

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

N° attribué par la bibliothèque

									0	3
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

Année 2014

Un nouveau biomarqueur de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire: du modèle *in vitro* à la cohorte COLT

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Physiologie et biologie cellulaire

Présentée

et soutenue publiquement par

Mallory PAIN

Le 6 juin 2014, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs : Mme Nelly FROSSARD, DR INSERM, Université de Strasbourg.

M. Christophe GUIGNABERT, Chargé de Recherche INSERM, Université Paris Sud.

Examineurs : M. François-Xavier BLANC, PU-PH, Université de Nantes.

M. Christophe PISON, PU-PH, Université Grenoble Alpes.

Directeur de thèse : Antoine Magnan, PU-PH, Université de Nantes.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Nelly Frossard, Christophe Guignabert, François-Xavier Blanc et Christophe Pison d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie Hervé Le Marec de m'avoir accueillie à l'Institut du Thorax, où j'ai passé 5 années riches d'enseignements. Le développement de la recherche translationnelle est un véritable atout pour cet institut, qui a contribué à mon épanouissement au sein de cette structure. Un grand merci aux secrétaires pour leur aide et leur joie de vivre.

Je tiens à remercier Bernard Vanhove et Christelle Coraux pour leur participation à mon comité de suivi de thèse. Les discussions et leurs conseils ont contribué à l'évolution de ce travail. Je tiens à remercier les membres de l'équipe de Christelle Coraux qui m'ont accueillis pendant une semaine à Reims, afin d'apprendre la culture de cellules épithéliales pulmonaires primaires.

Egalement, je tiens à remercier sincèrement Antoine Magnan, de m'avoir fait confiance pour ce projet. Je le remercie tout particulièrement pour son soutien, mais aussi de m'avoir offert la possibilité d'aller au bout de mes hypothèses.

De la même manière, je remercie Karine Botturi-Cavaillès de m'avoir donnée la chance de travailler sur la cohorte COLT. Même si le climat entre nous n'a pas toujours été au beau fixe, je n'oublie pas que cette thèse n'aurait pas été possible sans toi.

Je remercie évidemment les membres de l'équipe, pour leurs échanges et leur bonne humeur. Damien Reboulleau pour les nombreuses commandes. Merci à Marie-Aude (la technicienne du pays des souris), pour nos petites discussions matinales sur la vie et les souris bien-sûr. Merci à Sandie Parès, avec qui j'ai commencé mon expérience en laboratoire (en 2009, ça date un peu ?); je n'oublierai pas ce que tu as fait pour moi.

Mes remerciements vont également aux autres thésards de l'équipe: Mamadou Braza, pour les tris au FACS ARIA, et notre passion commune pour les burgers. Tata Julie, pour m'avoir supportée dans le même bureau et pour son soutien moral. Je regrette juste de ne pas avoir échangé avec vous plus tôt. Mais mieux vaut tard que jamais. Je vous souhaite encore de belles manip et de beaux projets pour l'avenir. Merci également à Maxime Fieux (mon meilleur padawan), pour ta contribution durant cette thèse. C'est avec un réel plaisir que je t'ai transmis toutes mes connaissances.

Un MERCI particulièrement à Jennifer Loy (JLO), tu es une technicienne hors pair. Tu m'as supporté durant mes manips les plus folles, merci pour ta patience et pour ta persévérance. J'ai adoré travailler avec toi.

Un Mega MERCI à Pierre (PJR, ou encore Pierrafeu). Ton arrivée dans l'équipe a été une énorme bouffée d'oxygène pour moi. Durant notre collaboration, tu m'as permis de prendre confiance en moi et a su me canaliser lorsque je partais dans des hypothèses improbables. Tu as su me rassurer et m'épauler dans cette période de thèse. Merci beaucoup pour le temps que tu as consacré pour les corrections et discussions associées à ce manuscrit. Sache que ces échanges ainsi que nos petites discussions footballistiques vont incroyablement me manquer.

Merci à Philippe Aubert et Bernard Lardeux (UMR 913, Neuropathie du système nerveux entériques et pathologies digestives) pour leur disponibilité, leur aide et leur expertise technique. Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans eux.

Mes remerciements vont également à Yannick Lacoeyille (mon tonton Yaya). Tu es à l'origine de cette aventure. Merci pour tes précieux conseils scientifiques (Mr propre), ainsi que les échanges linguistiques de nos contrées, ces parties de sing star (d'ailleurs tu ne m'as jamais battu) et de Star Wars lego (que nous n'avons toujours pas fini), accompagnées de bons burgers et de nombreux mojitos. C'est dans un contexte très tumultueux que tu as choisi de retourner dans ton pays « faire une thèse sur la culture du romarin et de la garrigue ». Sache qu'il m'a été longtemps très difficile de « marcher » sans toi à mes côtés. Mais ton soutien et ton amitié m'ont montrés que j'étais capable d'y arriver. Tu n'as jamais douté de moi, et je suis fière d'être arrivée à la fin de cette thèse. Tu le sais, que quelque part, tu y es pour beaucoup.

