent l'acétylcholine, l'histamine, les leucotriènes, la bradykinine, l'endothéline-1, l'adénosine (du moins chez certaines espèces via les récepteurs A_1 , A_{2B} et/ou A_3), la sérotonine, l'angiotensine II, les anaphylotoxines C3a et C5a, les tachykinines (substance P, neurokinine A, neurokinine B, neuropeptide K, neuropeptide γ), le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), le PAF (*platelet-activating factor*), les nucléotides (ATP, UTP, ADP, UDP), la sphingosine-1-phosphate, le LPA (acide lysophosphatidique) et certaines prostaglandines comme la PGD_2 , la PGE_2 (via le récepteur EP_1 et EP_3), la $PGF_{2\alpha}$ et le thromboxane A_2 . Des effets pro-contractiles sont aussi conférés à d'autres lipides. Par exemple, certains diacylglycérols stimulent la contraction du muscle lisse bronchique de cobaye de façon concentration-dépendante [462]. Certaines hormones pourraient également contribuer à la bronchoconstriction [456]. C'est le cas pour l'insuline et le GRP (*gastrin-releasing peptide*).

D'autres molécules se sont récemment ajoutées à la liste de bronchoconstricteurs (Figure 1). Elles sont décrites dans les prochains paragraphes.

Les plus récents bronchoconstricteurs ont été confirmés suivant l'identification de l'expression de leur récepteur sur le muscle lisse des voies respiratoires. C'est le cas pour un des récepteurs ionotropiques du glutamate, soit le NMDAR (*N-methyl-D-aspartate receptor*) [463]. Le NMDAR est un canal perméable aux cations, particulièrement le calcium (Ca^{2+}). Lorsqu'il est stimulé avec le NMDA, ce récepteur provoque la contraction des petites voies respiratoires dans des coupes de poumons de souris, ainsi que la contraction de gels de collagènes ensemencés de cellules musculaires lisses bronchiques humaines [463]. Lorsque stimulé avec son agoniste endogène, soit le glutamate, son effet contractile semble être amplifié par la glycine, un co-agoniste du NMDAR [463].

Le récepteur OGR1 (*Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1*) a également été identifié sur le muscle lisse [464]. L'OGR1 est un récepteur de protons (H^+). Il a été démontré qu'une réduction modeste du pH extracellulaire (acidification d'un pH de 8.0 à 6.8) provoque la contraction de cellules isolées de muscle lisse bronchique humain [464].

Le potentiel contractile de deux récepteurs latrophilines, soit le LPHN1 et le LPHN3, a également été investigué après que leurs surexpressions aient été découvertes dans les cellules musculaires lisses de patients asthmatiques [465]. Alors qu'un ligand du LPHN1, soit α -LTX (*α latrotoxin*), n'exerce aucun effet direct sur la contractilité, le ligand endogène du LPHN3, soit le FLRT3 (*fibronectin leucin rich transmembrane protein 3*), exerce un effet soutenu quoique modeste. LPHN1 demeure tout de même un récepteur d'intérêt, étant donné sa capacité à induire indirectement la contraction en provoquant la libération d'acétylcholine [465].

Finalement, l'implication du CaSR (*Ca²⁺-sensing receptor*) dans la contractilité du muscle lisse est désormais reconnue [466]. La protéine cationique spermine, et possiblement les protéines cationiques ECP (*eosinophil cationic protein*) et PLA (*poly-L-arginine*; un mimétique de la *major basic protein*), agissent au niveau de ce récepteur afin de provoquer la contraction du muscle lisse [466].

2. LA RELAXATION

La relaxation du muscle lisse des voies respiratoires peut être provoquée par un nombre important de molécules endogènes (Figure 1). Les bronchodilatateurs classiques comprennent l'adrénaline, le VIP (*vasoactive intestinal peptide*), le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*), l'adénosine (du moins chez le cobaye via le récepteur $\text{A}_{2\text{B}}$), le DHA (acide docosahexaénoïque), le 20-HETE (acide 20-hydroxy-éicosatétraénoïque) (du moins dans le tissu humain, bien que bronchoconstricteur chez le cobaye), le 5-oxo-EET (acide 5-oxo-éicosatétraénoïque) (du moins dans le tissu humain, bien que bronchoconstricteur chez le cobaye), le 8,9-EET (acide 8,9-époxy-éicosatriénoïque), le 14,15-EET, le 17,18-EpETE (acide 17,18-époxy-éicosatétraénoïque) et certaines prostaglandines comme la PGE_2 (via les récepteurs EP_2 et EP_4) et la PGI_2 .

