



**HAL**  
open science

# Déterminants biologiques de la rhéologie des expectorations dans les maladies des voies aériennes

Mathilde Volpato

► **To cite this version:**

Mathilde Volpato. Déterminants biologiques de la rhéologie des expectorations dans les maladies des voies aériennes. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02964536

**HAL Id: dumas-02964536**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02964536v1>**

Submitted on 12 Oct 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITE DE MONTPELLIER  
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

**THESE**

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR EN MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Mathilde VOLPATO**

Le 21 Octobre 2019

TITRE

**Déterminants biologiques de la rhéologie des expectorations  
dans les maladies des voies aériennes**

Directeur de thèse : Pr. Arnaud BOURDIN, MD, PhD

JURY

Président :

Pr. Sylvain LEHMANN, MD, PhD

Assesseurs :

Pr. Maurice HAYOT, MD, PhD

Pr. Arnaud BOURDIN, MD, PhD

Dr. Edouard TUAILLON, MD, PhD



UNIVERSITE DE MONTPELLIER  
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

**THESE**

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR EN MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Mathilde VOLPATO**

Le 21 Octobre 2019

TITRE

**Déterminants biologiques de la rhéologie des expectorations  
dans les maladies des voies aériennes**

Directeur de thèse : Pr. Arnaud BOURDIN, MD, PhD

JURY

Président :

Pr. Sylvain LEHMANN, MD, PhD

Assesseurs :

Pr. Maurice HAYOT, MD, PhD

Pr. Arnaud BOURDIN, MD, PhD

Dr. Edouard TUAILLON, MD, PhD



**PERSONNEL ENSEIGNANT**

*Professeurs Honoraires*

ALLIEU Yves	DUBOIS Jean Bernard	MION Charles
ALRIC Robert	DUMAS Robert	MION Henri
ARNAUD Bernard	DUMAZER Romain	MIRO Luis
ASTRUC Jacques	ECHENNE Bernard	NAVARRO Maurice
AUSSILLOUX Charles	FABRE Serge	NAVRATIL Henri
AVEROUS Michel	FREREBEAU Philippe	OTHONIEL Jacques
AYRAL Guy	GALIFER René Benoît	PAGES Michel
BAILLAT Xavier	GODLEWSKI Guilhem	PEGURET Claude
BALDET Pierre	GRASSET Daniel	PELISSIER Jacques
BALDY-MOULINIER Michel	GROLLEAU-RAOUX Robert	POUGET Régis
BALMES Jean-Louis	GUILHOU Jean-Jacques	PUECH Paul
BALMES Pierre	HERTAULT Jean	PUJOL Henri
BANSARD Nicole	HUMEAU Claude	PUJOL Rémy
BAYLET René	JAFFIOL Claude	RABISCHONG Pierre
BILLIARD Michel	JANBON Charles	RAMUZ Michel
BLARD Jean-Marie	JANBON François	RIEU Daniel
BLAYAC Jean Pierre	JARRY Daniel	RIOUX Jean-Antoine
BLOTMAN Francis	JOYEUX Henri	ROCHFORT Henri
BONNEL François	LAFFARGUE François	ROSSI Michel
BOUDET Charles	LALLEMANT Jean Gabriel	ROUANET DE VIGNE LAVIT Jean Pierre
BOURGEOIS Jean-Marie	LAMARQUE Jean-Louis	SAINT AUBERT Bernard
BRUEL Jean Michel	LAPEYRIE Henri	SANCHO-GARNIER Hélène
BUREAU Jean-Paul	LESBROS Daniel	SANY Jacques
BRUNEL Michel	LOPEZ François Michel	SEGNARBIEUX François
CALLIS Albert	LORIOT Jean	SENAC Jean-Paul
CANAUD Bernard	LOUBATIERES Marie Madeleine	SERRE Arlette
CASTELNAU Didier	MAGNAN DE BORNIER Bernard	SIMON Lucien
CHAPTAL Paul-André	MARY Henri	SOLASSOL Claude
CIURANA Albert-Jean	MATHIEU-DAUDE Pierre	THEVENET André
CLOT Jacques	MEYNADIER Jean	VIDAL Jacques
D'ATHIS Françoise	MICHEL François-Bernard	VISIER Jean Pierre
DEMAILLE Jacques	MICHEL Henri	
DESCOMPS Bernard		
DIMEGLIO Alain		

**Professeurs Emérites**

ARTUS Jean-Claude	MAUDELONDE Thierry
BLANC François	MONNIER Louis
BOULENGER Jean-Philippe	PREFAUT Christian
BOURREL Gérard	PUJOL Rémy
BRINGER Jacques	SULTAN Charles
CLAUSTRES Mireille	TOUCHON Jacques
DAURES Jean-Pierre	VOISIN Michel
DAUZAT Michel	ZANCA Michel
DEDET Jean-Pierre	
ELEDJAM Jean-Jacques	
GUERRIER Bernard	
JOURDAN Jacques	
MARES Pierre	
MAURY Michèle	
MILLAT Bertrand	

## Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

### *PU-PH de classe exceptionnelle*

ALBAT Bernard - Chirurgie thoracique et cardiovasculaire  
ALRIC Pierre - Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)  
BACCINO Eric - Médecine légale et droit de la santé  
BASTIEN Patrick - Parasitologie et mycologie  
BONAFE Alain - Radiologie et imagerie médicale  
CAPDEVILA Xavier - Anesthésiologie-réanimation  
COLSON Pascal – Anesthésie-réanimation  
COMBE Bernard - Rhumatologie  
COSTA Pierre - Urologie  
COTTALORDA Jérôme - Chirurgie infantile  
COUBES Philippe – Neurochirurgie  
COURTET Philippe – Psychiatrie d'adultes, addictologie  
CRAMPETTE Louis - Oto-rhino-laryngologie  
CRISTOL Jean Paul - Biochimie et biologie moléculaire  
DAVY Jean Marc - Cardiologie  
DE LA COUSSAYE Jean Emmanuel - Anesthésiologie-réanimation  
DELAPORTE Eric - Maladies infectieuses ; maladies tropicales  
DEMOLY Pascal – Pneumologie, addictologie  
DE WAZIERES Benoît - Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
DOMERGUE Jacques - Chirurgie générale  
DUFFAU Hugues - Neurochirurgie  
DUJOLS Pierre - Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication  
ELIAOU Jean François - Immunologie  
FABRE Jean Michel - Chirurgie générale  
FRAPIER Jean-Marc – Chirurgie thoracique et cardiovasculaire  
GUILLOT Bernard - Dermato-vénéréologie  
HAMAMAH Samir-Biologie et Médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale  
HEDON Bernard-Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale  
HERISSON Christian-Médecine physique et de réadaptation  
JABER Samir-Anesthésiologie-réanimation  
JEANDEL Claude-Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
JONQUET Olivier-Réanimation ; médecine d'urgence  
JORGENSEN Christian-Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie  
KOTZKI Pierre Olivier-Biophysique et médecine nucléaire  
LANDAIS Paul-Epidémiologie, Economie de la santé et Prévention  
LARREY Dominique-Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie  
LEFRANT Jean-Yves-Anesthésiologie-réanimation  
LE QUELLEC Alain-Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
MARTY-ANE Charles - Chirurgie thoracique et cardiovasculaire  
MERCIER Jacques - Physiologie  
MESSNER Patrick – Cardiologie  
MONDAIN Michel – Oto-rhino-laryngologie  
PELISSIER Jacques-Médecine physique et de réadaptation  
RENARD Eric-Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale  
REYNES Jacques-Maladies infectieuses, maladies tropicales  
RIBSTEIN Jean-Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
RIPART Jacques-Anesthésiologie-réanimation  
ROUANET Philippe-Cancérologie ; radiothérapie

SCHVED Jean François-Hématologie; Transfusion  
TAOUREL Patrice-Radiologie et imagerie médicale  
UZIEL Alain -Oto-rhino-laryngologie  
VANDE PERRE Philippe-Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière  
YCHOU Marc-Cancérologie ; radiothérapie

### **PU-PH de 1<sup>re</sup> classe**

AGUILAR MARTINEZ Patricia-Hématologie ; transfusion  
AVIGNON Antoine-Nutrition  
AZRIA David -Cancérologie ; radiothérapie  
BAGHDADLI Amaria-Pédopsychiatrie ; addictologie  
BEREGI Jean-Paul-Radiologie et imagerie médicale  
BLAIN Hubert-Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
BLANC Pierre-Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie  
BORIE Frédéric-Chirurgie digestive  
BOULOT Pierre-Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale  
CAMBONIE Gilles -Pédiatrie  
CAMU William-Neurologie  
CANOVAS François-Anatomie  
CARTRON Guillaume-Hématologie ; transfusion  
CHAMMAS Michel-Chirurgie orthopédique et traumatologique  
CHANQUES Gérald – Anesthésie-réanimation  
CORBEAU Pierre-Immunologie  
COSTES Valérie-Anatomie et cytologie pathologiques  
CYTEVAL Catherine-Radiologie et imagerie médicale  
DADURE Christophe-Anesthésiologie-réanimation  
DAUVILLIERS Yves-Physiologie  
DE TAYRAC Renaud-Gynécologie-obstétrique, gynécologie médicale  
DEMARIA Roland-Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire  
DEREURE Olivier-Dermatologie – vénéréologie  
DE VOS John – Cytologie et histologie  
DROUPY Stéphane -Urologie  
DUCROS Anne-Neurologie  
GARREL Renaud – Oto-rhino-laryngologie  
HAYOT Maurice - Physiologie  
KLOUCHE Kada-Réanimation ; médecine d'urgence  
KOENIG Michel-Génétique moléculaire  
LABAUGE Pierre- Neurologie  
LAFFONT Isabelle-Médecine physique et de réadaptation  
LAVABRE-BERTRAND Thierry-Cytologie et histologie  
LAVIGNE Jean-Philippe – Bactériologie – virologie, hygiène hospitalière  
LECLERCQ Florence-Cardiologie  
LEHMANN Sylvain-Biochimie et biologie moléculaire  
LE MOING Vincent – Maladies infectieuses, maladies tropicales  
LUMBROSO Serge-Biochimie et Biologie moléculaire  
MARIANO-GOULART Denis-Biophysique et médecine nucléaire  
MATECKI Stéfan -Physiologie  
MEUNIER Laurent-Dermato-vénéréologie  
MOREL Jacques - Rhumatologie  
MORIN Denis-Pédiatrie  
NAVARRO Francis-Chirurgie générale  
PETIT Pierre-Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie  
PERNEY Pascal-Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
PRUDHOMME Michel - Anatomie  
PUJOL Jean Louis-Pneumologie ; addictologie  
PUJOL Pascal-Biologie cellulaire

PURPER-OUAKIL Diane-Pédopsychiatrie ; addictologie  
QUERE Isabelle-Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)  
SOTTO Albert-Maladies infectieuses ; maladies tropicales  
TOUITOU Isabelle-Génétique  
TRAN Tu-Anh-Pédiatrie  
VERNHET Hélène-Radiologie et imagerie médicale

