

L'asthme : une maladie de tout l'arbre aérien

I. Tillie-Leblond¹, R. Louis², A. Magnan³, M. Humbert⁴, J. de Blic⁵, P. Chanez⁶

¹ Service de Pneumologie et d'Immunolo-Allergologie, CHRU de Lille, Hôpital Albert Calmette, Lille, France.

² Service de Pneumo-Allergologie, CHU de Liège, CHU ND des Bruyères, Chênée, Belgique.

³ Institut du Thorax, CHRU de Nantes, Hôpital G & Laënnec, Inserm U 533, Nantes, France.

⁴ Service de Pneumologie, Hôpital Antoine Beclère, GHU Sud-APHP, UPRES EA 2705 IFR 13, Clamart, France.

⁵ Hôpital Necker, Enfants Malades, GHU Ouest, Paris, France.

⁶ Département des Maladies Respiratoires, AP-HM, CNRS UMR 6020, Université de la Méditerranée, Marseille, France.

Résumé

L'inflammation et les processus de remaniements structuraux des voies aériennes sont constamment observés dans l'asthme. Ils concernent l'ensemble de l'arbre bronchique y compris les voies aériennes distales. L'infiltrat par les cellules inflammatoires et les remaniements structuraux sont en général assez semblables à tous les étages des voies aériennes. Cependant, au cours de l'asthme sévère, de l'asthme nocturne et dans l'asthme mortel, l'infiltrat inflammatoire dans les voies aériennes distales est plus intense et implique des cellules ayant des critères d'activation plus grande. Au cours de l'asthme mortel, les voies aériennes distales sont le siège de remaniements structuraux intenses concernant le muscle lisse, l'épithélium bronchique et l'hypersécrétion de mucus qui s'associe à une obstruction des voies aériennes distales. Ainsi, l'atteinte histopathologique des voies aériennes distales contribue aux formes les plus sévères de l'asthme et devrait donc être ciblée par les traitements de l'asthme. Les méthodes non invasives actuelles qui reflètent l'inflammation ne permettent pas d'évaluer les voies aériennes distales.

Mots-clés : Voies aériennes distales ; inflammation ; modifications structurales ; asthme sévère ; biopsies.

Summary

Inflammation and remodelling are constant features of asthma. They are present throughout the whole bronchial tree, even in the small airways (less than 2 mm). The inflammatory cell infiltrate and structural changes are, in most cases, identical. However, in severe asthma, nocturnal asthma and fatal asthma, the cellular infiltrate in the distal airways is more intense and the number of activated cells is increased. In fatal asthma there are major alterations in the distal airways involving the smooth muscle and the bronchial epithelium, and mucus hypersecretion leading to distal airway plugging. Thus the histopathological changes in the distal airways contribute to the most severe stages of asthma and should be targeted by treatment. Currently the non-invasive tools that reflect inflammation are unable to assess these changes in the distal airways.

Keywords : Distal airways ; inflammation ; remodelling ; severe asthma ; biopsies.

Introduction

L'asthme est une maladie chronique des bronches fréquente aux phénotypes multiples dont l'histoire naturelle est encore mal connue [1]. L'hyperréactivité bronchique et l'inflammation bronchique sont les deux caractéristiques le plus souvent retrouvées. La physiopathologie moderne associe à cette inflammation, des remaniements structuraux de l'ensemble des voies aériennes du nez jusqu'aux alvéoles [2, 3]. La notion de petite voie aérienne, de distalité de l'arbre aérien repose sur l'importance fonctionnelle potentielle de cette zone pulmonaire silencieuse. Son exploration est difficile, les données fonctionnelles respiratoires ne sont pas aisées à interpréter, mais l'imagerie permet l'accès à des nouvelles connaissances [4-6]. Dans cette revue, nous envisagerons les méthodes d'investigations pour étudier les aspects anatomopathologiques permettant de considérer l'asthme comme une affection atteignant l'ensemble de l'arbre aérien. Les études concernant les autres méthodes d'évaluation des voies aériennes distales, qu'il s'agisse des explorations fonctionnelles respiratoires, des marqueurs moléculaires ou des explorations scanographiques feront l'objet d'articles spécifiques de la série et ne seront donc pas abordées ici.