D'autres bronchodilatateurs classiques sont des gaz. C'est le cas pour le NO (monoxyde d'azote), le CO (monoxyde de carbone), le CO_2 (dioxyde de carbone) et le H_2S (sulfure d'hydrogène) [467]. Le NO confère une protection contre la bronchoconstriction spécialement si les voies de signalisation qui le canalisent vers la production de SNOs (S-nitrosothiols), particulièrement le GSNO (S-nitrosoglutathion), sont préservées [468]. En effet, les SNOs représentent un moyen de stocker le NO dans les systèmes biologiques afin de préserver sa bioactivité tout en limitant son potentiel toxique causé par son avidité très

importante envers l'oxygène. Les SNOs exercent effectivement un effet relaxant au niveau des voies respiratoires et ont une durée de vie allant jusqu'à plusieurs jours [468, 469].

Il est également bien documenté que certaines hormones, en plus de l'adrénaline, contribuent à la bronchodilatation. C'est le cas pour la dopamine [470, 471], les glucocorticoïdes, les estrogènes, la progestérone et un de ses dérivés la 5 β -prégnénolone, le DHEA (déhydroépiandrostérone), l'uroguanyline, la guanyline, la ghréline [472] et les peptides natriurétiques ANP (*atrial natriuretic peptide*), BNP (*brain natriuretic peptide*) et CNP (*c-type natriuretic peptide*) [456]. La liaison de ces hormones sur leurs récepteurs respectifs provoque la relaxation soit directement ou soit par l'entremise d'une boucle autocrine impliquant la libération de bronchodilatateurs.

D'autres molécules se sont récemment ajoutées à la liste de bronchodilatateurs (Figure 1). Elles sont brièvement décrites dans les prochains paragraphes.

Le BPIFA1 (*Bacterial permeability family member A1*) est un bronchodilatateur nouvellement identifié [473]. Le BPIFA1 est plus communément étudié pour ses propriétés antibactériennes. Une étude récente a démontré son efficacité à bloquer la contraction de gels de collagènes ensemencés de cellules musculaires lisses bronchiques humaines [473]. Les trachées de souris déficientes en BPIFA1 génèrent également plus de force en réponse à l'acétylcholine ou à des concentrations élevées de chlorure de potassium, suggérant que son expression endogène limite la réponse aux bronchoconstricteurs [473]. L'expression de BPIFA1 semble aussi diminuée dans les voies respiratoires de patients asthmatiques [474]. Ceci pourrait favoriser la constriction et contribuer à l'hyperréactivité bronchique.

La glycine, via des canaux chlorures (Cl⁻) qui agissent comme récepteurs à la glycine (*glycine receptor chloride channels*), réduit le maintien de la force induite par l'acétylcholine et la neurokinine A [475]. Cet effet va toutefois à l'encontre de son effet potentialisateur sur la contraction induite par le glutamate [463].

Les cannabinoïdes ont également attiré l'attention dans la recherche de bronchodilatateurs. En effet, les cannabinoïdes inhibent la contraction des voies respiratoires en réponse à des stimulations électriques chez la souris [476], le rat [477], le cobaye [478-480] et l'homme [481]. Par contre, les cannabinoïdes n'affectent pas la contraction directement [476, 477, 479-481]. Leur effet inhibiteur s'effectue par l'entremise du système nerveux en modulant la libération d'acétylcholine provoquée par la stimulation électrique. La majorité des études ont été réalisées avec des agonistes synthétiques des récepteurs CB₁ et CB₂. Selon nos connaissances, seulement deux endocannabinoïdes ont été testés à ce jour, soit l'AEA (N-arachidonyl-éthanolamide) et le 2-AG (2-arachidonoyl-glycérol). Alors que l'AEA inhibe la contraction de trachées chez le rat [477], le 2-AG n'exerce aucun effet sur les voies respiratoires humaines [481].

Certaines molécules qui répondent aux patrons moléculaires associés aux pathogènes affectent aussi la contraction. À titre d'exemple, l'activation des TLR (*Toll-like receptor*) 7 et 8 ont des effets dilatateurs [482]. Concernant le TLR7, il semble provoquer la relaxation indirectement en stimulant la production de NO par les nerfs [482].