#### PU-PH de 2ème classe

ASSENAT Éric-Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie  
BERTHET Jean-Philippe-Chirurgie thoracique et cardiovasculaire  
BOURDIN Arnaud-Pneumologie ; addictologie  
CANAUD Ludovic-Chirurgie vasculaire ; Médecine Vasculaire  
CAPDEVIELLE Delphine-Psychiatrie d'Adultes ; addictologie  
CAPTIER Guillaume-Anatomie  
CAYLA Guillaume-Cardiologie  
COLOMBO Pierre-Emmanuel-Cancérologie ; radiothérapie  
COSTALAT Vincent-Radiologie et imagerie médicale  
COULET Bertrand-Chirurgie orthopédique et traumatologique  
CUVILLON Philippe-Anesthésiologie-réanimation  
DAIEN Vincent-Ophtalmologie  
DORANDEU Anne-Médecine légale -  
DUPEYRON Arnaud-Médecine physique et de réadaptation  
FAILLIE Jean-Luc – Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, addictologie  
FESLER Pierre-Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
GAUJOUX Viala Cécile-Rhumatologie  
GENEVIEVE David-Génétique  
GODREUIL Sylvain-Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière  
GUILLAUME Sébastien-Urgences et Post urgences psychiatriques -  
GUILPAIN Philippe-Médecine Interne, gériatrie et biologie du vieillissement; addictologie  
GUIU Boris-Radiologie et imagerie médicale  
HERLIN Christian – Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie  
HOUEDE Nadine-Cancérologie ; radiothérapie  
JACOT William-Cancérologie ; Radiothérapie  
JUNG Boris-Réanimation ; médecine d'urgence  
KALFA Nicolas-Chirurgie infantile  
KOUYOUMDJIAN Pascal-Chirurgie orthopédique et traumatologique  
LACHAUD Laurence-Parasitologie et mycologie  
LALLEMANT Benjamin-Oto-rhino-laryngologie  
LE QUINTREC Moglie - Néphrologie  
LETOUZEY Vincent-Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale  
LONJON Nicolas - Neurologie  
LOPEZ CASTROMAN Jorge-Psychiatrie d'Adultes ; addictologie  
LUKAS Cédric-Rhumatologie  
MAURY Philippe-Chirurgie orthopédique et traumatologique  
MILLET Ingrid-Radiologie et imagerie médicale  
MORANNE Olivier-Néphrologie  
NAGOT Nicolas-Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication  
NOCCA David-Chirurgie digestive  
PANARO Fabrizio-Chirurgie générale  
PARIS Françoise-Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale  
PASQUIE Jean-Luc-Cardiologie  
PEREZ MARTIN Antonia-Physiologie  
POUDEROUX Philippe-Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie  
RIGAU Valérie-Anatomie et cytologie pathologiques  
RIVIER François-Pédiatrie

ROGER Pascal-Anatomie et cytologie pathologiques  
ROSSI Jean François-Hématologie ; transfusion  
ROUBILLE François-Cardiologie  
SEBBANE Mustapha-Anesthésiologie-réanimation  
SIRVENT Nicolas-Pédiatrie  
SOLASSOL Jérôme-Biologie cellulaire  
STOEBNER Pierre – Dermato-vénérologie  
SULTAN Ariane-Nutrition  
THOUVENOT Éric-Neurologie  
THURET Rodolphe-Urologie  
VENAIL Frédéric-Oto-rhino-laryngologie  
VILLAIN Max-Ophtalmologie  
VINCENT Denis -Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie  
VINCENT Thierry-Immunologie  
WOJTUSCISZYN Anne-Endocrinologie-diabétologie-nutrition

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

1<sup>re</sup> classe :

COLINGE Jacques - Cancérologie, Signalisation cellulaire et systèmes complexes

2<sup>ème</sup> classe :

LAOUDJ CHENIVESSE Dalila - Biochimie et biologie moléculaire  
VISIER Laurent - Sociologie, démographie

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - Médecine générale**

1<sup>re</sup> classe :

LAMBERT Philippe

2<sup>ème</sup> classe :

AMOUYAL Michel

### **PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine Générale**

CLARY Bernard  
DAVID Michel

### **PROFESSEUR ASSOCIE – Médecine**

BESSIS Didier - Dermato-vénérologie  
MEUNIER Isabelle – Ophtalmologie  
MULLER Laurent – Anesthésiologie-réanimation  
PERRIGAULT Pierre-François - Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence  
ROUBERTIE Agathe – Pédiatrie

## **Maîtres de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers**

### **MCU-PH Hors classe**

BOULLE Nathalie – Biologie cellulaire  
CACHEUX-RATABOUL Valère-Génétique  
CARRIERE Christian-Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière  
CHARACHON Sylvie-Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière  
FABBRO-PERAY Pascale-Epidémiologie, économie de la santé et prévention  
HILLAIRE-BUYS Dominique-Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie  
GIANSILY-BLAIZOT Muriel – Hématologie, transfusion  
PELLESTOR Franck-Cytologie et histologie  
PUJOL Joseph-Anatomie  
RICHARD Bruno-Thérapeutique ; addictologie  
RISPAIL Philippe-Parasitologie et mycologie  
SEGONDY Michel-Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

### **MCU-PH de 1<sup>re</sup> classe**

BADIOU Stéphanie-Biochimie et biologie moléculaire  
BOUDOUSQ Vincent-Biophysique et médecine nucléaire  
BOURGIER Céline-Cancérologie ; Radiothérapie  
BRET Caroline -Hématologie biologique  
COSSEE Mireille-Génétique Moléculaire  
GABELLE DELOUSTAL Audrey-Neurologie  
GIRARDET-BESSIS Anne-Biochimie et biologie moléculaire  
LAVIGNE Géraldine-Hématologie ; transfusion  
LESAGE François-Xavier – Médecine et santé au travail  
MATHIEU Olivier-Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie  
MENJOT de CHAMPFLEUR Nicolas-Neuroradiologie  
MOUZAT Kévin-Biochimie et biologie moléculaire  
PANABIERES Catherine-Biologie cellulaire  
PHILIBERT Pascal-Biologie et médecine du développement et de la reproduction  
RAVEL Christophe - Parasitologie et mycologie  
SCHUSTER-BECK Iris-Physiologie  
STERKERS Yvon-Parasitologie et mycologie  
TUAILLON Edouard-Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière  
YACHOUH Jacques-Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

### **MCU-PH de 2<sup>ème</sup> classe**

BERTRAND Martin-Anatomie  
DE JONG Audrey – Anesthésie-réanimation  
DU THANH Aurélie-Dermato-vénéréologie  
GALANAUD Jean Philippe-Médecine Vasculaire  
GOUZI Farès-Physiologie  
HERRERO Astrid – Chirurgie générale  
JEZIORSKI Éric-Pédiatrie  
KUSTER Nils-Biochimie et biologie moléculaire  
MAKINSON Alain-Maladies infectieuses, Maladies tropicales  
MURA Thibault-Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication  
OLIE Emilie-Psychiatrie d'adultes ; addictologie  
PANTEL Alix – Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière  
PERS Yves-Marie – Thérapeutique, addictologie  
SABLEWSKI Vanessa – Anatomie et cytologie pathologiques  
THEVENIN-RENE Céline-Immunologie

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - Médecine Générale**

### **Maîtres de conférence de 1<sup>ère</sup> classe**

COSTA David

### **Maîtres de conférence de 2<sup>ème</sup> classe**

FOLCO-LOGNOS Béatrice

OUDE-ENGBERINK Agnès

## **MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES - Médecine Générale**

GARCIA Marc

MILLION Elodie

PAVAGEAU Sylvain

REBOUL Marie-Catherine

SERAYET Philippe

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

### **Maîtres de Conférences hors classe**

BADIA Eric - Sciences biologiques fondamentales et cliniques

### **Maîtres de Conférences de classe normale**

BECAMEL Carine - Neurosciences

BERNEX Florence - Physiologie

CHAUMONT-DUBEL Séverine - Sciences du médicament et des autres produits de santé

CHAZAL Nathalie - Biologie cellulaire

DELABY Constance - Biochimie et biologie moléculaire

GUGLIELMI Laurence - Sciences biologiques fondamentales et cliniques

HENRY Laurent - Sciences biologiques fondamentales et cliniques

LADRET Véronique - Mathématiques appliquées et applications des mathématiques

LAINÉ Sébastien - Sciences du Médicament et autres produits de santé

LE GALLIC Lionel - Sciences du médicament et autres produits de santé

LOZZA Catherine - Sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques

MAIMOUN Laurent - Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

MOREAUX Jérôme - Science biologiques, fondamentales et cliniques

MORITZ-GASSER Sylvie - Neurosciences

MOUTOT Gilles - Philosophie

PASSERIEUX Emilie - Physiologie

RAMIREZ Jean-Marie - Histologie

TAULAN Magali - Biologie Cellulaire

*PRATICIENS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES*

CLAIRE DAIEN-Rhumatologie

BASTIDE Sophie-Epidémiologie, économie de la santé et prévention

GATINOIS Vincent-Histologie, embryologie et cytogénétique

PINETON DE CHAMBRUN Guillaume-Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

SOUCHE François-Régis – Chirurgie générale

TORRE Antoine-Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale

## Remerciements

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
OBJECTIFS et HYPOTHESES.....	7
MATERIELS ET METHODES .....	8
Population.....	8
Analyse des expectorations .....	10
Rhéologie .....	10
Cytologie.....	10
ADN total.....	11
Protéines totales .....	11
Mucines.....	11
Activité $\alpha$ -amylase .....	12
Bactériologie.....	12
Ethique.....	12
Statistiques.....	13
Déroulement de l'étude .....	14
RESULTATS.....	14
Caractéristiques de la population.....	14
Distribution de la rhéologie des expectorations dans les différentes populations.....	15
Cytologies des expectorations .....	18
ADN.....	18
L'activité $\alpha$ -amylase .....	18
Protéines totales.....	19
Spectrométrie de masse .....	19
Bactériologie.....	22
Contributeurs biologiques à la rhéologie des expectorations .....	22
Exacerbations et Etat stable.....	24
Déterminants cliniques de la rhéologie des expectorations.....	24
DISCUSSION .....	25
CONCLUSION .....	32
REFERENCES .....	33

## INTRODUCTION

L'épithélium des voies aériennes est recouvert de mucus qui joue un rôle d'interface entre le poumon et l'environnement et participe à la fonction de barrière de celui-ci. Le mucus des voies aériennes est un gel dont les constituants sont 98% d'eau, 1% de protéines, parmi lesquelles on retrouve essentiellement les mucines et des protéines de l'immunité innée, puis des ions et des débris divers [1]. Le modèle classique décrivant son organisation le représente en deux couches superposées de compositions différentes. La couche inférieure est appelée couche « péri-ciliaire », elle s'étale en effet du pôle apical des cellules épithéliales jusqu'à l'extrémité des cils [2]. Elle possède une force osmotique plus importante que la couche supérieure, et de ce fait est suffisamment hydratée pour permettre le mouvement ciliaire [3]. Le mucus est produit par les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire et par les glandes sous-muqueuses. Les mucines sont les protéines majoritaires du mucus, elles sont de grand poids moléculaire et également fortement glycosylées. Elles forment par leur organisation le squelette protéique du mucus. Actuellement, on en dénombre 21 dans l'organisme, codées par les gènes de la famille *MUC*. La séquence protéique des mucines comprend une partie centrale riche en résidus proline, thréonine et sérine, qui est le site préférentiel de la glycosylation, et des extrémités N-terminale et C-terminale riches en cystéines [4], permettant l'acquisition de la structure tertiaire de la protéine et la formation de polymère. Les mucines sont de deux types, les mucines sécrétées que l'on retrouve dans la lumière bronchique et les mucines membranaires, qui possèdent de larges domaines extra-membranaires et qui constituent ainsi les protéines de la couche péri-ciliaire. Les principales mucines sécrétées dans les voies aériennes sont MUC5AC et MUC5B. Les glandes sous muqueuses produisent seulement MUC5B et les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire produisent les deux mucines [5].

Dans les maladies chroniques des voies aériennes, l'épithélium respiratoire et le mucus sont sujets à des variations de constitution et de volume [3]. Concernant les modifications de l'épithélium, il a été montré une hyperplasie des cellules caliciformes dans l'asthme [6], chez les fumeurs avec ou sans trouble ventilatoire obstructif [7], dans la mucoviscidose [8] et dans la dilatation de bronche non mucoviscidosique [9]. Dans l'asthme, une simple bronchoconstriction peut également induire une hyperplasie des cellules à mucus [10] alors qu'elle est souvent considérée comme une conséquence de l'inflammation [11].

Une hypersécrétion de mucines est également retrouvée dans certaines de ces pathologies, notamment la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) [12] et l'asthme [13]. Le mucus des patients avec une mucoviscidose est aussi déshydraté. Ces altérations ne sont pas dénuées de conséquences dans ces pathologies. En effet, les histologies de poumons de patients décédés d'asthme aigu grave retrouvent des bouchons muqueux dans les lumières bronchiques [14], et dans le même sens, sur les histologies de réduction volumique d'emphysème chez les BPCO, la présence de bouchon muqueux est significativement liée à la mortalité [15].