« Vielen Dank » à Oliver Eickelberg de m'avoir accueillie pendant ces quelques mois au sein de son équipe, à Munich. « Muchas gracias » à Olga Bermudez pour ces enseignements scientifiques et ses échanges très fructueux. Merci à toutes les équipes du Comprehensive pulmonary center, pour leur accueil chaleureux ainsi que leurs conseils. J'ai énormément appris à vos côtés. Cette expérience outre-Rhin reste un de mes plus beaux moments de thèse (et le plus froid aussi d'ailleurs).

MERCI au comité MAF, pour les réunions clandestines de coaching de thèse : Maxime Mahé, merci à toi d'avoir cru en moi, de m'avoir encouragée à faire une thèse. C'est une expérience formidable parsemée d'embuches mais qui au final est très formatrice. Merci pour tes conseils et tes idées farfelues. Je ne t'oublierai jamais. Aurélie Lardeux, merci à toi pour tous les enseignements techniques qui m'ont servi durant cette thèse. Merci également pour tes précieux conseils en matière d'avenir professionnel, mention spéciale pour les MOOC. Les doctoriales restent un moment

inoubliable où j'ai rencontré de formidables personnes et qui m'ont conforté mon avenir professionnel. Florence Deknydt (ou l'oracle), merci à toi pour tes conseils en immunologie. Tu m'as réconciliée avec le cytomètre. Vous avez contribué tous les 3 à « ma rééducation » après le départ de Yannick, et vous seuls savez à quel point cette étape fut importante dans ma thèse.

À mon bébé Polo...sache que ta maman scientifique s'en va vers de nouveaux horizons, mais qu'elle ne cessera jamais de te soutenir dans tes projets (scientifiques ou non). Au delà d'un scientifique de qualité, tu es un véritable ami qui a toujours été là dans les bons et les mauvais moments... et toi seul sait combien ils ont été nombreux.

À Antoine Roux (tites noreilles). Waouh on a réussi ensemble. Nous qui ne voulions pas faire de thèse. Tout ce chemin traversé, miné par nos doutes et nos angoisses, finalement on est arrivés au bout tout les deux. Je t'ai prouvé que finalement qu'une vendéenne pouvait faire une thèse. Merci à toi pour tes encouragements et ton soutien depuis le master 1.

Un énorme merci à Aurore Girardeau, Angélique Erraud (les techniciennes de choc). Nous n'étions pas de la même équipe, mais sachez que j'ai beaucoup appris à vos côtés. Vous me manquez énormément, mais je suis sûre que j'ai marqué vos esprits avec mes expériences « de la mort qui tue ». Un grand merci aux sœurs Le cunff et à Titi pour leur soutien, leurs discussions mais aussi pour leurs découvertes culinaires made in Nantes. Vous me manquez beaucoup.

Merci à tous mes amis : Les sœurs terriens : pour les voyages qui m'ont permis de prendre du recul face à la thèse. Mention spéciale aux stéphaniades. La famille Pineau, La famille Vénien, Angéline, la famille legallou, julie : merci pour ces petits moments de détente et vos encouragements. Fabrice : pour ton soutien sans faille ainsi que tes précieux conseils. Stéphane et Lucile, Aurélien et Danuta : Merci pour votre soutien, et ces petites escapades de rugby à Paris associées à des brunchs de folies. Je n'oublierai jamais ces moments passés avec vous. Anne Claire et lolo : pour nos soirées « club des cinq » ; Bruno et Luck : pour leur amitié et leur hospitalité sur Lyon. Tata India, Mike et Lima : l'aventure garde urbaine a grandement contribué au développement de compétences qui m'ont été très utiles lors de cette thèse.

Merci à tous pour votre soutien moral, mais aussi votre patience, car j'ai été souvent absente, mais promis à partir d'aujourd'hui je compte bien me rattraper. A tous un grand merci pour votre amitié.

Je tiens à remercier à ma famille, mes grands parents, Tonton Philippe, Tata Sandrine et Tom, sans vos encouragements je ne serai peut être pas arrivée au bout. Je remercie sincèrement mes parents

pour avoir cru en moi et de m'avoir soutenue financièrement et moralement durant toutes ces années d'études.