Finalement, l'activation des GABA_AR (*γ -amino butyric acid A receptor*) promeut la relaxation du muscle lisse bronchique [483]. Les GABA_AR sont des récepteurs qui opèrent en tant que canaux Cl⁻. Parmi les 6 sous-unités α , le muscle lisse exprime les sous-unités α_4 et α_5 [483]. Certains agonistes spécifiques pour les sous-unités α_4 et α_5 relaxent le muscle lisse trachéal

pré-contracté avec différents bronchoconstricteurs [484, 485]. La contribution potentielle des ligands endogènes du GABA_AR est discutée dans la prochaine section.

3. LA MODULATION

En plus des molécules qui stimulent directement la contraction ou la relaxation du muscle lisse des voies respiratoires, certaines molécules affectent indirectement la constriction en modifiant la réponse aux bronchoconstricteurs et aux bronchodilatateurs (Figure 1). Ce sujet a été révisé en détail dernièrement [112].

En ce qui a trait au bronchoconstricteurs, le TNF α (*tumor necrosis factor α*), l'IL-1 β (interleukine-1 β), l'IL-5, l'IL-33, le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), le LIF (*leukemia inhibitory factor*), l'IL-10, l'IL-13, l'IL-4, l'IL-17A, l'INF γ (interféron γ), le TGF β 1 (*transforming growth factor β 1*), le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), la β -tryptase, la trypsine, l'uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), le tPA (*tissue-type plasminogen activator*), la CCL2 (chimiokine 2 ayant un motif CC), la collagénase, la thrombine, l'acide hypochloreux, l'ATP, la sérotonine, le neuropeptide, les isoprostanes (8-iso-PGE₂, 8-iso-PGE₁, 8-iso-PGF_{2 α}), le LPA, le glucose et la laminine-1 potentialisent la contraction induite par une variété de bronchoconstricteurs. De plus, certains bronchoconstricteurs potentialisent l'effet d'autres bronchoconstricteurs. C'est le cas pour la sphingosine-1-phosphate, les leucotriènes, le PAF, la PGF_{2 α} , la PGD₂, le thromboxane A₂, l'angiotensine II, la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'ATP et les agonistes muscariniques. Inversement, le collagène 1, la fibronectine, le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le 14,15-EET [486], le 17,18-EpETE [487, 488], l'EPA-G (1-éicosapentaénoyl-glycérol) [488] et le peroxyde d'hydrogène diminuent la contraction induite par les bronchoconstricteurs. Certaines molécules ont aussi des rôles antithétiques, pouvant à la fois potentialiser ou atténuer l'effet des bronchoconstricteurs. C'est le cas pour la CT-1 (cardiotrophine-1) et l'élastase.

En ce qui a trait aux bronchodilatateurs, la β -tryptase, le CT-1, le GM-CSF, l'IL-13, l'IL-1 β , l'IL-10, l'IL-5, l'IL-4, le LPA, le PDGF, la PGE₂, le TGF β 1, le TNF α , la sphingosine-1-phosphate et la somatostatine [489] atténuent la relaxation induite par des agonistes du récepteur β ₂-adrénergique. Le TNF α et l'IL-1 β peuvent également atténuer la relaxation induite par la PGE₂ [112]. Inversement, l'INF γ , la glycine [475] et l'activation des récepteurs GABA_A [484, 490] peuvent potentialiser la relaxation induite par des agonistes du récepteur β ₂-adrénergique.

Certaines hormones modulent aussi la contraction du muscle lisse [456]. L'insuline, par exemple, potentialise l'effet contractile de bronchoconstricteurs, en plus d'exercer un effet contractile direct comme mentionné précédemment. Certaines hormones sont considérées pro-relaxantes car elles potentialisent l'effet des bronchodilatateurs [456]. C'est le cas de la dopamine [491], des glucocorticoïdes, des estrogènes et de la progestérone. Les estrogènes peuvent aussi réduire le gain de contractilité provoqué par la sensibilisation passive avec du sérum provenant de patients asthmatiques atopiques [492]. L'effet des estrogènes semble cependant dépendre de la dose. Des traitements *in vivo* avec des doses élevées diminuent les fonctions pulmonaires et augmentent la contractilité du muscle lisse *ex vivo* [493]. D'autres hormones sont aussi considérées pro-contractionnelles ou pro-relaxantes car elles provoquent la libération de bronchoconstricteurs ou bronchodilatateurs d'autres

tissus. C'est le cas de la leptine qui inhibent la libération d'acétylcholine par les nerfs [494], ainsi que le BNP qui favorise la libération de NO par l'épithélium [459].