- L'asthme se caractérise par une hyperréactivité bronchique, une inflammation bronchique et des remaniements structuraux de l'ensemble des voies aériennes.

Définition et mise en place embryologique et anatomique

Les voies aériennes de l'adulte comprennent 24 générations de bronches en incluant la trachée. Anatomiquement, les voies aériennes distales incluent les voies aériennes à compter de leur 8^e division, jusqu'aux bronchioles terminales et « transitionnelles », avant les bronchioles respiratoires. Leur nombre augmente avec la puissance de leur génération, et ainsi la somme de leur surface dépasse les 50 à 100 cm². Elles sont les dernières à présenter une musculature pariétale lisse. Il faut retenir la définition histologique où les voies aériennes distales correspondent aux bronches non cartilagineuses (bronches membraneuses). Elles participent peu aux résistances totales des voies aériennes physiologiquement (environ 10 % des résistances totales), mais c'est le site principal d'obstruction et donc d'augmentation des résistances des voies aériennes constatée dans l'asthme. Chez l'adulte, le critère le plus souvent retenu est un diamètre inférieur à 2 mm. Cette définition est difficilement applicable à l'enfant.

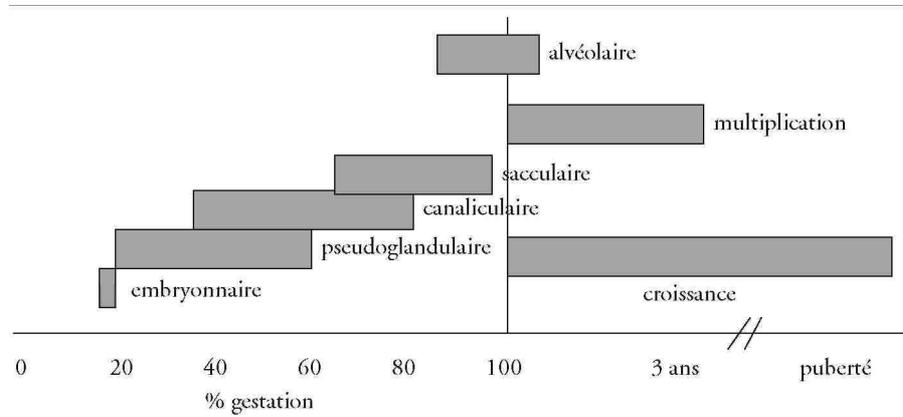
La plupart des structures de la bronche est retrouvée à tous les étages des voies aériennes [7]. Le muscle est présent dès le 53^e jour de gestation même si les bandes musculaires sont bien constituées et visibles au niveau des voies aériennes proximales alors qu'on retrouve des cellules musculaires éparses dans les bronches distales [8]. Le muscle lisse bronchique est mature à la naissance [9]. Des fibres musculaires sont aussi présentes au niveau de l'ouverture des canaux alvéolaires. Elles occupent 3 % de la paroi des bronches segmentaires et sous-segmentaires chez l'enfant et l'adulte. Ainsi, la répartition et l'organisation des fibres musculaires lisses varient selon la taille des voies aériennes, si bien que la contraction des fibres musculaires lisses a des conséquences variables selon la taille des bronches. Au niveau des voies aériennes de petite et de moyenne taille, la contraction musculaire lisse aboutit à la réduction à la fois du diamètre et de la longueur des bronches. La bronchoconstriction conduit ainsi à une accentuation de la rigidité de toutes les voies aériennes. Il existe aussi des différences de répartition des fibres musculaires lisses bronchiques entre l'adulte et l'enfant et selon le sexe. Ainsi au niveau des voies aériennes distales, 20 % de la paroi bronchique est occupée par le muscle bronchique chez l'adulte et seulement 10 % chez l'enfant. Il existe des différences liées au sexe dans le développement des voies aériennes proximales et distales, ce qui pourrait expliquer la plus grande fréquence de l'asthme chez le garçon et l'asthme de début plus tardif chez la fille [10, 11].