Les voies impliquées dans l'hyperproduction de mucus sont partiellement connues, et font intervenir une activation de l'Epithelium Growth Factor Receptor (EGFR) [16] par divers stimulants, l'action de l'Interleukine 13 (IL-13) [17], et des neutrophiles [18]. Le facteur de transcription SPDEF (SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor) est indispensable [9]. Finalement, le réseau moléculaire impliqué dans la sécrétion des mucines est partiellement élucidé, mais il y a encore des zones d'ombre car tous les mécanismes ne sont pas nécessairement homogènes, par exemple chez le fumeur [19].

Dans la pratique clinique actuelle, malgré l'importance du mucus dans les pathologies bronchiques chroniques, nous n'avons pas d'outil destiné à l'analyser en routine. On s'intéresse principalement aux symptômes et notamment à la bronchite chronique, définie par

la présence de toux et d'expectorations quotidiennes pendant au moins trois mois sur deux années consécutives.

Celle-ci n'est pas prédictive d'un diagnostic, car peu spécifique, mais représente plutôt un trait phénotypique, associé dans plusieurs maladies chroniques des voies aériennes à un déclin fonctionnel accéléré [20], un plus grand nombre d'exacerbations [21], une diminution de la qualité de vie et même une mortalité plus élevée [22].

Le lien entre symptôme et mucus n'est pourtant pas si simple. Ainsi, le score obtenu au CASA-Q (Cough And Sputum Assessment Questionnaire), questionnaire validé sur la toux et les expectorations [23], n'est pas lié aux anomalies de l'épithélium dans l'asthme et plus précisément à la présence d'une hyperplasie des cellules à mucus [24].

Aussi, quand on compare la concentration en mucines dans les expectorations induites de sujets sains asymptomatiques et de fumeurs avec « bronchite chronique », on obtient une différence globale significative mais cependant un très large chevauchement des valeurs dans les deux groupes [25].

Pour ce qui est de la couleur des expectorations, utilisée dans les critères d'Anthonisen [26], plusieurs auteurs ont décrit une association entre purulence et positivité des cultures ou charge bactérienne [27], ainsi que purulence et neutrophilie des expectorations [28]. Cependant, dans une étude plus récente la couleur des expectorations pour des cultures bactériennes positives avait une bonne sensibilité, mais avec une spécificité très faible, d'environ 15%, et une valeur prédictive positive de seulement 41,6% à 56,6% [29]. De plus, l'évaluation de la couleur des expectorations par le médecin ou par le patient, en comparaison à un nuancier standardisé, n'est pas précise [30].

Dans une optique de création de nouveaux outils pour intégrer le mucus dans l'évaluation et la prise en charge des patients, la rhéologie du mucus adaptée à la clinique se développe.

La rhéologie est l'étude du comportement d'un matériau en réponse à une contrainte ou à une déformation. Les principales variables étudiées en rhéologie sont l'élasticité, ou la capacité à retrouver sa forme initiale après déformation, et la viscosité, ou résistance à l'écoulement d'un matériau. Le mucus se comporte comme un gel visco-élastique et possède donc ces deux composantes de manière plus ou moins marquées selon le temps d'analyse et les forces appliquées. A faible contrainte ou déformation, son état physique est plus celui d'un gel élastique et pour des plus fortes déformations ou contraintes, il devient plus celui d'un liquide visqueux. Le rhéomètre est l'outil permettant de caractériser ce comportement. Il existe plusieurs types de rhéomètres selon leur géométrie (principalement deux surfaces ou géométries planes ou bien une surface en cône et une surface plane) et le type de déformation appliquée. Le rhéomètre peut soit appliquer une déformation et enregistrer la réponse en contrainte du matériau ou bien appliquer une contrainte et mesurer la réponse en déformation. La déformation la plus classiquement utilisée pour l'étude du mucus est un cisaillement oscillant. Différentes variables d'intérêt sont relevées lors des analyses rhéologiques :

Le module complexe  $G^*$  est le rapport entre la déformation  $\gamma$  et la contrainte  $\sigma$  à un instant  $t$ .

$$G^*(t) = \gamma(t)/\sigma(t)$$

$G^*$  peut être décomposée en deux modules, le module élastique  $G'$  et le module visqueux  $G''$  selon la formule  $G^* = G' + iG''$ .

Le décalage de phase entre la déformation et la contrainte est appelé  $\delta$ .

On peut exprimer  $G'$  et  $G''$  en fonction de  $G^*$  et de  $\delta$  selon ces formules :

$$G' = G^* \cdot \cos(\delta) \text{ et } G'' = G^* \cdot \sin(\delta)$$

On voit ainsi que le ratio de ces deux modules  $G''/G'$  est égal à  $\tan(\delta)$  et correspond au facteur d'amortissement ou facteur de perte. Il représente la capacité de la matière à dissiper l'énergie en chaleur. Quand  $\tan(\delta)$  est faible, cela traduit un comportement élastique marqué.

A l'inverse, quand  $\tan(\delta)$  est élevé, cela traduit un comportement visqueux marqué. Ce

changement de comportement se déroule pour une certaine contrainte ou déformation seuil  $\tau(c)$  ou  $\sigma(c)$ , et  $\gamma(c)$ .

La fréquence d'oscillation influence les variables mesurées. Il est d'usage d'utiliser une fréquence de 1Hz pour relever la valeur des modules dans une zone appelée domaine viscoélastique linéaire dans laquelle le module élastique reste stable en fonction de la contrainte.

Les connaissances acquises sur la rhéologie du mucus sont issues de travaux sur du mucus endobronchique, récolté lors de cultures d'épithéliums, reconstitué avec des mucines purifiées ou des expectorations. Il a été montré que de nombreux constituants physiologiques du mucus pourraient être à l'origine des variations en rhéologie dans les états pathologiques, mais aussi chez le sujet sain. Il semble ainsi que la quantité de protéines et plus particulièrement de mucines, de lipides, d'ADN et d'ion, influencent l'élasticité, la viscosité et la transportabilité de particules dans le mucus [31]. L'organisation du réseau de mucines et son interaction avec différentes protéines influence également la rhéologie [32]. Il est assez difficile de conclure de ces différentes études, quel composant principal détermine les modifications de rhéologie dans la pathologie.

De nombreux auteurs se sont intéressés à la rhéologie des expectorations, majoritairement dans la mucoviscidose. Selon différentes techniques rhéologiques, il a pu être montré que l'élasticité et la viscosité des expectorations augmente significativement lors d'une exacerbation par rapport à un état de base [33] et que la mise en place d'un traitement en cas d'exacerbation réduit significativement le module élastique [34].

L'évaluation de prélèvements dans différentes pathologies chroniques des voies aériennes produit des résultats intéressants : entre la mucoviscidose, la BPCO et les patients sains, l'analyse d'expectorations spontanées ou induites par des nébulisations de sérum physiologique chez les témoins, ne montre pas de différence entre les paramètres rhéologiques

des expectorations quand on compare des prélèvements de même aspect macroscopiques [34]. De même il n'y a pas de différence significative de rhéologie entre les expectorations d'enfants atteints de mucoviscidose et de dyskinésie ciliaire [35].

Concernant les variables biologiques, une participation de l'activité neutrophile élastase (NE) a été retrouvée comme corrélée significativement avec l'élasticité des expectorations dans la mucoviscidose [34]. De même, une élévation de l'oxydation en lien avec l'activité myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles est liée à l'élasticité [36]. Quand les expectorations sont soumises à une dégradation à température ambiante, la diminution de concentration des mucines MUC5B et MUC5AC est très significativement liée à la diminution d'élasticité des prélèvements. La présence de souches de *Pseudomonas aeruginosa* de type mucoïde entraîne une élasticité plus importante dans les bronchectasies non mucoviscidosiques [37], et cela est corrélé à des données in vitro démontrant le rôle du *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde dans la formation d'un biofilm plus élastique et la réduction significative de la clairance muco-ciliaire en réponse [38]. Enfin la présence d'une plus grande quantité d'ADN qui forme un réseau superposé au réseau de mucines dans les expectorations mucoviscidosiques est également évoquée comme jouant un rôle dans l'augmentation de l'élasticité de celles-ci et des traitements par Rh-DNAse basés sur ces observations sont capables de diminuer l'élasticité des sécrétions [39].

## **OBJECTIFS et HYPOTHESES**

Ainsi l'objectif de notre étude était d'évaluer les rangs de variation de la rhéologie d'expectorations spontanées dans différentes maladies chroniques des voies aériennes en confrontant la rhéologie aux caractéristiques individuelles des patients.

Nous désirions également déterminer la contribution relative des différents composants de l'expectoration à ses propriétés rhéologiques.

Nous avons émis l'hypothèse que les propriétés viscoélastiques du mucus dépendent de la variation de ses composants. Par exemple, si l'on suppose que ce sont les mucines qui jouent le plus grand rôle dans l'élasticité, nous nous attendons à trouver une concentration plus importante de MUC5AC et/ou de MUC5B dans les mucus les plus élastiques, c'est-à-dire avec une mesure de  $G'$  plus élevée.

# MATERIELS ET METHODES

## Population

Nous avons mené cette étude, de manière prospective, entre mai et aout 2019, dans le service des maladies respiratoires du CHU Arnaud de Villeneuve, à Montpellier. Nous avons inclus les patients âgés de 18 ans et plus, connus pour avoir une maladie chronique des voies aériennes, incluant l'asthme, la BPCO et les dilatations de bronches hors mucoviscidose, qui se présentaient en consultation ou qui étaient hospitalisés et qui pouvaient produire spontanément des expectorations.

Nous avons défini les groupes de patients comme tel :

Le groupe asthme (Groupe 1) comprenait des patients non fumeur ou avec une consommation tabagique de moins de 10 paquet-année, une histoire clinique compatible avec un asthme, un trouble ventilatoire obstructif (Volume Expiratoire Maximal Seconde (VEMS) / Capacité Vitale (CV) < Limite Inférieure de la Normale) réversible ou une variabilité significative du VEMS dans le temps, ou bien un test de provocation bronchique à la métacholine positif dans un contexte évocateur.

Les patients étaient considérés comme BPCO (Groupe 2) s'ils avaient un passé tabagique avec une consommation supérieure à 10 paquet-année, et un diagnostic posé de BPCO selon les critères GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)

Les patients avec des dilatations de bronches (DDB) non mucoviscidosiques (Groupe 3) devaient avoir une tomodensitométrie thoracique montrant des dilatations de bronches, sans diagnostic posé par le clinicien d'asthme ni de BPCO, et un test de la sueur ou une recherche de mutation du gène CFTR négatifs.

Nous n'avons pas constitué de groupe témoin du fait de l'absence d'expectoration spontanée dans cette population et de la volonté de comparer des expectorations obtenues selon les mêmes procédures.

Nous avons exclus tous les patients qui n'étaient pas capable de produire spontanément une expectoration, les patientes enceintes ou allaitantes, les patients avec une maladie néoplasique étendue, ceux qui avaient des troubles psychiatriques récents, qui consommaient des drogues illicites ou de l'alcool, ceux qui étaient en période d'exclusion déterminée par une étude précédente, sous sauvegarde de justice, tutelle ou curatelle, privé de liberté, et ceux pour lesquels il était impossible de donner des informations éclairées, qui ne lisaient pas ou ne comprenaient pas la langue française, ou qui étaient en situation d'urgence vitale.

Nous avons recueillis les expectorations sans intervention particulière, c'est-à-dire, sans drainage bronchique par un kinésithérapeute, ou induction de l'expectoration avec une nébulisation de sérum salé isotonique ou hypertonique.

Lors de l'inclusion, nous avons récupéré les caractéristiques cliniques des patients : l'histoire de la maladie respiratoire, la présence d'une exacerbation actuelle, les différentes comorbidités, les traitements, les scores des questionnaires de contrôles validés de routine (Asthma Control Questionnaire (ACQ), COPD Assessment Test (CAT)), le score du questionnaire CASA-Q, les résultats des épreuves fonctionnelles respiratoires et les données issues de la tomodensitométrie thoracique. Lorsque le scanner était disponible, nous avons calculé un score de mucus endobronchique en établissant la moyenne du nombre de bronches segmentaires avec présence de mucus sur l'ensemble des bronches segmentaires [11].