Certaines protéases influencent aussi la relaxation ou la contraction du muscle lisse en catabolisant les bronchoconstricteurs ou les bronchodilatateurs, respectivement. D'un côté, l'acétylcholinestérase qui dégrade l'acétylcholine, les endopeptidases neutres qui dégradent la substance P, la neurokinine A et la neurotensine, et l'acétylhydrolase qui dégrade le PAF favorisent la relaxation. De l'autre côté, les endopeptidases neutres qui dégradent l'ANP [495, 496], la GSNOR (réductase du S-nitrosogluthathion) qui dégrade le GSNO [468] et la sEH (*soluble epoxyde hydrolase*) qui dégrade le 14,15-EET favorisent la contraction [486].

À un autre niveau de régulation, d'autres molécules inhibent les effets régulateurs de certains bronchomodulateurs. En ce qui a trait à la bronchoconstriction, la 15-épi-LXA₄ (15-épi-lipoxine A₄) [497], le 17,18-EpETE [488], le 14,15-EET [498], l'EPA-G [488], le DPA-G (1-docosapentaénoyl-glycérol) [499], la protectine D₁ [500], la résolvine D₁ [500] et la résolvine D₂ [501] inhibent le gain de contractilité induite par le TNF α . La résolvine D₂ bloque aussi le gain de contractilité induit par le LTD₄ [501]. Le DPA-G [499], la résolvine D₁ [502] et le DHA-G (1-docosahexaénoyl-glycérol) [502], ainsi qu'un métabolite intermédiaire entre le DHA et la résolvine D₁, soit le 17(S)-HpDoHE (acide 17-hydroperoxydocosahexaénoïque) [502], réduisent le gain de contractilité induit par l'IL-13. En ce qui a trait à la bronchodilatation, l'IL-2 et l'INF γ inhibent le déclin de la réponse à l'isoprotérénol causé par une sensibilisation passive avec du sérum atopique. La diminution de la réponse à l'isoprotérénol induite par le TGF β 1 peut également être bloquée par l'INF γ . Finalement, la diminution de la réponse à l'isoprotérénol induite par le TNF α peut être bloquée par le 14,15-EET [498, 503] et le 17,18-EpETE [503].

D'autres molécules se sont récemment ajoutées à la liste des bronchomodulateurs (Figure 1). Elles sont brièvement décrites dans les prochains paragraphes.

Le mfge8 (*milk fat globule-EGF factor 8*) inhibe le gain de contractilité induite par l'IL-13, l'IL-17A et le TNF α [195]. Le neuropeptide Y augmente la contraction des petites voies respiratoires en réponse à la métacholine dans des coupes de poumons murins et humains [504]. La WNT-5A augmente la force de contraction du muscle lisse trachéal de bœuf en réponse à l'histamine [505]. Le CXCL8 augmente la contraction de trachées murines en réponse au carbachol et à une concentration élevée de chlorure de potassium [506]. Le S100A8 diminue la contractilité d'anneaux trachéaux de rats en réponse à l'acétylcholine, ainsi que la contractilité de gels de collagènesensemencés de cellules musculaires lisses bronchiques de rats [507].

Le CaSR module également la contraction, en plus de son rôle potentiel mentionné précédemment dans la contraction induite par les protéines cationiques [466]. En effet, la sensibilité du muscle lisse à l'acétylcholine est augmentée via le CaSR lorsque les concentrations extracellulaires de Ca²⁺ augmentent [466]. Le CaSR suscite beaucoup d'intérêt à l'égard de l'hyperréactivité bronchique étant donné sa surexpression dans le muscle lisses des voies respiratoires de patients asthmatiques [466]. Les calcilytiques, des antagonistes de ce récepteur, semblent notamment efficaces pour bloquer l'hyperréactivité bronchique dans certains modèles murins d'asthme [466].

Les acides gras libres à longues chaînes affectent aussi la réponse aux bronchoconstricteurs et aux bronchodilatateurs. L'acide oléique et l'acide linoléique, entre

autres, potentialisent la contraction induite par l'acétylcholine et atténuent la relaxation induite par l'isoprotérénol via le récepteur FFAR1 (*free fatty acid receptor 1*) [508]. Des résultats semblables pourraient expliquer pourquoi un seul repas riche en gras réduit l'effet bronchodilatateur du salbutamol chez les patients asthmatiques [509].