Je dédie ce travail à la personne qui partage ma vie. Il n'y a que toi qui sait à quel point cette thèse était difficile. Je tiens à te remercier pour ta patience (et il en a fallu), ton écoute, ta disponibilité (pour les nombreuses relectures) et surtout ton soutien. Tu le sais « un Merci n'est pas suffisant ». Tu as su me faire oublier les mésaventures de la thèse, ton attention et tes conseils ont contribué à effacer mes doutes sur l'avenir. Merci d'avoir résisté pour nous. Nous avons survécu à deux thèses, maintenant le meilleur est à venir.

« Le succès c'est d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme »

Wiston Churchill

« When I am sad, I stop being sad and be awesome instead »

Barney Stinson

Sommaire

Table des figures	ix
Table des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Avant-Propos	xv
I- Introduction	1
I.1- Immunologie de la transplantation pulmonaire	1
I.1.1 Généralités de la transplantation pulmonaire	1
I.1.2- Rappel sur le système immunitaire	3
I.1.2.1- L'immunité innée	3
I.1.2.1.1 Les polynucléaires.....	4
I.1.2.1.2 Les cellules NK.....	4
I.1.2.1.3 Les cellules présentatrices d'antigènes	4
I.1.2.2 L'immunité adaptative	5
I.1.2.2.1 Les lymphocytes T	5
a) Présentation antigénique et activation des LT	5
c) Initiation de la réponse alloimmune	8
d) La polarisation des LT.....	9
Les LT CD8+	10
Les LT CD4+	10
Les LT Th1.....	10
Les LT Th2.....	10
Les LT Th17.....	11
Les LT régulateurs	11
I.1.2.2.2 Les lymphocytes B.....	12
I.1.3 La réaction immunitaire lors de la transplantation pulmonaire	13
I.1.3.1 Les différentes modalités de la reconnaissance allogénique.....	14
I.1.3.1.1 La reconnaissance directe	14
I.1.3.1.2 La reconnaissance indirecte	15
I.1.3.1.3 La reconnaissance semi-directe	15
I.1.3.2 Les différents types de rejet	16
I.1.3.2.1 Le rejet hyper aigu	16
I.1.3.2.2 Le rejet aigu	17
I.2 La dysfonction chronique du greffon	18
I.2.1 Manifestations cliniques et fonctionnelles du CLAD.....	18
I.2.1.1 La bronchiolite oblitérante.....	18
I.2.1.2 Le syndrome restrictif.....	19

I.2.1.3 La prise en charge du CLAD	20
I.2.2 Physiopathologie de la BO	21
I.2.2.1 Mise en évidence et classifications de la BO.....	21
I.2.2.2 Les facteurs de risques associés au développement de la BO	22
I.2.2.2.1 Les facteurs de risques dits « allo-dépendants »	22
a) Le rejet aigu	22
b) La bronchite lymphocytaire	23
c) L'incompatibilité HLA	23
II-2.2.2 Les facteurs de risques dits « allo-indépendants »	23
a) Les infections.....	24
b) La dysfonction primaire du greffon	24
c) Le reflux gastro-oesophagien	25
I.2.2.3 Les mécanismes physiopathologiques de la BO.....	26
I.2.2.3.1 Le processus inflammatoire	26
a) Implication des polynucléaires neutrophiles	27
b) Implication des autres acteurs de la réponse innée	28
c) Implication de la réponse immune adaptative	29
I.2.2.3.2 Le processus fibrotique	29
a) Implication de l'épithélium	30
b) Implication de l'auto-immunité.....	31
I.3 La transition épithélio-mésenchymateuse et la BO.....	32
I.3.1 L'épithélium bronchique	32
I.3.1.1 Définition et anatomie	32
I.3.1.2 Fonctions.....	34
I.3.1.3 Les différentes jonctions cellulaires	34
I.3.1.3.1 Les jonctions serrées	34
I.3.1.3.2 Les jonctions intermédiaires	35
I.3.1.3.3 Les jonctions communicantes	35
I.3.1.3.4 Les desmosomes	35
I.3.2 La transition épithélio-mésenchymateuse.....	36
I.3.2.1 Les différents types de transition épithélio-mésenchymateuse.....	36
a) La TEM de type I	37
b) La TEM de type II.....	37
c) La TEM de type III.....	38
I.3.2.2 Les voies de signalisations impliquées	39
I.3.2.2.1 Mécanisme de la TEM	39
a) Rôle central du TGFβ.....	40
b) Autres voies de signalisation impliquées dans la TEM.....	42
I.3.3 La transition épithélio-mésenchymateuse dans la BO.....	43
I.3.3.1 Les études menées chez l'homme.....	44