## Analyse des expectorations

Nous avons traité toutes les expectorations de manière identique. Moins de deux heures après leur émission par le patient, une analyse rhéologique, suivie d'une cytologie ont été réalisées et nous avons stocké le surnageant à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les analyses ultérieures.

## Rhéologie

Nous avons obtenus les données rhéologiques à l'aide du rhéomètre Rhéomuco<sup>®</sup> conçu pour l'utilisation clinique. C'est un rhéomètre oscillatoire avec deux géométries planes. Il impose une déformation de l'échantillon, par pas croissant, et mesure les réponses en contrainte. L'analyse se déroule à  $37^{\circ}\text{C}$ , et la fréquence des oscillations est de 1Hz. L'expectoration était préalablement homogénéisée à l'aide d'un vortex, à faible vitesse rotatoire, pendant une minute, afin de réduire l'hétérogénéité de celle-ci, sans en altérer la structure. Les variables recueillies après l'analyse étaient le module complexe  $G^*$ , le facteur d'amortissement  $\tan\delta$ , les modules  $G'$  (élastique) et  $G''$  (visqueux) dans le domaine visco-élastique linéaire, ainsi que la contrainte critique  $\tau_c$  et la déformation critique  $\gamma_c$ . L'échantillon étant physiquement dénaturé après l'analyse rhéologique complète, nous n'avons pas réalisé plusieurs mesures itératives sur la même expectoration.

## Cytologie

Après l'analyse rhéologique, l'échantillon était retiré de la surface de travail du rhéomètre, traitée avec quatre fois son volume d'une solution de Dithiotréitol (DTT). Le protocole de réalisation de la cytologie suivait les recommandations de l'European Respiratory Society [40] et un compte cellulaire total, avec un taux de viabilité, un pourcentage de cellules squameuses ainsi qu'un compte cellulaire différentiel après coloration sur 400 cellules non squameuses étaient collectés. Nous avons classés les cytologies en fonction du pourcentage de

neutrophiles et d'éosinophiles selon la classification établie pour les expectorations induites [41] en cytologie « neutrophilique », « éosinophilique », « mixte » et « paucigranulocytaire ».

Le surnageant était stocké à -80°C pour des analyses ultérieures.

### **ADN total**

Pour quantifier l'ADN total, le surnageant était décongelé à température ambiante et un kit d'extraction d'ADN (QIAamp DNA Micro Kit) était utilisé. La quantification se faisait ensuite par spectrophotométrie (NanoDroponeC).

### **Protéines totales**

Nous avons mesuré la quantité de protéines totales dans le surnageant des expectorations par méthode colorimétrique avec un kit RC DC. (BIO-RAD®) La lecture des absorbances a été réalisée à 690 nm avec l'instrument Thermo Scientific Multiskan™ FC.

### **Mucines**

Les concentrations des mucines d'intérêt MUC5AC et MUC5B ont été quantifiées par spectrométrie de masse. L'échantillon de surnageant décongelé progressivement au -20°C puis en air ambiant était dissout dans du TFE (Trifluoroéthylène) et réduit par du DTT, puis alkylé par ajout d'iodoacétamide. Il était ensuite ajouté de la trypsine pour effectuer la digestion enzymatique des protéines. La réaction enzymatique était stoppée par ajout d'acide formique. L'échantillon était nettoyé en colonne de chromatographie (C18) puis introduit dans le spectromètre. Les peptides marqués de MUC5B et de MUC5AC pour la quantification ont été testés avant le début des expérimentations. Le volume adéquat de surnageant nécessaire pour l'analyse était déterminé selon la concentration en protéines totales dans le surnageant mesuré préalablement par colorimétrie avec une quantité optimale initiale de 60µg.

Les séquences peptidiques d'intérêt ont été choisies en référence à des études antérieures sur le dosage de MUC5B et MU5CAC par spectrométrie de masse [25].

### **Activité $\alpha$ -amylase**

L'activité  $\alpha$ -amylase a été mesurée sur le surnageant des expectorations avec un kit colorimétrique (Abcam® ab102523), afin d'avoir un élément supplémentaire pour estimer la contamination salivaire de l'échantillon. Les mesures d'absorbance ont été réalisées à 405 nm, toutes les deux minutes pendant une heure à l'aide du lecteur TECAN Infinite® 200 PRO. Une unité d'activité  $\alpha$ -amylase est une quantité d'amylase qui génère 1  $\mu$ mol de nitrophenol par minute en clivant le substrat de la réaction (ethylidene-pNP-G7).

### **Bactériologie**

Une analyse cyto-bactériologique de routine a été réalisée en parallèle, sur une portion du même échantillon ou bien sur un autre échantillon prélevé le même jour.

### **Ethique**

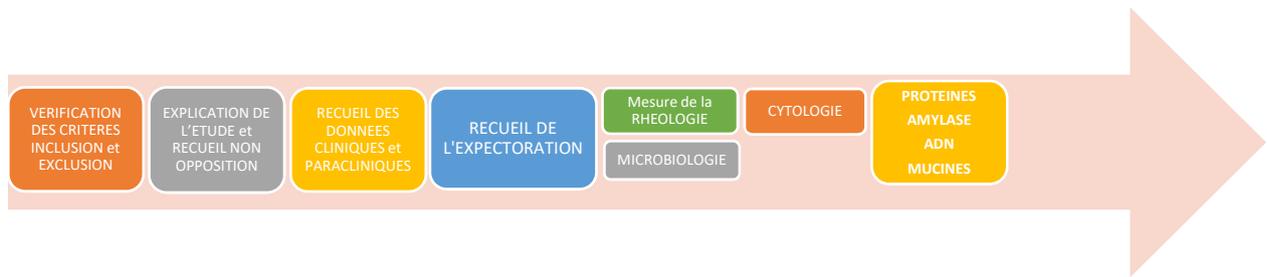
Conformément aux catégories de recherches définies par la loi n°2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine dite « loi Jardé » mise en application par le décret n°2016-1537 du 16 novembre 2016 ; cette étude prospective non interventionnelle rentrait dans la catégorie 3 des recherches impliquant la personne humaine. En effet, aucun acte ni aucune information recueillie n'a été ajouté dans cette recherche par rapport à la prise en charge habituelle. Ainsi, la non opposition du patient a été obtenue avant analyse des données. Les données traitées et soumises à la non opposition des patients étaient celles habituellement collectées lors des consultations ou des hospitalisations. Elles ont été recueillies et analysées en conformité avec la méthodologie de référence MR003 de la CNIL.

Le projet a été approuvé par l'institutionnal Review Board du CHU de Montpellier (2019\_IRB-MTP\_09-10 et inscrit sur Clinical Trials avec l'identifiant RECHMPL19\_0430.

## Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R-Studio, Version 1.1.463, (RStudio, Inc). Pour la comparaison des différentes populations, des analyses de variances ont été réalisées pour les variables paramétriques, des tests de Kruskal-Wallis pour les variables non paramétriques, et des tests exacts de Fisher pour les variables qualitatives. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées soit de façon intégrées avec la méthode post-hoc, soit avec des tests de Mann –Whitney ou de permutation pour les variables quantitatives non paramétriques et de Fisher pour les variables qualitatives, avec un ajustement des p-values par la méthode de Bonferroni-Holm. Pour rechercher les facteurs biologiques indépendants associés aux variables rhéologiques, une analyse en composante principale (ACP) normée à deux dimensions, intégrant l'ensemble des variables rhéologiques et biologiques a été réalisée. Puis nous avons réalisé une analyse multivariable par régression linéaire multiple pour déterminer les facteurs biologiques indépendants associés aux variables rhéologiques choisies. Le choix des prédicteurs a tenu compte des résultats de l'ACP. Nous avons sélectionné le meilleur modèle parmi les modèles stepwise, forward et backward selon l'AIC. Tous les tests étaient bilatéraux, et une p-value inférieure ou égale à 0,05 était considérée comme indiquant une signifiante statistique.

## Déroulement de l'étude



## RESULTATS

### Caractéristiques de la population

De mai à Aout 2019, 48 patients ont été inclus dans l'étude, dont 24 souffrant de DDB, 14 de BPCO et 10 asthmatiques. La moitié (52%) était en exacerbation. La prévalence de la « bronchite chronique » était élevée dans notre population (90%), et les patients étaient majoritairement exacerbateurs fréquents (70%). Les patients des trois groupes différaient sur la fonction respiratoire avec un trouble ventilatoire obstructif plus marqué dans le groupe BPCO : VEMS de  $28.42 \% \pm 6.75\%$ , contre  $70.11\% \pm 18.1$  et  $60\% \pm 25.16$  dans les groupes asthme et DDB respectivement. Le rapport VEMS/CVF était de  $0.37 \pm 0.12$  contre  $0.64 \pm 0.15$  et  $0.67$  (0.59-0.7). Les patients asthmatiques avaient les plus fortes prévalences de rhinosinusite, de polypose naso-sinusienne et d'allergie. Les BPCO avaient la plus faible prévalence de bronchite chronique. Concernant les caractéristiques tomodensitométriques, nos résultats sont cohérents, puisque la prévalence de dilatations de bronches était significativement plus élevée chez les patients DDB et l'emphysème chez les patients BPCO. Un épaississement des parois bronchiques était présent dans les trois groupes de manière comparable. L'ensemble des caractéristiques des patients est présenté dans la Table 1.

## Distribution de la rhéologie des expectorations dans les différentes populations.

Comme cela était attendu, nous avons retrouvé un profil visco-élastique des expectorations avec un comportement de gel élastique prédominant. Les valeurs de « tangentes delta » inférieures à 1 (elles étaient en moyenne de 0,3 (0,22-0,36)) témoignent en effet d'un module élastique supérieur au module visqueux. Les modules  $G'$ ,  $G''$  et  $G^*$  étaient significativement plus élevés chez les asthmatiques que dans les deux autres groupes. La déformation critique et la contrainte critique n'étaient pas significativement différentes entre les trois groupes de patient. Les valeurs des variables rhéologiques sont présentées dans la Table 2.

Table 1 : Données démographiques, fonctionnelles et morphologiques de la population totale et des différents groupes de patients.