Le rôle potentiel des cannabinoïdes dans la protection contre l'hyperréactivité bronchique a également été souligné. Entre autres, des agonistes synthétiques du récepteur CB₁ bloquent le gain de contractilité induite par le NGF (*nerve growth factor*) sur des trachées murines [476]. Certains phytocannabinoïdes, comme le THC (Δ (9)-tétrahydrocannabinol), atténue aussi l'hypercontractilité *in vitro* et l'hyperréactivité *in vivo* en bloquant l'effet potentialisateur du TNF α sur la libération d'acétylcholine [478].

Le GABA_AR affecte aussi la réponse aux bronchoconstricteurs, en plus de favoriser la relaxation directement et indirectement comme mentionné précédemment [483, 484, 490]. En effet, un agoniste de la sous-unité α_4 du GABA_AR diminue la réactivité bronchique à la métacholine *in vivo* dans un modèle murin d'asthme [484]. Inversement, un antagoniste du GABA_AR augmente la contraction induite par l'acétylcholine [458], suggérant un rôle endogène et omniprésent de ce récepteur dans la protection contre la bronchoconstriction. Dans le même sens, les souris sensibilisées aux acariens et déficientes pour la sous-unité α_4 du récepteur GABA_A démontrent une hyperréactivité bronchique accrue comparativement aux souris sauvages sensibilisées aux acariens [510]. Il semble toutefois que la déficience n'affecte pas la réactivité bronchique en absence de sensibilisation aux acariens [510]. La déficience en sous-unité α_4 du récepteur GABA_A n'affecte pas non-plus la réponse à l'acétylcholine sur des trachées isolées provenant de souris sensibilisées aux acariens [510]. Collectivement, ces résultats suggèrent que le récepteur exerce un effet bronchodilatateur, mais uniquement *in vivo* dans un contexte inflammatoire où son ligand endogène est possiblement présent.

Le TMEM16, un canal d'ions Cl⁻ activé par le Ca²⁺, est aussi requis pour le développement d'une contraction optimale en réponse aux agonistes muscariniques [511]. Il pourrait être encore plus important pour la contraction induite par des bronchoconstricteurs inflammatoires, tels que l'histamine, le thromboxane A₂, la sérotonine et le LTD₄ [512]. L'expression du TMEM16A est d'ailleurs augmentée dans le muscle lisse des voies respiratoires de souris sensibilisées et provoquées avec un allergène [513].

Il devient de plus en plus évident que la contraction du muscle lisse peut aussi être modulée par le remodelage de la matrice extracellulaire. Entre autres, certaines enzymes qui dégradent des constituants de la matrice extracellulaire affectent la contractilité. Dans certains cas, ces enzymes semblent diminuer la contractilité. Par exemple, la chymase inhibe le gain de contraction induit par l'IL-13 et l'IL-17A [514, 515]. Son effet implique le clivage de la fibronectine qui se dissocie subséquentement de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Cette dissociation semblerait altérer l'adhésion entre les cellules et ainsi la force de transmission (*i.e.*, la mécanotransduction). En support à cette conjecture, le blocage de l' $\alpha_5\beta_1$ inhibe le gain de contraction induit par l'IL-13, en plus d'augmenter la bronchodilatation induite par l'isoprotérénol [514]. Un autre exemple est l'élastase. L'élastase est connue pour dégrader plusieurs constituants de la matrice extracellulaire et diminue la force de faisceaux trachéaux de chiens en réponse à des concentrations élevées d'acétylcholine [304]. La diminution de la force par l'élastase était associée avec la rupture des complexes entre les intégrines et les protéines intracellulaires qui assurent la mécanotransduction, suggérant

encore une fois un défaut au niveau de la transmission de la force [304]. Dans d'autre cas, les enzymes qui dégradent les constituants de la matrice extracellulaire semblent augmenter la contraction. Par exemple, la surexpression d'ADAM33 (a *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 33*) augmente la contraction de cellules provenant de muscles lisses bronchiques de rats en réponse à l'histamine [516]. Il reste à confirmer si l'effet d'ADAM33 est occasionné par son activité désintégrine et/ou métalloprotéinase.