Certaines agressions précoces peuvent aboutir à une augmentation de la quantité de muscle lisse (ventilation néonatale, bronchiolites infectieuses). On sait maintenant que cette hypertrophie musculaire lisse est relativement spécifique de l'asthme et potentiellement liée à une biogenèse mitochondriale excessive [12]. Une angiogenèse excessive (formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants) et un remodelage microvasculaire (altérations des artérioles, capillaires et veinules aboutissant en général à un élargissement des structures existantes sans formation de nouveaux vaisseaux) sont présents au décours des poussées inflammatoires chroniques. L'angiogenèse et le remodelage microvasculaire induisent non seulement une augmentation du nombre et de la taille des vaisseaux dans la muqueuse bronchique, mais aussi la formation de vaisseaux anormaux caractérisés entre autres par des phénomènes d'exsudation et d'adhésion des leucocytes circulants. La croissance pulmonaire est rapide au cours des premières années de vie. Les modifications de calibre qui accompagnent la croissance pulmonaire au cours des deux premières années de vie ont des conséquences directes sur les débits. Les altérations structurales des voies aériennes (épaississement des parois et/ou obstruction endoluminale) peuvent ainsi avoir un impact physiopathologique (altération des débits en relation avec la croissance) plus important chez un jeune enfant qu'à une période plus tardive de la vie [13] (*fig. 1*).

- Les voies aériennes distales incluent les voies aériennes à compter de leur 8^e division.
- Sur le plan histologique, les voies aériennes distales correspondent aux bronches non cartilagineuses.
- Dans l'asthme, l'augmentation des résistances bronchiques prédomine sur ces voies aériennes distales.
- Le muscle lisse bronchique est mature à la naissance.
- La contraction musculaire lisse aboutit à la réduction du diamètre et de la longueur des petites et moyennes bronches.
- 20 % de la paroi bronchique est occupée par le muscle bronchique chez l'adulte, contre 10 % chez l'enfant.
- L'angiogenèse et le remodelage microvasculaire caractéristiques de l'inflammation bronchique chronique augmentent le nombre et la taille des vaisseaux dans la muqueuse bronchique, et font apparaître des vaisseaux anormaux caractérisés entre autres par des

- phénomènes d'exsudation et d'adhésion des leucocytes circulants.
- Les altérations structurales des voies aériennes ont un impact physiopathologique plus marqué chez l'enfant jeune.

Fig. 1 Développement pulmonaire.



Données anatomopathologiques

L'inflammation et les modifications structurales des petites voies aériennes sont examinées par l'analyse du tissu bronchique ou pulmonaire soit à partir de biopsies transbronchiques obtenues par voie endoscopique, soit sur des pièces chirurgicales ou autopsiques. Les médiateurs évalués sur le liquide broncho-alvéolaire peuvent être considérés, sous réserve d'une technique fiable (bon retour, absence de piégeage du fait d'un bronchospasme), comme le reflet de l'inflammation et des modifications immunes du poumon profond, et des structures bronchiolaires [14].

Les pièces autopsiques

Ces études permettent une analyse de l'ensemble des tissus bronchiques et pulmonaires, mais les phénotypes des patients ne sont pas toujours bien caractérisés au plan clinique et fonctionnel respiratoire [15]. L'asthme aigu grave mortel est une situation clinique très particulière qui s'accompagne d'anomalies histopathologiques spécifiques ne reflétant pas toujours la situation chronique. Le rôle du tabagisme est rarement correctement apprécié, ce qui rend les conclusions de ces études difficilement généralisables.