Variables	Population entière N= 48	Groupe Asthme N=10	Groupe BPCO N=14	Groupe DDB N=24	<i>p-value</i>	<i>p-value</i> Asthme vs BPCO	<i>p-value</i> BPCO vs DDB	<i>p-value</i> Asthme vs DDB
Age	64 (51.25-71)	58.2±11.56	65.14±6.44	64 (34-71)	NS			
Sexe (% femme)	25 (52.08)	8 (80)	4 (28.57)	13 (54.17)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
IMC	22.22 (20.02-25.62)	26.55±7.13	22.05±6.81	22.22 (20.02-25.05)	NS			
Fonction respiratoire								
VEMS (% théorique)	46.5 (33-73.5)	70.11±18.1	28.42±6.75	60±25.16	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NS
CVF (% théorique)	74.07±21.35	89.22±15.52	65.45±17.48	73.1±22.76	NS			
VEMS/CVF	0.56±0.19	0.64±0.15	0.37±0.12	0.67 (0.59-0.7)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NS
VR (% théorique)	168.5 (131.5-214.47)		237.43±60.45	141.06±45.77			p<0,05	
Etat stable vs exacerbation (% stable)	25 (52.08)	5 (50)	5 (35.71)	15 (62.5)	NS			
Bronchite chronique (%)	43 (89.58)	10 (100)	9 (64.29)	24 (100)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NS
Rhinosinusite (%)	25 (55.56)	9 (90)	1 (9.09)	15 (62.5)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Polypose naso-sinusienne (%)	4 (8.7)	4 (44.44)	0 (0)	0 (0)	p<0,05	p<0,05	NS	p<0,05
Allergie (%)	11 (23.4)	6 (66.67)	1 (7.14)	4 (16.67)	p<0,05	p<0,05	NS	p<0,05
Reflux Gastro-œsophagien (%)	18 (37.5)	5 (50)	5 (35.71)	8 (33.33)	NS			
Nombre exacerbation dans l'année	2 (1-4)	2.44±1.67	3±2.77	2 (1.5-3.5)	NS			
≥ 2 exacerbations dans l'année (%)	32 (69.57)	6 (66.67)	9 (64.29)	17 (73.91)	NS			
Antécédent d'hospitalisation (%)	31 (67.39)	6 (60)	10 (76.92)	15 (65.22)	NS			
Antécédent d'hospitalisation en réanimation (%)	14 (29.17)	3 (30)	5 (35.71)	6 (25)				
Tabagisme (%)	24 (51.06)	4 (40)	13 (92.86)	7 (30.43)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NS
dont actif (%)	6 (25)	2 (50)	4 (31)	0 (0)				
Consommation (Paquet-année)	32.59±18.32	24.5±19.69	45.29±9.69	23.17±18.55	p<0,05	NS	p>0,05	NS
Eosinophilie sanguine (cellules/mm <sup>3</sup> )	210 (140-260)	230 (100-250)	200.54±79.15	190 (160-310)	NS			
Eosinophilie sanguine > 300 /mm <sup>3</sup> (%)	18 (43.9)	5 (55.56)	5 (35.71)	8 (44.44)	NS			
Colonisation à <i>P. aeruginosa</i> (%)	22 (51.16)	3 (37.5)	4 (30.77)	15 (68.18)	NS			
Colonisation à <i>S. aureus</i> (%)	6 (14.63)	0 (0)	0 (0)	6 (30)	p<0,05	NS	p<0,05	p<0,05
Tomodensitométrie								
Dilatation de bronches (%)	31 (67.39)	5 (50)	4 (28.57)	22 (100)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Emphysème (%)	16 (34.78)	1 (10)	14 (100)	1 (4.55)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NS
Syndrome bronchique (%)	40 (86.96)	8 (80)	13 (92.86)	19 (86.36)	p<0,05	NS	NS	NS
CASA-Q sputum symptom	1.59±0.9	1.29±0.53	1.86±0.99	1.59±0.99	NS			
CASA-Q sputum impact	2.29±0.97	2.16±0.66	2.56±0.96	2.19±1.13	NS			
CASA-Q cough symptom	1.3 (0.7-2)	1.3 (0.92-1.3)	1.8±1.04	1 (0.6-1.3)	NS			
CASA-Q cough impact	2.16±0.97	1.88±0.71	2.4±0.8	2.16±1.19	NS			

Les données sont présentées comme telles : médiane (Q1 - Q3), moyenne +/- écart type ou effectif(%). VEMS : volume expiré maximal seconde, CVF : capacité vitale forcée, ACQ : asthma control questionnaire, CAT COPD assesment test, CASA-Q : cough and sputum assesment questionnaire, IMC : indice de masse corporelle. Les comparaisons ont été effectuées par des analyses de variances pour les variables quantitatives paramétriques, par des tests de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives non paramétriques et par des tests exacts de Fisher pour les variables qualitatives. Les p-values des comparaisons deux à deux sont soit issues d'analyses post-hoc (Tuckey), soit ajustées par la méthode de Bonferonni-Holm après comparaison deux à deux par les tests de Fisher ou de Mann-Whitney. Les p-values sont considérées significatives quand inférieures à 0,05.

Table 2 : Rhéologie et Biologie des expectorations.

Variables	Population entière N=48	Groupe Asthme N=10	Groupe BPCO N=14	Groupe DDB N=24	<i>p-value</i>	<i>p-value</i> asthme vs BPCO	<i>p-value</i> BPCO vs DDB	<i>p-value</i> Asthme vs DDB
G'	3.69 (1.48-7.65)	12.62±10.06	3.01 (1.58-4.22)	2.8 (0.97-7.03)	p<0,05	p<0,05	NS	p<0,05
G''	1.04 (0.59-1.71)	2.64±1.74	0.85 (0.67-1.31)	0.87 (0.42-1.57)	p<0,05	p<0,05	NS	p<0,05
G*	3.84 (1.59-7.89)	12.92±10.18	3.15 (1.7-4.45)	2.96 (1.06-7.19)	p<0,05	p<0,05	NS	p<0,05
tanδ	0.3 (0.22-0.36)	0.24±0.06	0.34±0.16	0.32 (0.24-0.47)	p<0,05	NS	NS	NS
γc	20.78±10.3	15.93±8.58	23.25±11.56	21.41±9.88	NS			
τc	33.8 (14.18-60.67)	63.08±62.86	24.1 (12.18-66.62)	36.19±21.4	NS			
Compte cellulaire total (.10 <sup>6</sup> /g)	1.56 (0.71-4.01)	1.68±1.21	0.42 (0.1-1.05)	3.66 (1.95-6.92)	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Classification cytologique de l'expectoration								
Neutrophiliques	29 (63.04)	4 (44.44)	4 (30.77)	21 (87.5)				
Eosinophiliques	0 (0)							
Mixte	6 (13.04)	2 (22.22)	3 (23.08)	1 (4.17)				
Paucigranulocytaire	2 (4.35)	1 (11.11)	0 (0)	1 (4.17)				
Squameux	9 (19.57)	2 (22.22)	6 (46.15)	1 (4.17)				
%Neutrophiles	89.62 (82.75-93.75)	85 (77.94-88.74)	79.19±15.69	92 (89.06-96.1)	p<0,05	NS	NS	NS
nombre neutrophiles	193.83 (85.96-405.15)	140.53±114.66	84.44 (59-97.92)	320.99 (177.13-675.81)	p<0,05	NS	p<0,05	p<0,05
nombre éosinophiles	0.06 (0-2.61)	0.99 (0-2.21)	0.32 (0-3.26)	0 (0-1.78)	NS			
%Eosinophiles	0.12 (0-0.56)	1.57±1.85	0.25 (0-3.12)	0 (0-0.25)	NS			
%Squameuses	1.25 (0.25-7.88)	1.25 (0.75-2.75)	50.38 (2.25-90)	0.38 (0-2.12)	p<0,05	NS	p<0,05	NS
ADN (ng/μL)	317.95 (31.62-836.8)	104.75 (21.85-419.22)	30.1 (17.1-161.48)	916.4 (386.28-1293)	p<0,05	NS	p<0,05	NS
Protéines totales (mg/mL)	20.36 (11.96-30.71)	21.96±12.42	18.32±8.53	23.57 (11.96-35.72)	NS			
Activité α-amylase mU/mL	842.96 (462.8-2601.27)	1755.37±1223.82	804.59 (290.96-3794.99)	810.46 (524.12-1845.5)	NS			

Les données sont présentées comme telles : médiane (Q1-Q3), moyenne +/- écart type ou effectif(%). G' : Module élastique, G'' : Module visqueux, G\* : module complexe, tan δ : coefficient d'amortissement ou facteur de perte, τc : contrainte critique, γc : déformation critique. Les comparaisons ont été effectuées par des analyses de variances pour les variables quantitatives paramétriques, par des tests de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives non paramétriques. Les p-values des comparaisons deux à deux sont soit issues d'analyses post-hoc (Tuckey), soit ajustées par la méthode de Bonferonni-Holm après comparaison deux à deux par le test de Mann-Whitney. Les p-values sont considérées significatives quand inférieures à 0,05.

## Cytologies des expectorations

20% des expectorations étaient contaminées par de la salive, contamination identifiée par la présence de plus de 20% de cellules squameuses à la cytologie, pour une majorité dans le groupe de patients BPCO. Les cytologies étaient principalement neutrophiliques (63% d'entre elles), aucune n'était éosinophilique, 13% étaient mixtes et 4% paucigranulocytiques. La médiane des viabilités cellulaires était de 100%, et la qualité des lames satisfaisante, estimée à 8/10 sur une échelle visuelle analogique. Le compte cellulaire total médian était de  $1,56 \cdot 10^6$  ( $0,71 \cdot 10^6$ - $4,01 \cdot 10^6$ ) cellules/g, avec en moyenne 90% de neutrophiles et 0,15% d'éosinophiles. Le compte cellulaire était significativement différent dans les trois groupes de patients, plus élevé chez les patients DDB :  $3,66 \cdot 10^6$  cellules/g ( $1,95 \cdot 10^6$ - $6,92 \cdot 10^6$ ) versus  $1,68 \cdot 10^6$  cellules/g (+/-  $1,21 \cdot 10^6$ ) chez les asthmatiques et  $0,42 \cdot 10^6$  cellules/g ( $0,1 \cdot 10^6$ - $1,05 \cdot 10^6$ ) chez les BPCO.

## ADN

La spectrophotométrie des doubles brins d'ADN a retrouvé des ratios A260/A280 satisfaisant, en moyenne à 1,8, témoignant d'une extraction adéquate de l'ADN présent dans les surnageants d'expectorations. La concentration médiane d'ADN retrouvée dans les expectorations était de 317,95 ng/ $\mu$ L (31,62-836,8). Il y avait une différence significative sur l'ensemble des trois populations, avec une concentration plus importante chez les patients DDB par rapport aux deux autres groupes, respectivement de 916,4 ng/ $\mu$ L (386,28-1293) versus 104,75 ng/ $\mu$ L (21,85-419,22) et 30,1ng/ $\mu$ L(17,1-161,48).

## L'activité $\alpha$ -amylase

L'activité amylase au sein des surnageants d'expectoration était de 842,96 mU/mL(462,8-2601,27) sans différence observée entre les trois groupes de patients.

## Protéines totales

La concentration totale en protéine dans les surnageants était de 20,36 mg/mL (11,96-30,71), elle ne variait pas significativement entre les trois groupes.