Finalement, des études récentes ont démontrées que certains gaz bronchodilatateurs peuvent aussi exercer des effets pro-contractiles. Par exemple, l'hypercapnie (*i.e.*, augmentation des taux de CO₂) augmente la contractilité du muscle lisse [517]. Cet effet est contradictoire à son rôle bien connu dans la bronchodilatation. La contradiction semble s'expliquer par la durée d'exposition. Alors que de courtes périodes d'exposition dilatent les voies respiratoires, de longues périodes augmentent la contractilité [517]. L'effet bronchodilatateur du NO est aussi influencé par sa durée d'exposition. En effet, une exposition chronique au NO cause du dommage oxydatif à la sGC (*soluble guanylate cyclase*) [518]. Ces modifications post-transductionnelles rendent la sGC insensible au NO et inhibent ainsi la génération de cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) et la bronchodilatation qui en résulte [518]. Ces observations soulèvent un autre niveau de complexité. Il est possible que l'effet de plusieurs molécules extracellulaires sur la contractilité dépend du laps de temps au cours duquel elles agissent sur le muscle lisse.

CONCLUSION

Comme abordé dans cet article, la constriction des voies respiratoires est contrôlée par une pléiade de molécules extracellulaires (Figure 1). En fait, la liste de molécules pouvant potentiellement être impliquées dans la contractilité du muscle lisse continue à s'allonger. Certaines molécules stimulent directement la contraction ou la relaxation du muscle lisse et agissent respectivement comme bronchoconstricteurs ou bronchodilatateurs. D'autres molécules n'exercent pas d'effet direct sur le muscle lisse, mais influence la contractilité indirectement en augmentant ou diminuant l'effet des bronchoconstricteurs et des bronchodilatateurs. On appelle ces derniers des bronchomodulateurs. Finalement, on sait désormais que d'autres molécules opèrent à un autre niveau de régulation en modifiant l'effet des bronchomodulateurs. Par exemple, le 14,15-EET diminue l'effet potentialisateur du TNF α sur la contraction induite par l'histamine [498]. L'effet de plusieurs molécules sur la contractilité est donc contextuel, car elle dépend de la présence ou de l'absence d'autres molécules.

Il est essentiel de comprendre que le degré de contractilité résulte de l'action concertée de toutes les molécules extracellulaires qui agissent simultanément sur le muscle lisse et non pas d'un seul bronchoconstricteur ou d'un seul bronchodilatateur. Dans un contexte de pathologies pulmonaires, le rétrécissement de la lumière des voies respiratoires, ainsi que les symptômes qui en découlent, sont la conséquence d'un dérèglement de la balance entre la bronchoconstriction et la bronchodilatation. Une constriction excessive peut être occasionnée par: 1- une augmentation de l'expression/activité des bronchoconstricteurs; 2- une diminution de l'expression/activité des bronchodilatateurs; 3- un changement de l'expression/activité des bronchomodulateurs qui potentialisent la réponse aux bronchoconstricteurs et/ou atténuent la réponse aux bronchodilatateurs; et/ou 4- des changements de l'expression/activité de molécules qui agissent à un autre niveau de

régulation et modifient l'effet de bronchomodulateurs afin de favoriser la constriction. Tel qu'illustré dans la Figure 1, près d'une centaine de molécules connues pourraient être impliquées dans la constriction au sein d'un même patient. Considérant la surexpression de plusieurs bronchomodulateurs qui augmente l'effet contractile des bronchoconstricteurs dans certaines pathologies pulmonaires [247], il est facile d'envisager que l'hyperréactivité bronchique émane d'un ou plusieurs défauts moléculaires. Cependant, étant donné le nombre important de molécules potentiellement impliquées, ainsi que le niveau élevé de chevauchement fonctionnel entre elles, il est difficile de déduire la source moléculaire de la constriction et de l'hyperréactivité bronchique *in vivo*.

Tel que souligné dans cet article, la complexité est d'autant plus amplifiée lorsqu'on considère les aspects spatio-temporels. En effet, dans un contexte *in vivo*, l'effet de chaque molécule dépend de sa concentration autour du muscle lisse, ainsi que du laps de temps au cours duquel elles agissent sur le muscle lisse. Il faut aussi comprendre que les facteurs étiologiques menant à la constriction et à l'hyperréactivité bronchique peuvent être variables entre les patients en plus de changer en fonction du temps. Il est donc fort probable qu'une constriction excessive soit due au dérèglement de tout un assortiment de molécules qui est non-seulement variable d'un patient à l'autre mais qui varie aussi en fonction du temps au sein du même patient. Sans contredit, l'identification des molécules responsables de la constriction excessive des voies respiratoires dans les pathologies pulmonaires humaines représente un défi de taille pour les scientifiques qui œuvrent actuellement dans ce domaine de recherche. La lipidomique et la protéomique sont évidemment des approches prometteuses afin d'élucider les causes moléculaires de la constriction excessive des voies respiratoires dans différentes pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique et la fibrose kystique.