Étude de l'inflammation

La comparaison de l'inflammation observée dans les voies aériennes proximales et distales a été réalisée dans l'asthme mortel grâce à l'étude de pièces autopsiques dans plusieurs études. Un travail trouve la présence accrue d'éosinophiles et de lymphocytes sur les bronches proximales, et distales, chez les patients décédés d'asthme [16]. Une étude a comparé l'inflammation chez des patients décédés d'asthme et chez des patients atteints d'asthme léger à modéré décédés d'une autre cause. Un nombre supérieur d'éosinophiles a été retrouvé dans les voies aériennes de gros calibre chez les asthmatiques décédés d'asthme aigu, alors que l'inflammation éosinophilique était présente dans les voies aériennes de petit calibre chez l'asthmatique sans différence entre les deux groupes [17]. Un autre travail a comparé les données autopsiques chez trois groupes de sujets : des patients ayant un asthme sévère évoluant de longue date et décédés d'asthme, des patients ayant un asthme léger, décédés d'une autre cause et des sujets sans pathologie respiratoire et décédés brutalement [18]. Cette étude montre que le nombre d'éosinophiles est significativement supérieur dans les voies aériennes de gros et de petit calibre dans l'asthme mortel. Dans l'asthme mortel, le nombre de lymphocytes est corrélé au nombre d'éosinophiles avec un nombre de lymphocytes plus élevé dans l'asthme mortel sans toutefois que cette différence soit significative. De façon intéressante, ces auteurs retrouvent aussi une quantité accrue de mastocytes dégranulés chez les asthmatiques décédés. La localisation de ces cellules varie en fonction du compartiment : muscle et glandes des voies aériennes cartilagineuses, muscle lisse et adventice des voies aériennes membraneuses [19, 20]. Il a été montré aussi sur des pièces autopsiques que l'inflammation est présente sur les voies aériennes distales, de façon

intense entre la couche musculaire lisse et la région d'attachement au parenchyme (cellules CD45+ et éosinophiles), alors que cette inflammation est présente de façon majoritaire dans la région sous-épithéliale au sein des voies aériennes proximales. La distribution anatomique des cellules inflammatoires varie ainsi dans l'asthme, en fonction du type de bronches [21]. Chez des patients décédés d'asthme, les voies aériennes distales et les bronchioles sont occluses par du mucus, avec épaissement du muscle bronchique et infiltrats inflammatoires fait d'éosinophiles et de cellules mononucléées dans les parois bronchiolaires, périvasculaires et proche du muscle lisse [22]. Enfin, une étude plus récente a porté sur des analyses d'autopsie d'asthme mortel concernant le tissu bronchopulmonaire de 19 enfants. Ce travail montre que la présence de sécrétions endoluminales était plus importante chez les patients les plus jeunes et qu'il y avait proportionnellement plus de cellules dans les petites voies aériennes (moins de 3 mm) que dans les voies aériennes proximales [23].

Autopsies : modifications structurales

Une augmentation de la masse musculaire lisse des voies aériennes distales a été observée chez l'asthmatique, décédé d'asthme ou d'une autre cause. Kuwano a réalisé une étude autopsique observant la taille des bronches incluant l'adventice, la sous-muqueuse et le secteur du muscle lisse des voies aériennes distales [24]. Celles-ci sont épaissies, chez les asthmatiques décédés d'asthme, de façon significativement plus importante comparées à la taille des voies aériennes mesurées dans la BPCO et chez les sujets contrôles. Le muscle lisse est 2 à 3 fois plus épais chez l'asthmatique comparé aux sujets indemnes d'affections respiratoires et chez les patients atteints de BPCO. L'épaississement est plus important chez les asthmatiques décédés d'asthme par rapport à des asthmatiques dont le décès est indépendant de l'asthme. Malgré les bouchons muqueux remplissant les voies aériennes souvent constatés chez les patients décédés d'asthme aigu grave, les études autopsiques ne révèlent pas un nombre accru de glandes surtout dans les voies aériennes distales [25].

Pièces opératoires

Hamid montre que l'infiltration cellulaire est supérieure sur le poumon de patients asthmatiques comparé à des non-asthmatiques. Cette inflammation est intense sur les bronches proximales et distales. Un nombre supérieur d'éosinophiles activés (marqués par l'EG2) était présent en distalité comparé aux bronches proximales, en faveur d'une activité inflammatoire accrue localisée [26]. Le nombre de cellules exprimant l'IL-4 (interleukine 4) et l'IL-5 (interleukine 5) est augmenté dans l'asthme, y compris dans les petites voies aériennes, plus intense en distalité pour l'IL-5 [27]. Le niveau d'expression de deux chimiokines, MCP-4 (monocyte chemoattractant protein-4) et eotaxine, impliquées dans l'asthme est augmenté aussi dans les petites voies aériennes, de façon similaire à ce qui est observé dans les voies aériennes proximales [28].