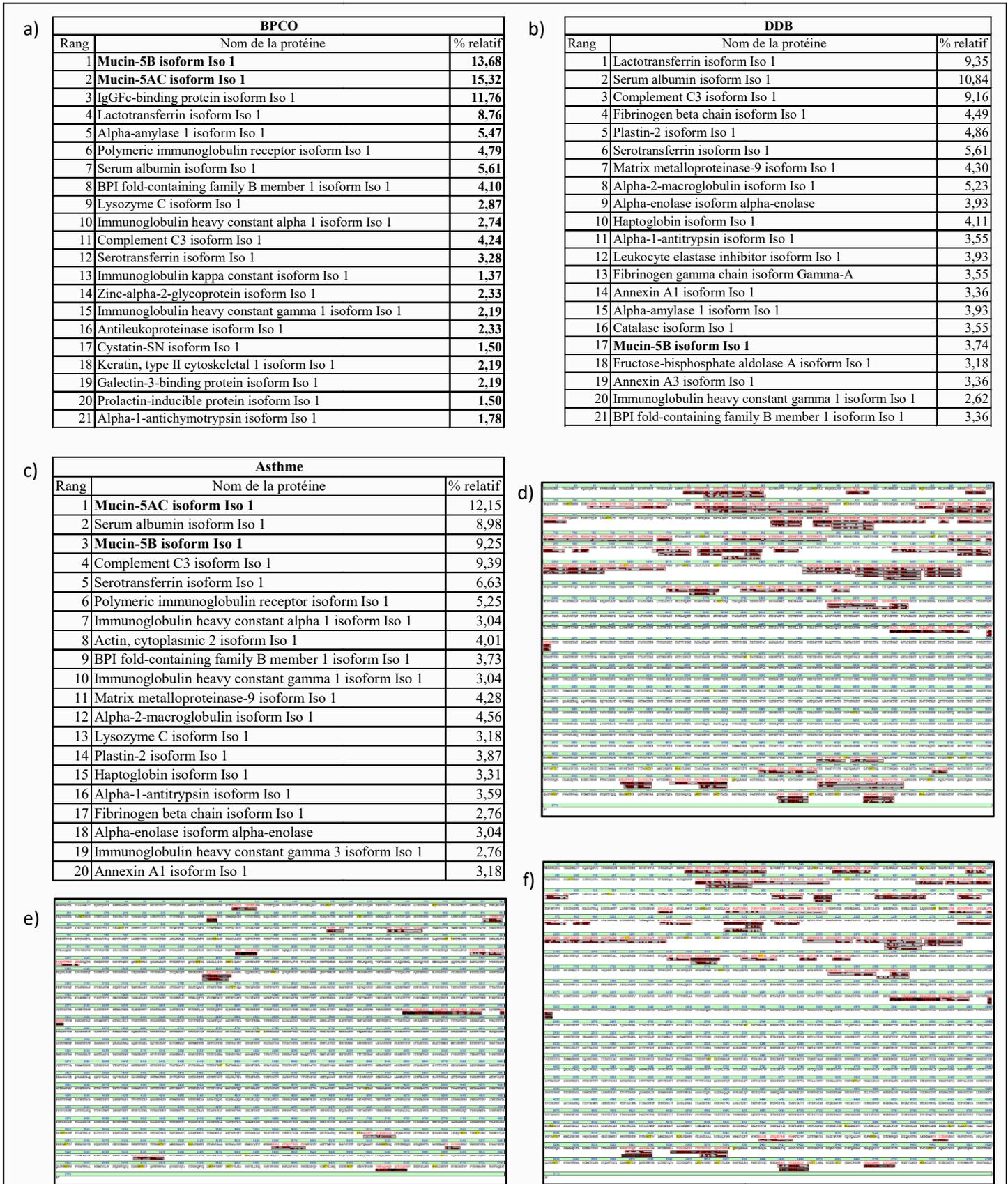
## Spectrométrie de masse

Nous avons réalisé la mise au point pour la mesure des concentrations des mucines principales MUC5AC et MUC5B par spectrométrie de masse. Dans nos résultats initiaux, qui avaient pour but de rechercher le volume idéal de surnageant d'expectorations nécessaire pour une évaluation optimale en spectrométrie, nous avons observé que sur les 9 échantillons tests, les concentrations en mucines n'étaient mesurables que dans 5 surnageants et extrêmement faibles dans les 4 restants, qui s'avéraient être les surnageants de patients DDB. Afin d'approfondir ces résultats, nous avons réalisé une analyse protéomique complète par spectrométrie de masse de haute résolution et nous avons ainsi identifié les principales protéines du surnageant de patients BPCO ainsi que ceux des DDB. Nous avons observé une différence de profil protéomique des expectorations entre les deux groupes : MUC5AC et MUC5B sont les deux protéines les plus abondantes dans les surnageants de BPCO alors qu'elles sont au-delà de la 10<sup>ème</sup> position dans les surnageants de DDB. (Figure 1)

Nous avons également réalisé un séquençage complet des protéines MUC5B et MUC5AC dans les différents échantillons, pour déterminer si l'absence de détection des mucines provenait d'un clivage de la protéine dans la région N-terminale, région où se situent les deux séquences peptidiques choisies pour l'analyse en spectrométrie de masse. Le séquençage a retrouvé une distribution symétrique des peptides détectés sur la protéine entre les deux groupes, avec les régions N-terminale et C-terminale couvertes en partie et une large région centrale non couverte, probablement du fait d'un mauvais accès de cette région à la digestion en raison de la glycosylation abondante des résidus proline thréonine et sérine centraux.

Cependant, l'abondance relative des peptides détectés était bien plus faible dans les échantillons DDB. L'ensemble de ces résultats semblent indiquer une diminution des concentrations en mucines chez les dilatés des bronches par rapports aux deux autres populations, nous confirmerons ces résultats lors de l'analyse de l'ensemble des échantillons prévue mi-septembre. De plus afin de vérifier la robustesse de ces résultats, nous avons décidé de rajouter un peptide de reconnaissance dans la partie C-Terminale des deux protéines.

Figure 1 : Protéomique des surnageants d'expectorations de patients BPCO (n=3), DDB (n=4) et asthmatiques (n =2) et séquençage de MUC5B dans les trois populations



a à c : Protéines communes les plus abondantes dans les surnageants de 3 patients BPCO (a), 4 patients DDB (b) et 2 patients asthmatiques (c). d à f : séquençage de MUC5B par spectrométrie haut débit dans les surnageants d'un patient BPCO (d), DDB (e) et asthmatique (f). On remarque que les peptides reconnus (en rouge) sont beaucoup plus rares chez le patient DDB comparé aux patients BPCO et asthmatique, mais que la répartition de ces peptides reste globalement la même sur la protéine avec une région N-terminale (début en haut à gauche) et une région C-terminale (finie en bas à droite) couvertes, en défaveur de l'hypothèse d'un clivage de MUC5B chez les DDB.

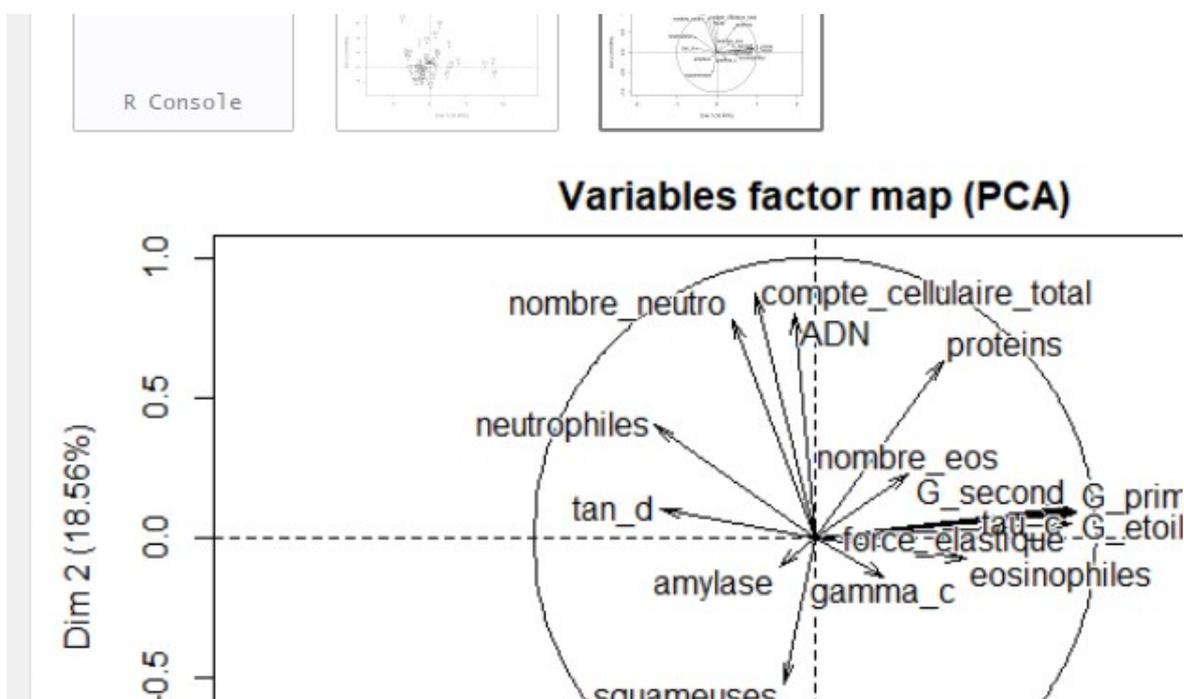
## Bactériologie

Sur les 48 prélèvements, 31 examens cyto bactériologiques d'expectoration ont été réalisées. Cinq expectorations présentaient une flore bactérienne en quantité non significative. Trois, une flore salivaire polymorphe en quantité significative. Les principaux pathogènes retrouvés sur les 23 restantes étaient essentiellement *Pseudomonas aeruginosa* (43,5% des expectorations), *Haemophilus influenzae* (22% des expectorations), *Moraxella catarrhalis* et *Staphylococcus aureus* (13% des expectorations).

## Contributeurs biologiques à la rhéologie des expectorations

L'analyse en composante principale (Figure 2) réalisée avec l'ensemble des données rhéologiques et biologiques mesurées sur les expectorations montre une convergence des variables rhéologiques  $G'$ ,  $G''$ ,  $G^*$ ,  $\tau_c$  et  $\gamma_c$  du fait de leur proximité.  $\tan \delta$  est orienté à l'opposé sur l'ACP et serait inversement corrélé avec les autres variables. La quantité d'ADN est proche du compte cellulaire total et le pourcentage d'éosinophiles s'approche des variables rhéologiques.

Figure 2 : Analyse en composante principale de la rhéologie et biologie des expectorations



Les régressions linéaires multiples de G' et de Tau c en fonction des variables biologiques sont présentées dans les tables 3 et 4 respectivement. Les deux modèles sont très significatifs et établissent que la variance de certaines des variables biologiques expliquent la majeure partie de la variance de la rhéologie des expectorations. On remarque que le pourcentage d'éosinophiles est, pour les deux grandeurs rhéologiques, la variable avec le plus fort coefficient de corrélation. La concentration en protéine est très significativement corrélée positivement avec les deux grandeurs. Le pourcentage de neutrophiles et de cellules squameuses sont corrélés négativement avec les grandeurs rhéologiques et le compte cellulaire total négativement avec tau c mais de manière non significative.

Table 3 : Régression linéaire multiple : G'			
Variables	Coefficients	Ecart type	Pr (> t )
Neutrophiles (%)	-0,35867	0,04789	1,31.10 <sup>-8</sup>
Éosinophiles (%)	0,92197	0,47836	0,062578
Protéines (mg/mL)	0,24542	0,05750	0,000156
Squameuses (%)	-0,17209	0,04652	0,000783
<b>R<sup>2</sup> ajusté</b>	0,687	<b>P-value</b>	9,289.10 <sup>-9</sup>

Table 4 : Régression linéaire multiple : Tau c			
Variables	Coefficients	Ecart type	Pr (> t )
Neutrophiles (%)	-1.4095	0.2939	0,0000415
Éosinophiles (%)	14.6734	2.9448	0,0000245
Protéines (mg/mL)	1.6769	0.3627	0,0000674
Squameuses (%)	-0.9865	0.2768	0.00124
Compte cellulaire total	-1.3444	0.9042	0.14748
<b>R<sup>2</sup> ajusté</b>	0.7328	<b>P-value</b>	8.571.10 <sup>-9</sup>

## Exacerbation et Etat stable

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative d'aucune des variables rhéologiques entre les patients à l'état stable et ceux en exacerbation dans notre population. Il n'y avait pas non plus de différence dans la concentration totale d'ADN, la concentration en protéines, le compte cellulaire total entre ces deux groupes.

## Déterminants cliniques de la rhéologie des expectorations

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation significative entre la rhéologie des expectorations et les scores obtenus aux différentes sous-parties du CASA-Q dans la population totale, de l'ACQ chez les asthmatiques et du CAT chez les BPCO. Nous avons retrouvé une corrélation très faible bien que significative entre le module élastique  $G'$  et le VEMS. ( $R^2 = 0,14$ ,  $p = 0,01$ ), une corrélation inverse très faible entre le score obtenu à la tomographie thoracique de mucus endobronchique et le tau-c ( $R^2 = 0,08$ ,  $p = 0,03$ ). Aucune des autres variables cliniques, fonctionnelles ou morphologiques n'est corrélée aux données rhéologiques.

Afin de comparer les variables qualitatives nous avons séparé les données rhéologiques des variables  $G'$  et Tau c en deux groupes comprenant les deux inter-quartiles extrêmes,  $G'$ High vs  $G'$ Low et Tau c High vs Tau c Low et comparé ces deux populations à la prévalence des symptômes cliniques, sans différence significative.

## DISCUSSION

Dans notre étude, nous avons observé que la concentration totale en protéine et le pourcentage d'éosinophiles contribuaient significativement à l'élasticité et à la contrainte critique des expectorations, deux variables rhéologiques majeures utilisées dans la description du comportement visco-élastique du mucus. Le pourcentage de neutrophiles dans l'expectoration était ici corrélé négativement à l'élasticité et à la contrainte critique. Nous n'avons retrouvé aucun lien entre les variables rhéologiques des expectorations et les symptômes rapportés par les patients, ainsi que les scores des questionnaires validés sur les expectorations. Nous avons seulement retrouvé une corrélation négative et très faible entre les modules élastique et visqueux et le VEMS ainsi que la CVF. De même il existe dans notre population une corrélation faible entre le score tomодensitométrique de mucus endobronchique et la contrainte critique. Les paramètres rhéologiques n'étaient pas différents entre sujet en exacerbation et à l'état stable pour l'ensemble de la population et nous n'avons pas pu réaliser les comparaisons par état au sein des trois populations par manque d'effectif. Nous avons pu décrire des profils protéomiques différents entre asthme, BPCO et DDB et confirmé que non seulement les DDB n'ont pas un profil classique, mais en plus avec des mucines quasi indétectables ceci n'étant pas lié à un problème technique ou un clivage de la protéine. Pour finir, nous avons retrouvé une faible corrélation entre activité  $\alpha$ -amylase et nombre de cellules squameuses dans nos échantillons.