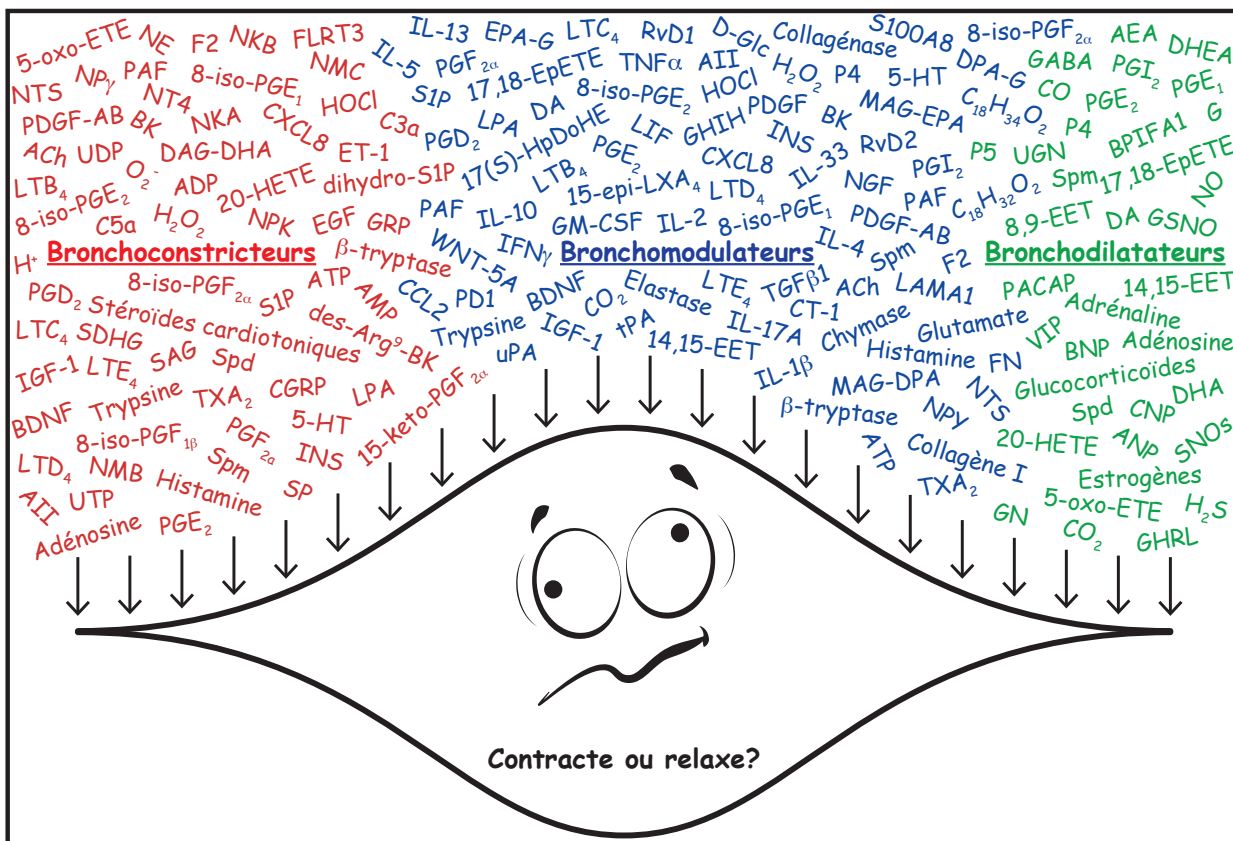


Figure 1. Les molécules extracellulaires qui gouvernent la contractilité du muscle lisse des voies respiratoires. Elles sont divisées en trois groupes: 1- Les bronchoconstricteurs qui provoquent la contraction (rouge); 2- les bronchodilatateurs qui provoquent la relaxation (vert); et 3- les bronchomodulateurs qui influencent l'effet des bronchoconstricteurs et des bronchodilatateurs (bleu). Noter que certaines molécules peuvent être classifiées dans plus d'un groupe. Abréviations: All, angiotensine II; ACh, acétylcholine; ADP, adénosine diphosphate; AEA, N-arachidonyl-éthanolamine, alias anandamide; AMP, adénosine monophosphate; ANP, *atrial natriuretic peptide*; ATP, adénosine triphosphate; BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*; BK, bradykinine; BNP, *brain natriuretic peptide*; BPIFA1, *Bacterial permeability family member A1*; C3a, fragment soluble de la protéine du complément C3; C5a, fragment soluble de la protéine du complément C5; CCL2, chimiokine 2 ayant un motif CC, alias MCP-1; CGRP, *calcitonin gene-related peptide*; C₁₈H₃₂O₂, acide linoléique; C₁₈H₃₄O₂, acide oléique; CNP, *c-type natriuretic peptide*; CT-1, cardiotrophine-1; CXCL8, chimiokine 8 ayant un motif CXC, alias interleukine-8; CO, monoxyde de carbone; CO₂, dioxyde de carbone; DA, dopamine; DAG-DHA, acide docosahexaénoïque contenant du diacylglycérol; D-Glc, glucose; DHA, acide docosahexaénoïque; DHEA, déhydroépiandrostérone; DPA-G, 1-docosapentaénoyl-glycérol; 8,9-EET, acide 8,9-époxy-éicosatriénoïque; 14,15-EET, acide 14,15-époxy-éicosatriénoïque; EGF, *epidermal growth factor*; l'EPA-G, 1-éicosapentaénoyl-glycérol; 17,18-EpETE, acide 17,18-époxy-éicosatétraénoïque; 15-épi-LXA₄, 15-épi-lipoxine A₄; ET-1, endothéline-1; F2, thrombine; FN, fibronectine; FLRT3, *fibronectin leucin rich transmembrane protein 3*; G, glycine; GABA, *γ-amino butyric acid*; GHIH, *growth-hormone-inhibiting hormone*, alias