Biopsies transbronchiques

Dans l'asthme sévère, Balzar a montré une augmentation du nombre de mastocytes exprimant la chymase dans les voies aériennes distales comparées aux voies aériennes proximales [29]. Cette augmentation des mastocytes exprimant la chymase est corrélée à la fonction respiratoire. Toutefois le rôle de ces mastocytes reste indéterminé. Sur des biopsies transbronchiques, Balzar montre dans l'asthme sévère que les voies aériennes de petit calibre sont le siège d'une inflammation cellulaire accrue, comparée aux voies aériennes de moyen ou gros calibre [30]. Dans l'asthme sévère corticodépendant, Wenzel montre sur biopsies bronchiques et transbronchiques, une inflammation chronique persistante et accrue pour les neutrophiles aux niveaux des bronches de tout calibre [31]. Kraft montre que les asthmatiques ayant des symptômes nocturnes ont une inflammation distale, éosinophilique et macrophagique, corrélée à la réduction du VEMS. Ces données ne sont pas retrouvées sur les voies aériennes proximales. Il s'y associe une diminution d'affinité du récepteur aux glucocorticoïdes [32]. Ainsi ces données confirment le rôle de l'inflammation des voies aériennes distales dans l'asthme sévère.

LBA

L'asthme nocturne est volontiers associé à une forme moins contrôlée d'asthme. L'inflammation cellulaire évaluée par le LBA est plus intense chez les asthmatiques ayant de l'asthme nocturne (PNN et PNE) [33]. La production de radicaux libres dans le LBA, reflet de l'activation macrophagique est aussi plus intense dans ce cas [34]. Il existe une éosinophilie significativement plus élevée par rapport au contrôle [35-37]. S'il peut être considéré comme un marqueur qualitatif de l'inflammation bronchique, l'éosinophile n'est pas un marqueur quantitatif de sévérité [35, 37]. En revanche, le polynucléaire neutrophile est plus souvent corrélé à la sévérité de l'asthme. Le rôle des polynucléaires éosinophiles dans l'inflammation bronchique de l'enfant asthmatique est également souligné par le travail de Rojas-Ramos [38]. Les principales chimiokines recrutant les éosinophiles

(RANTES, Eotaxine -1 et -2, MCP -3 et -4) sont significativement plus élevées chez les enfants allergiques asthmatiques. Par ailleurs une augmentation de cellules produisant l'IFN γ (interféron γ) [39] et des taux élevés d'IFN γ [40] sont observés chez l'enfant asthmatique. Enfin il existe chez le nourrisson asthmatique une activation des macrophages alvéolaires qui libèrent des quantités excessives de médiateurs pro-inflammatoires (thromboxane B2, LTB4, Tumor necrosis factor- α , TNF α) [41, 42]. Il existe un déséquilibre du système protéase anti protéase impliqué dans le *turn over* de la matrice extracellulaire. Les taux de MMP9 (matrix metalloproteinase-9) et de TIMP1 (tissu inhibitor metallo-proteinase-1) ont été retrouvés tantôt augmentés [43] tantôt diminués [44] chez l'enfant asthmatique. Le rapport MMP9-TIMP1 a été retrouvé abaissé [42]. Mahut retrouve enfin une corrélation entre le débit bronchique maximum de NO et ce rapport MMP9-TIMP1 [45].