Le lien entre éosinophilie des expectorations et rhéologie n'a actuellement pas été décrit clairement et pourrait être expliqué par différents éléments issus de la littérature. Le premier argument physiopathologique réside dans la mort cellulaire des éosinophiles et la génération d'extracellular traps (ETosis). Les éosinophiles, sous l'influence de radicaux libres de l'oxygène, relarguent des réseaux extracellulaires mêlant granules cytoplasmiques, débris d'enveloppe nucléaire et de membrane cellulaire autour d'un squelette de chromatine. Ces

réseaux sont différents en structure de ceux produits par les neutrophiles dans le même contexte, avec des fibres de chromatines plus épaisses qui pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'élasticité et de la viscosité des expectorations [42]. Une autre origine possible à cette modification de rhéologie est la présence de cristaux au sein du mucus éosinophilique. Les cristaux de Charcot-Leyden, conséquences de la cristallisation de la galectine-10 sont d'ailleurs très corrélés à la présence d'eosinophil extracellular traps [43]. Ils sont capables d'interagir avec l'épithélium respiratoire en stimulant une inflammation de type Th2. [44]. La présence de cristaux au sein du mucus influence vraisemblablement la rhéologie de celui-ci. Il ne nous a pas été possible de quantifier ces cristaux, du fait du protocole de cytologie utilisant un agent réducteur dégradant la structure même de ceux-ci.

Concernant les protéines et la rhéologie, nous savons que dans la mucoviscidose, la concentration des mucines, les protéines les plus abondantes du mucus, est corrélée à l'élasticité [45]. Mais la concentration d'autres protéines moins abondantes comme les protéines de la famille « Trefoil Factor Family », ont aussi été rapportées aux paramètres rhéologiques [46]. Nos résultats partiels, montrent que la quantité totale de protéines influence la rhéologie, en augmentant l'élasticité mais également la contrainte critique. Dans les analyses à venir, nous pourrions évaluer l'impact de la concentration des deux mucines principales (MUC5AC et MUC5B) sur la rhéologie et distinguer ainsi l'effet des protéines totales et des mucines.

Pour ce qui est des neutrophiles, nous n'avons pas retrouvé de comparaison de la cellularité des expectorations avec la rhéologie. Cependant plusieurs études ont émis des hypothèses quand à l'interaction des neutrophiles avec les mucines et donc leur influence sur la rhéologie. Dans le sens de nos résultats, on peut citer Innes AL en 2009 [47], qui décrit que l'action de l'élastase du neutrophile sur les mucines, entraîne une diminution en taille et en nombre de celles-ci et une chute de l'élasticité du mucus. D'autres auteurs rapportent à l'inverse que

l'élastase du neutrophile ne change pas le poids moléculaire et la quantité de mucines lorsque l'on utilise d'autres techniques pour quantifier celles-ci [48]. De plus il a été montré que la myéloperoxydase produite par les neutrophiles, pouvait augmenter l'élasticité du mucus, par un mécanisme d'oxydation des mucines entraînant une augmentation des liaisons disulfides [36].

Le fait que le pourcentage de cellules squameuses soit inversement corrélé à l'élasticité et à la contrainte critique est tout à fait logique étant donné les caractéristiques rhéologiques de la salive comparées à celles du mucus.

Dans le passé, d'autres études ont décrit des liens entre fonction respiratoire et rhéologie, comme Jonathan Ma en 2018 [33] dans un suivi longitudinal de mucoviscidose qui trouve une corrélation négative pour chaque patient entre le VEMS et le module élastique mesuré par un rhéomètre cône/plan et par pas de fréquence. En 2018, Nettle [49], dans une population de BPCO, met en relation le VEMS et la loi de puissance  $m$  entre le module élastique  $G'$  et la creep compliance (compliance de fluage) des expectorations et retrouve une corrélation significative avec un  $R^2$  satisfaisant. Nous soulignons ici que les méthodes de mesures rhéologiques ne sont pas celles utilisées dans notre étude, et que cela peut expliquer les différences observées.

Pour ce qui est de la relation symptômes et rhéologie des expectorations, aucune étude n'a rapporté des résultats sur ces variables.

L'absence de différence de la rhéologie entre patient à l'état stable et en exacerbation dans notre étude ne permet pas de conclure qu'une telle différence n'existe réellement pas. Nous avons observé des différences de rhéologie entre les trois groupes de patients, et les effectifs étaient trop limités. Cela rend difficile une comparaison adéquate de cette variable dans notre

population. Dans la mucoviscidose, la littérature décrit une différence significative entre ces deux états [33].

Nos résultats préliminaires sur les concentrations de mucines dans les expectorations de sujets dilatés des bronches sont originaux, car il n'y a pas de résultats issus de mesures par spectrométrie de masse disponible dans la littérature pour cette population. Il avait été décrit une hyperplasie des cellules à mucus [9], mais ceci ne va pas dans notre sens. Cette donnée est controversée. Il a aussi été rapporté un effondrement des concentrations de MUC5B [50] plus conformément à nos résultats. Mais la méthode immuno-enzymatique utilisée dans ce dernier article pour la quantification est l'objet de biais majeurs de détection de cette protéine [48]. Il avait été évoqué un clivage de la mucine par cette souche de *Pseudomonas* rendant l'analyse complexe et dépendante des peptides traceurs utilisés, mais nous avons pu montrer que ce n'était pas le cas dans notre étude.

Nous ne pouvons pas conclure tant que nous n'avons pas confirmé ces analyses sur l'ensemble de notre population avec la spectrométrie de masse.

Notre étude présente des forces et des limites. Il s'agit d'une étude translationnelle. En effet, notre approche, en plus de répondre à une question physiopathologique en déterminant les contributeurs biologiques prédominants de la rhéologie des expectorations en pathologie respiratoire, a aussi permis de tester le lien entre clinique, fonction respiratoire, tomodensitométrie et rhéologie des expectorations. Nous avons ainsi pu intégrer la rhéologie dans le prisme par lequel nous observons les patients atteints de maladie chronique des voies aériennes. Avec cette étude, nous avons essayé d'apporter des réponses issues des sciences fondamentales à un problème clinique du quotidien. Nous allons poursuivre ces explorations par une seconde étude, dans le cadre d'un PHRC interrégional, pour évaluer l'utilisation de la mesure de la rhéologie des expectorations comme outil de prise en charge de la BPCO, avec un critère de jugement clinique pertinent dans cette maladie. Les données acquises lors de

notre étude princeps serviront pour déterminer le seuil rhéologique justifiant d'un traitement de l'hypersécrétion de mucus (en l'occurrence par de l'azithromycine, traitement validé dans cette population dans le sous groupe des patients exacerbateurs fréquents).

Pour finir, lors de la mise en place de notre étude, il a été nécessaire de répondre à de multiples questions concernant l'utilisation du rhéomètre. Nous avons déterminé le volume minimal nécessaire à l'utilisation non biaisée des résultats rhéologiques, l'impact des techniques d'homogénéisation et les conséquences de l'hétérogénéité des expectorations sur la reproductibilité des mesures. Nous avons également évalué l'impact de la congélation sur la rhéologie du mucus afin d'établir s'il était possible d'utiliser les échantillons congelés dans de futures études. Toutes ces données participent à la meilleure connaissance de l'utilisation du rhéomètre, à l'évaluation de la qualité des mesures testées et de la fiabilité des expériences réalisées.

Les faiblesses de cette étude découlent en grande partie de la difficulté de recrutement des sujets du fait de l'utilisation d'expectorations spontanées et de la réalisation printano-estivale de l'étude. Il est certain que les faibles effectifs entre les différents groupes peuvent avoir influencé les corrélations retrouvées, notamment les résultats sur l'asthme et les éosinophiles.

Notre expérience avec les expectorations spontanées nous a convaincu d'utiliser la technique de l'expectoration induite par des nébulisations de sérum salé, à l'origine développée dans l'asthme avec des tonicités croissantes. Pour les futures études sur la rhéologie dans l'asthme et la BPCO cela nous assurerait un recrutement correct des patients. L'induction des expectorations semble ne pas induire de différence significative dans la rhéologie des expectorations (données non publiées du fabricant). Des protocoles d'induction sont validés dans la population BPCO, avec du sérum salé de concentration fixe et une bonne tolérance de l'induction [48].

Notre étude ouvre des perspectives dans le domaine de la rhéologie des expectorations. Les explorations que nous avons réalisées permettent de cibler les contributeurs biologiques d'intérêt pour des études à venir. Les corrélations retrouvées ici ne sont bien sûr pas des liens de causalité. Cependant, il est maintenant possible d'approfondir le lien entre les déterminants retrouvés et la rhéologie avec les données physiopathologiques issues de la littérature afin de tester l'implication de chacune des variables.

Une autre issue à ce travail est l'acquisition de données primordiales de rhéologie des expectorations dans ces différentes pathologies respiratoires pour une utilisation clinique. Nous avons démontré que la rhéologie est bien corrélée aux constituants du mucus et qu'elle n'est par contre liée à aucune exploration fonctionnelle, de scanner ou aucun symptôme clinique majeur. Ainsi, son utilisation, en plus des différents outils actuels dans le suivi des patients atteints de maladie des bronches, pourrait apporter une caractéristique supplémentaire facile à obtenir et servant de marqueur de substitution à la biologie du mucus. Il est maintenant nécessaire de compléter son évaluation par son utilisation directe en clinique dans le cadre de notre futur PHRC.

Ceci pourrait également avoir des conséquences thérapeutiques majeures. En effet, de nombreuses molécules ont été développées avec l'ambition d'être « muco-fluidifiante ». Selon les résultats présentés ici, il apparaît que cette stratégie essentiellement ciblée sur les mucines n'était pas forcément si bien fondée. Le BIBF qui bloquait l'EGFR avait d'ailleurs échoué. Selon nos données, une fois encore avec toutes les précautions qu'il faut avoir étant donné le faible nombre de sujet, cibler les neutrophiles ne sera peut être pas efficace pour réduire l'élasticité du mucus mais cela ne présage pas forcément d'un manque d'efficacité par ailleurs. Il n'y a pas à notre connaissance de données montrant une modification du mucus et plus précisément de la rhéologie de celui-ci après un traitement ciblé sur les éosinophiles.

Pour finir, les résultats préliminaires sur les mucines dans les dilatations des bronches soulignent l'origine bien différente des anomalies du mucus dans cette maladie en comparaison à la BPCO et à l'asthme et l'implication probables de protéines différentes des mucines dans la constitution des propriétés biophysiques du mucus.

## CONCLUSION

La rhéologie des expectorations dans les maladies chroniques des voies aériennes, et plus précisément, l'élasticité et la contrainte critique, sont corrélés à la concentration en protéine et au pourcentage en éosinophiles. La rhéologie n'est pas corrélée aux données cliniques, fonctionnelles respiratoires, tomodynamométriques ou aux symptômes des patients asthmatiques, BPCO et dilatés des bronches. Les sujets asthmatiques ont des expectorations plus élastiques et plus visqueuses que les sujets BPCO et dilatés des bronches. Ainsi, la rhéologie pourrait avoir une place à part dans la caractérisation des patients atteints de maladies chroniques des voies aériennes et servir d'indicateur de la composition du mucus.