somatostatine; GHRL, ghréline; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; GN, guanyline; GRP, *gastrin-releasing peptide*; GSNO, S-nitrosoglutathion; H⁺, proton; 20-HETE, acide 20-hydroxy-éicosatétraénoïque; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; HOCl, acide hypochloreux; H₂S, sulfure d'hydrogène; 5-HT, 5-hydroxytryptamine, alias sérotonine; IFN_γ, interféron γ ; IGF-1, *insulin-like growth factor-1*; IL, interleukine; INS, insuline; LAMA1, laminine-1; LIF, *leukemia inhibitory factor*; LPA, acide lysophosphatidique; LTB₄, leucotriène B₄; LTC₄, leucotriène C₄; LTD₄, leucotriène D₄; LTE₄, leucotriène E₄; MAG-DPA, acide docosahexaénoïque monoacylglycéride; MAG-EPA, acide éicosapentaénoïque monoacylglycéride; NGF, *nerve growth factor*; NE, norépinéphrine; NKA, neurokinine A; NKB, neurokinine B; NMB, neuromédine B; NMC, neuromédine C; NO, monoxyde d'azote; NP_γ, neuropeptide γ ; NPK, neuropeptide K; NT4, neurotrophine 4; NTS, neurotensine; O₂⁻, anion radical superoxyde; 5-oxo-EETE, acide 5-oxo-éicosatétraénoïque; P4, progestérone; P5, prégnénolone; PACAP, *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*; PAF, *platelet-activating factor*; PD1, protectine D1; PDGF, *platelet-derived growth factor*; PGD₂, prostaglandine D₂; PGE₂, prostaglandine E₂; PGF_{2 α} , prostaglandine F_{2 α} ; PGI₂, prostaglandine I₂, alias prostacycline; RvD1, résolvine D1; RvD2, résolvine D2; SAG, 1-stéaroyl-2-arachidonoyl-sn-glycérol; SDHG, 1-stéaroyl-2-docosahexaénoyl-sn-glycérol; 17(S)-HpDoHE, acide 17(S)-hydroperoxy-docosahexaénoïque; SNOs, S-nitrosothiols; S1P, sphingosine-1-phosphate; SP, substance P; Spd, spermidine; Spm, spermine; TGF β , *transforming growth factor β* ; TNF α , *tumor necrosis factor α* ; tPA, *tissue-type plasminogen activator*; TXA₂, thromboxane A₂; UDP, uridine diphosphate; UGN, uroguanyline; uPA, *urokinase-type plasminogen activator*; UTP, uridine triphosphate; VIP, *vasoactive intestinal peptide*