- La plupart des travaux montrent que l'inflammation et les paramètres de remodelage intéressent l'ensemble de l'arbre bronchique. Dans certaines études, l'inflammation et le niveau d'activation des éosinophiles et mastocytes apparaissent plus intenses en distalité et seraient liés à la sévérité.
- Le nombre d'éosinophiles et de lymphocytes des bronches proximales et distales est majoré chez les patients décédés d'asthme.
- On retrouve une inflammation éosinophilique dans les voies aériennes de petit calibre chez des patients décédés d'asthme et chez des patients atteints d'asthme léger à modéré (mais le nombre d'éosinophiles des bronches de gros calibre est moindre dans le deuxième groupe).
- Il y a également une augmentation de la masse musculaire lisse des voies aériennes distales dans l'asthme.
- Dans l'asthme mortel, le nombre de lymphocytes est corrélé au nombre d'éosinophiles.
- La distribution anatomique des cellules inflammatoires varie dans l'asthme, en fonction du type de bronches (prédominance entre la couche musculaire lisse et la région d'attachement au parenchyme pour les voies aériennes distales, et région sous-épithéliale pour les voies aériennes proximales).
- Le nombre de cellules exprimant l'IL-4 et l'IL-5 est augmenté dans l'asthme, y compris dans les petites voies aériennes, mais elles prédominent au niveau distal pour l'IL-5.
- Le nombre de mastocytes exprimant la chymase est majoré dans les voies aériennes distales au cours de l'asthme sévère.
- L'inflammation cellulaire est plus intense au cours de l'asthme nocturne.
- Chez l'enfant asthmatique, il existe une augmentation des principales chimiokines recrutant les éosinophiles (RANTES, Eotaxine -1 et -2, MCP -3 et -4).

Peut-on évaluer l'atteinte des petites voies aériennes par les biopsies bronchiques proximales et l'expectoration induite ?

Les travaux chez l'adulte de Carroll sur l'asthme fatal [18], mais aussi ceux de Hamid sur des pièces opératoires [26] suggèrent que les biopsies endobronchiques proximales sont représentatives des voies aériennes proximales et distales [46]. Plusieurs travaux ont comparé la cellularité de l'expectoration induite (EI) comparée au LBA (*tableau I*). Les polynucléaires neutrophiles sont présents de façon normale dans l'EI où ils représentent environ 30-40 % des cellules [47, 48] alors qu'ils ne représentent que moins de 3 % des cellules du LBA normal [49]. Chez l'asthmatique, la proportion de polynucléaires éosinophiles est en règle plus élevée dans l'EI que dans le LBA [50-54]. L'analyse de l'expectoration induite par les techniques usuelles ne permet pas d'analyser l'inflammation distale.

Tableau I. Cellularité de l'expectoration induite comparée au LBA, au lavage bronchique et aux biopsies.

Auteurs	N	Critères mesurés	EI vs LBA	EI vs LB	EI vs Biopsie
Fahy [52]	10	PNE	NS	R : 0,7*	ND
		ECP	NS	R : 0,7**	
Maestrelli [50]	21	PNE	R : 0,60*	ND	NS
Keatings [53]	16	PNE	NS	R : 0,7*	ND
		PNN	NS	R : 0,6*	
Grootendorst [54]	16	PNE	R : 0,55*	R : 0,5*	NS
		CD4+CMF	R : 0,55*	ND	
Pizzichini [51]	11	PNN	R : 0,78*	ND	ND
		CD4+CMF	R : 0,78*		
		ECP	NS		

El : expectoration induite ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; LB : lavage bronchique ; CMF : cytométrie de flux ; PNE : polynucléaires éosinophiles ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; ECP : eosinophil cationic protein ; CD4+ : lymphocytes T CD4+ ; R : coefficient de corrélation (test de Spearman) ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS : non significatif ; ND : non déterminé.

Conclusion

Les voies aériennes dans leur ensemble sont concernées par les phénomènes inflammatoires et les remaniements structuraux dans l'asthme. La taille des bronches distales peut favoriser leur occlusion par les phénomènes successifs et concomitants incluant une obstruction par des bouchons muqueux, l'œdème de la paroi bronchique, l'infiltration par les cellules inflammatoires. Les modifications structurales affectent l'épithélium, l'espace sous-épithélial et le muscle lisse bronchique. La contribution de ces anomalies à l'histoire naturelle de la maladie asthmatique est inconnue mais il est tentant de postuler que ces atteintes distales interviennent dans la chronicité et la sévérité de l'asthme.