## REFERENCES

1. Boucher RC. Muco-Obstructive Lung Diseases. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380: 1941–1953.
2. Kesimer M, Ehre C, Burns KA, Davis CW, Sheehan JK, Pickles RJ. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol* 2013; 6: 379–392.
3. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 2233–2247.
4. Thornton DJ, Sharpe C, Ridley C. Intracellular Processing of Human Secreted Polymeric Airway Mucins. *Ann Am Thorac Soc* 2018; 15: S154–S158.
5. Okuda K, Chen G, Subramani DB, Wolf M, Gilmore RC, Kato T, Radicioni G, Kesimer M, Chua M, Dang H, Livraghi-Butrico A, Ehre C, Doerschuk CM, Randell SH, Matsui H, Nagase T, O’Neal WK, Boucher RC. Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 199: 715–727.
6. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163: 517–523.
7. Innes AL, Woodruff PG, Ferrando RE, Donnelly S, Dolganov GM, Lazarus SC, Fahy JV. Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. *Chest* 2006; 130: 1102–1108.
8. Burgel P-R, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 2007; 62: 153–161.
9. Chen Z-G, Li Y-Y, Wang Z-N, Li M, Lim H-F, Zhou Y-Q, Cai L-M, Li Y-T, Yang L-F, Zhang T-T, Wang D-Y. Aberrant epithelial remodeling with impairment of cilia architecture in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Thorac Dis* 2018; 10: 1753–1764.
10. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, Holgate S, Davies DE, Howarth PH. Effect of Bronchoconstriction on Airway Remodeling in Asthma. *New England Journal of Medicine* 2011; 364: 2006–2015.
11. Dunican EM, Elicker BM, Gierada DS, Nagle SK, Schiebler ML, Newell JD, Raymond WW, Lachowicz-Scroggins ME, Di Maio S, Hoffman EA, Castro M, Fain SB, Jarjour NN, Israel E, Levy BD, Erzurum SC, Wenzel SE, Meyers DA, Bleecker ER, Phillips BR, Mauger DT, Gordon ED, Woodruff PG, Peters MC, Fahy JV. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *Journal of Clinical Investigation* 2018; 128: 997–1009.
12. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur. Respir. J.* 1995; 8: 1333–1338.

13. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem. J.* 2002; 361: 537–546.
14. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992; 101: 916–921.
15. Hogg JC, Chu FSF, Tan WC, Sin DD, Patel SA, Pare PD, Martinez FJ, Rogers RM, Make BJ, Criner GJ, Cherniack RM, Sharafkhaneh A, Luketich JD, Coxson HO, Elliott WM, Sciurba FC. Survival after Lung Volume Reduction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Insights from Small Airway Pathology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176: 454–459.
16. Burgel P-R, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* 2004; 59: 992–996.
17. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat. Med.* 2012; 18: 684–692.
18. Nadel JA, Takeyama K, Agustí C. Role of neutrophil elastase in hypersecretion in asthma. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 190–196.
19. Wang G, Xu Z, Wang R, Al-Hijji M, Salit J, Strulovici-Barel Y, Tilley AE, Mezey JG, Crystal RG. Genes associated with MUC5AC expression in small airway epithelium of human smokers and non-smokers. *BMC Medical Genomics* [Internet] 2012 [cited 2019 Sep 5]; 5 Available from: <http://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-5-21>.
20. Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; 153: 1530–1535.
21. Burgel P-R, Nesme-Meyer P, Chanez P, Caillaud D, Carré P, Perez T, Roche N, Initiatives Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) Scientific Committee. Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subjects. *Chest* 2009; 135: 975–982.
22. Lahousse L, Seys LJM, Joos GF, Franco OH, Stricker BH, Brusselle GG. Epidemiology and impact of chronic bronchitis in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 2017; 50.
23. Crawford B, Monz B, Hohlfeld J, Roche N, Rubin B, Magnussen H, Nivens C, Ghafouri M, McDonald J, Tetzlaff K. Development and validation of a cough and sputum assessment questionnaire. *Respiratory Medicine* 2008; 102: 1545–1555.
24. Alagha K, Bourdin A, Vernisse C, Garulli C, Tummino C, Charriot J, Vachier I, Suehs C, Chanez P, Gras D. Goblet cell hyperplasia as a feature of neutrophilic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2019; 49: 781–788.

25. Kesimer M, Ford AA, Ceppe A, Radicioni G, Cao R, Davis CW, Doerschuk CM, Alexis NE, Anderson WH, Henderson AG, Barr RG, Bleecker ER, Christenson SA, Cooper CB, Han MK, Hansel NN, Hastie AT, Hoffman EA, Kanner RE, Martinez F, Paine R, Woodruff PG, O'Neal WK, Boucher RC. Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377: 911–922.
26. Anthonisen NR. Antibiotic Therapy in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of Internal Medicine* 1987; 106: 196.
27. Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest* 2000; 117: 1638–1645.
28. Pabreja K, Gibson P, Lochrin AJ, Wood L, Baines KJ, Simpson JL. Sputum colour can identify patients with neutrophilic inflammation in asthma. *BMJ Open Respir Res* 2017; 4: e000236.
29. Miravittles M, Kruesmann F, Haverstock D, Perroncel R, Choudhri SH, Arvis P. Sputum colour and bacteria in chronic bronchitis exacerbations: a pooled analysis. *European Respiratory Journal* 2012; 39: 1354–1360.
30. Daniels JMA, de Graaff CS, Vlaspolter F, Sniijders D, Jansen HM, Boersma WG. Sputum colour reported by patients is not a reliable marker of the presence of bacteria in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16: 583–588.
31. Lai SK, Wang Y-Y, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 86–100.
32. Demouveau B, Gouyer V, Gottrand F, Narita T, Desseyn J-L. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Advances in Colloid and Interface Science* 2018; 252: 69–82.
33. Ma JT, Tang C, Kang L, Voynow JA, Rubin BK. Cystic Fibrosis Sputum Rheology Correlates With Both Acute and Longitudinal Changes in Lung Function. *Chest* 2018; 154: 370–377.
34. Serisier DJ, Carroll MP, Shute JK, Young SA. Macrorheology of cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease & normal sputum. *Respiratory Research* [Internet] 2009 [cited 2018 Aug 7]; 10 Available from: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-10-63>.
35. Bush A, Payne D, Pike S, Jenkins G, Henke MO, Rubin BK. Mucus properties in children with primary ciliary dyskinesia: comparison with cystic fibrosis. *Chest* 2006; 129: 118–123.
36. Yuan S, Hollinger M, Lachowicz-Scroggins ME, Kerr SC, Dunican EM, Daniel BM, Ghosh S, Erzurum SC, Willard B, Hazen SL, Huang X, Carrington SD, Oscarson S, Fahy JV. Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels. *Sci Transl Med* 2015; 7: 276ra27.
37. Alcaraz-Serrano V, Fernández-Barat L, Scioscia G, Llorens-Llacuna J, Gimeno-Santos E, Herrero-Cortina B, Vázquez N, Puig de la Bellacasa J, Gabarrús A, Amaro-Rodriguez

- R, Menéndez R, Torres A. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* alters sputum viscoelasticity in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Respir Med* 2019; 154: 40–46.
38. Gloag ES, German GK, Stoodley P, Wozniak DJ. Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Sci Rep* 2018; 8: 9691.
  39. Shah PL, Scott SF, Knight RA, Marriott C, Ranasinha C, Hodson ME. In vivo effects of recombinant human DNase I on sputum in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1996; 51: 119–125.
  40. Leader of the Working Group: A. Efthimiadis, A. Spanevello, Members of the Working Group: Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overveld F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *European Respiratory Journal* 2002; 20: 19S – 23s.
  41. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: A distinct clinical and pathologic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 119: 1043–1052.
  42. Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, Honda K, Ohta N, Yamamoto S, Takagi Y, Wada A, Weller PF. Eosinophil extracellular trap cell death–derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016; 137: 258–267.
  43. Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, Saito H, Honda K, Fukuchi M, Konno Y, Takeda M, Yamamoto Y, Hirokawa M, Fujieda S, Spencer LA, Weller PF. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood* 2018; 132: 2183–2187.
  44. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, Gevaert E, Aegerter H, Percier J-M, Deswarte K, Verschueren KHG, Dansercoer A, Gras D, Chanez P, Bachert C, Gonçalves A, Van Gorp H, De Haard H, Blanchetot C, Saunders M, Hammad H, Savvides SN, Lambrecht BN. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science* 2019; 364: eaaw4295.
  45. Horsley A, Rousseau K, Ridley C, Flight W, Jones A, Waigh TA, Thornton DJ. Reassessment of the importance of mucins in determining sputum properties in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2014; 13: 260–266.
  46. Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32: 519–527.
  47. Innes AL, Carrington SD, Thornton DJ, Kirkham S, Rousseau K, Dougherty RH, Raymond WW, Caughey GH, Muller SJ, Fahy JV. *Ex Vivo* Sputum Analysis Reveals Impairment of Protease-dependent Mucus Degradation by Plasma Proteins in Acute Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009; 180: 203–210.
  48. Henderson AG, Ehre C, Button B, Abdullah LH, Cai L-H, Leigh MW, DeMaria GC, Matsui H, Donaldson SH, Davis CW, Sheehan JK, Boucher RC, Kesimer M. Cystic

fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *Journal of Clinical Investigation* 2014; 124: 3047–3060.

49. Nettle CJ, Jenkins L, Curtis D, Badiei N, Lewis K, Williams PR, Daniels DR. Linear rheology as a potential monitoring tool for sputum in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Biorheology* 2017; : 1–14.
50. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, Fardon TC, Finch S, Mateus EF, Garcia-Bellmunt L, Castillo D, Vidal S, Sanchez-Reus F, Restrepo MI, Chalmers JD. Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis: Mucins in bronchiectasis. *Respirology* 2015; 20: 1082–1088.

## SERMENT

- *En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*
- *Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*
- *Admis (e) dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*
- *Respectueux (se) et reconnaissant (e) envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert (e) d'opprobre et méprisé (e) de mes confrères si j'y manque.*

## **Déterminants biologiques de la rhéologie des expectorations dans les maladies chroniques des voies aériennes**

**Mathilde VOLPATO**

**Travail réalisé sous la direction du Pr. Arnaud BOURDIN**

*Introduction.* Les variations de composition du mucus entraînent une modification de son comportement viscoélastique, qui peut être mesuré par analyse rhéologique. Il n'existe pas d'outil clinique ciblant le mucus malgré son importance dans les maladies chroniques des voies aériennes.

*Objectif.* Déterminer les contributeurs biologiques et/ou cliniques majeurs dans différentes maladies chroniques des voies aériennes qui participent à la rhéologie des expectorations en routine clinique.

*Matériels et Méthodes.* Nous avons recueilli les expectorations spontanées de patients atteints d'asthme, de BPCO et de dilatations de bronche non mucoviscidose (DDB), stable ou en exacerbation. Ces expectorations ont été soumises à une analyse rhéologique oscillatoire à 1Hz à déformation croissante. Le module élastique ( $G'$ ), le module visqueux ( $G''$ ) et la contrainte critique ( $\tau_c$ ) ont été mesurés. En parallèle, nous avons quantifié les principaux composants de ces expectorations : i) compte cellulaire total et différentiel, ii) quantité d'ADN par spectrophotométrie, iii) quantité de protéines totales par méthode colorimétrique, quantité des mucines MUC5AC et MUC5B par spectrométrie de masse et iv) activité  $\alpha$ -amylase. Une analyse bactériologique de routine a également été réalisée.

*Résultats.* Entre mai et août 2019, nous avons analysé 48 expectorations, 24 DDB, 14 BPCO et 10 asthmatiques. 50% des patients étaient en exacerbation et 20% des cytologies étaient contaminés par de la salive. Les concentrations en protéines totales et le pourcentage d'éosinophiles étaient très significativement liées aux variables rhéologiques dans un modèle de régression linéaire multiple. Nous n'avons pas retrouvé de différence rhéologique entre les prélèvements en exacerbation et à l'état stable. Nous avons remarqué que la rhéologie d'expectoration des asthmatiques est significativement différente des deux autres groupes aussi bien sur les paramètres de viscosité que d'élasticité.

*Conclusion.* La rhéologie des expectorations dans les maladies chroniques des voies aériennes est principalement déterminée par la concentration en protéine et le pourcentage d'éosinophiles. La rhéologie des expectorations d'asthmatiques est différente des autres pathologies.

Mots Clefs : Expectoration, Asthme, BPCO, Dilatation de bronche, Rhéologie