A retenir

- Les voies aériennes distales incluent les voies aériennes de la 8e division, jusqu'aux bronchioles terminales. Chez l'adulte, le critère le plus souvent retenu est un diamètre inférieur à 2 mm.
- Les études des pièces opératoires, autopsiques ou des biopsies transbronchiques sont les méthodes de référence pour leur analyse directe.
- Le LBA et les biopsies bronchiques sont des méthodes indirectes. Le LBA reflète essentiellement l'inflammation distale. Les biopsies bronchiques permettent l'analyse de l'inflammation et du remodelage.
- L'expectoration induite ne permet pas d'analyser l'inflammation distale.
- Dans l'asthme, l'inflammation et les remaniements structuraux affectent l'arbre aérien dans sa totalité et de façon similaire.
- Les voies aériennes distales sont particulièrement concernées par une infiltration cellulaire inflammatoire massive faite de cellules très actives au cours de l'asthme sévère, l'asthme nocturne forme d'asthme mal contrôlé et dans l'asthme mortel.

Références

- 1 Wenzel SE : Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006 ; 368: 804-13.
- 2 Bousquet T, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM : Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*; 2000 ; 161 : 1720-45.
- 3 Tillie-Leblond I, Iliescu C, Deschildre A : Physiopathology of inflammatory events in asthma. *Arch Pediatr* 2004 ; 11 : 58S-64 (suppl 2).
- 4 Kraft M : The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J* 1999 ; 14: 1403-17.
- 5 Lee YM, Park JS, Hwang JH, Park SW, Uh ST, Kim YH, Park CS : High-Resolution CT findings in patients with near-fatal asthma comparison of patients with mild-to-severe asthma and normal control subjects and changes in airway abnormalities following steroid treatment. *Chest* 2004; 126: 1840-8.
- 6 de Blic T, Scheinmann P : The use of imaging techniques for assessing severe childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007 ; 119 : 808-10.
- 7 Burri PH : Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* 1984 ; 46:617-28.
- 8 Sparrow MP, Weichselbaum M, McCray PB : Development of the innervation and airway smooth muscle in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 ; 20 : 550-60.
- 9 Rosenthal M : The growing lung: normal development, and the long-term effects of pre- and postnatal insults. *European Respiratory Monograph* 2002 ; 19 : 1-24.
- 10 Boezen HM, Jansen DF, Postma DS : Sex and gender differences in lung development and their clinical significance. *Clin Chest Med* 2004 ; 25 : 237-45.
- 11 Bjornson CL, Mitchell I: Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Genet Specif Med* 2000 ; 3 : 57-61.

- 12 Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P : Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 3173-81.
- 13 Jeffery PK : The development of large and small airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157 : S174-80.
- 14 Zhang JY, Wenzel SE : Tissue and BAL based biomarkers in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007 ; 27 : 623-32.
- 15 Tulic MK, Christodoulopoulos P, Hamid Q: Small airway inflammation in asthma. *Respir Res* 2001 ; 2 : 333-9.
- 16 Faul JL, Tormey VJ, Leonard C, Burke CM, Farmer J, Home SJ, Poulter LW: Lung immunopathology in cases of sudden asthma death. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 301-7.
- 17 Synek M, Beasley R, Frew AJ, Goulding D, Holloway L, Lampe FC, Roche WR, Holgate ST : Cellular infiltration of the airways in asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 154 : 224-30.
- 18 Carroll N, Cooke C, James A : The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 292-300.
- 19 Carroll NG, Mutavdzic S, James AL : Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 2002 ; 57 : 677-82.
- 20 Carroll NG, Mutavdzic S, James AL : Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002 ; 19 : 879-85.
- 21 Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Ment-zer SJ, Sugarbaker DJ, Doerschuk CM, Drazen JM : Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 565-72.
- 22 Saetta M, Di SA, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM : Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991 ; 143 : 138-43.
- 23 Kuyper LM, Pare PD, Hogg JC, Lambert RK, Ionescu D, Woods R Bai TR: Characterization of airway plugging in fatal asthma. *Am J Med* 2003; 115: 6-11.
- 24 Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC : Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993 ; 148 : 1220-5.
- 25 Carroll N, Lehmann E, Barret J, Morton A, Cooke C, James A : Variability of airway structure and inflammation in normal subjects and in cases of nonfatal and fatal asthma. *Pathol Res Praet* 1996 ; 192 : 238-48.
- 26 Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC : Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 100 : 44-51.
- 27 Minshall EM, Hogg JC, Hamid GA : Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101 : 386-90.
- 28 Taha RA, Minshall EM, Miotto D, Shimbara A, Luster A, Hogg JC, Hamid GA: Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 103 : 476-83.
- 29 Balzar S, Chu HW, Strand M, Wenzel S : Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 ; 171 : 431-9.
- 30 Balzar S, Wenzel SE, Chu HW : Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. *Eur Respir J* 2002 ; 20 : 254-9.
- 31 Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ : Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 156 : 737-43.
- 32 Kraft M, Vianna E, Martin RJ, Leung DY : Nocturnal asthma is associated with reduced glucocorticoid receptor binding affinity and decreased steroid responsiveness at night. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 103 : 66-71.
- 33 Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR Ballard RD, Szeffler SJ : Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991 ; 143 : 351-7.
- 34 Jarjour NN, Busse WW, Calhoun WJ : Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992 ; 146 : 905-11.
- 35 Stevenson EC, Turner G, Heaney LG, Schock BC, Taylor R, Gallagher T, Ennis M, Shields MD : Bronchoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1997 ; 27 : 1027-35.

- 36 Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO : Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 1533-40.
- 37 Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A : Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 110 : 42-4
- 38 Rojas-Ramos E, Avalos AF, Perez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Teran LM : Role of the chemokines RANTES, monocyte chemoattractant proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J* 2003 ; 22 : 310-6.
- 39 Brown V, Warke TJ, Shields MD, Ennis M : T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax* 2003 ; 58 : 311-6.
- 40 Marguet C, Dean TP, Warner JO : Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and interferon-gamma in bronchoalveolar lavage fluid from children with airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 162 : 1016-22.
- 41 Azevedo I, de Blic J, Scheinmann P, Vargaftig BB, Bachelet M : Enhanced arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages from wheezy infants. Modulation by dexamethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 152 : 1208-14.
- 42 Azevedo I, de Blic J, Dumarey CH, Scheinmann P, Vargaftig BB, Bachelet M : Increased spontaneous release of tumour necrosis factor-alpha by alveolar macrophages from wheezy infants. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 1767-73.
- 43 Tang LF, Du LZ, Chen ZM, Zou CC : Levels of matrix metallo-proteinase-9 and its inhibitor in bronchoalveolar lavage cells of asthmatic children. *Fetal Pediatr Pathol* 2006 ; 25 : 1-7.
- 44 Doherty GM, Kamath SV, de CF, Christie SN, Chisakuta A, Lyons JD, Heaney LG, Ennis M, Shields MD : Children with stable asthma have reduced airway matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio. *Clin Exp Allergy* 2005 ; 35 : 1168-74.
- 45 Mahut B, Delclaux C, Tillie-Leblond I, Gosset P, Delacourt C, Zerah-Lancner F, Harf A, de Blic J : Both inflammation and remodeling influence nitric oxide output in children with refractory asthma.
- 46 James AL, Maxwell PS, Pearce-Pinto G, Elliot JG, Carroll NG : The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 166 : 1590-5.
- 47 Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE : Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 161 : 475-8.
- 48 Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, Bianchi A, Michetti G : Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 162 : 1172-4.
- 49 Balbi B, Pignatti P, Corradi M, Baiardi P, Bianchi L, Brunetti G, Radaeli A, Moscato G, Mutti A, Spanevello A, Malerba M : Bronchoalveolar lavage, sputum and exhaled clinically relevant inflammatory markers: values in healthy adults. *Eur Respir J* 2007 ; 30 : 769-81.
- 50 Maestrelli P, Saetta M, Di SA, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Mapp CE, Fabbri LM : Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 152 : 1926-31.
- 51 Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, Cox G, Dolovich J, O'Byrne P, Hargreave FE : Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998 ; 11 : 828-34.
- 52 Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HA : Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 152 : 53-8.
- 53 Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ : Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997 ; 52 : 372-4.
- 54 Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Kluin-Nelemans JC, Van Krieken JH, Veselic-Charvat M, Sterk PJ : Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997 ; 27 : 769-79.