I.3.3.2 La TEM dans les modèles animaux de bronchiolite oblitérante.....	45
I.3.3.2.1 La transplantation trachéale hétérotopique	45
I.3.3.2.2 La transplantation pulmonaire orthotopique	47
I.3.3.3 Etude de la TEM dans les modèles cellulaires.....	48
I.3.3.3.1 Les lignées cellulaires	48
I.3.3.3.2 Les cellules bronchiques primaires	49
II- RATIONNEL.....	51
II.1 Hypothèse testée	51
II.2 Les objectifs.....	52
III- RESULTATS	53
III-1 Partie I : Mise en place d'un modèle de co-culture en contexte allogénique	53
III.1.1 Introduction	53
III.1.2 Matériels et méthodes	54
III.1.2.1 Modèle de co-culture cellules épithéliales pulmonaires, lymphocytes et monocytes.....	54
III.1.2.1.1 Préparation des cellules immunitaires	54
III.1.2.1.2 Culture des lignées cellulaires bronchiques	55
III.1.2.1.3 Mise en co-culture	56
III.1.2.2 Investigation sur les cellules épithéliales	56
III.1.2.2.1 Mesure de la résistance trans-épithéliale.....	56
III.1.2.2.2 Mesure de la perméabilité	57
III.1.2.2.3 Extraction de l'ARN et des protéines.....	57
III.1.2.2.4 Analyse de l'expression protéique	57
III.1.2.2.5 Immunofluorescence	58
III.1.2.2.6 Dosage des cytokines par multiplex	59
III.1.2.2.7 Les analyses statistiques.....	60
III.1.3 Résultats	61
III.1.3.1 Analyse moléculaire des deux lignées cellulaires	61
III.1.3.2 Analyse fonctionnelle des deux lignées cellulaires en interface air-liquide (ALI).....	62
III.1.3.3 Validation des conditions de culture pour la réalisation du modèle in vitro d'interaction	64
III.1.3.3.1 Viabilité des monocytes	64
III.1.3.3.2 Stimulation des LT	64
III.1.3.3.3 Suivi de la RTE au cours d'une co-culture.....	65
III.1.3.4 Application du modèle in vitro à partir de la lignée de 16HBE14O-.....	66
III.1.3.4.1 Analyse moléculaire de la co-culture	66
III.1.3.4.2 Etude de l'environnement inflammatoire de la co-culture	66
III.1.4 Discussion	68
III.2 Partie II.....	72
III.2.1 Hypothèses et objectifs	72

III.2.2 Résumé.....	72
III.2.3 Abstract.....	73
III.2.4 Introduction.....	74
III.2.5 Methods.....	75
III.2.6 Results.....	78
III.2.7 Discussion.....	86
III.2.7 Cohorte COLT et sélection des patients.....	89
IV Conclusion et discussion.....	93
V Bibliographie.....	106
VI Annexes.....	143

Table des figures

Figure 1: Courbes de survie après transplantation pulmonaire.....	2
Figure 2: Les différentes présentations antigéniques.....	7
Figure 3: Les différents signaux d'activation du lymphocyte T.....	9
Figure 4: Schéma de l'organisation du système immunitaire et ses différents acteurs.	13
Figure 5: Les différentes voies de la reconnaissance allogénique.....	16
Figure 6 : Mesure de volumes pulmonaires et radiographie de patients atteints de bronchiolite oblitérante.....	19
Figure 7 : Mesures de volumes pulmonaires et radiographie d'un patient atteint d'un syndrome restrictif.....	20
Figure 8: Les différents facteurs de risques de la bronchiolite oblitérante.....	26
Figure 9 : Représentation schématique des épithélia de la surface trachéo-bronchique et glandulaire.	33
Figure 10: Les différentes jonctions exprimées par les cellules épithéliales respiratoires.....	36
Figure 11: Schéma du mécanisme de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	37
Figure 12: Schéma de la transition épithélio-mésenchymateuse de type 2.....	38
Figure 13 : Schéma de la transition épithélio-mésenchymateuse de type 3.....	39
Figure 14: Schéma des voies de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse.	43
Figure 15: Hypothèse de l'influence du contexte allogénique sur la transition épithélio- mésenchymateuse au cours de la dysfonction chronique du greffon.....	51
Figure 16 : Schéma de la co-culture cellules épithéliales et cellules immunitaires.....	56
Figure 17: Principe du dosage et de la détection des cytokines par la technologie Luminex [®]	59
Figure 18: Expression protéique des différentes jonctions épithéliales dans des cultures de lignées cellulaires bronchiques.....	61
Figure 19 : Immunofluorescence de jonctions cellulaires dans les différentes lignées cellulaires bronchiques.....	62
Figure 20 : Suivi de la résistance transépithéliale au cours du temps sur des cultures de lignées cellulaires bronchiques.....	63
Figure 21: Evaluation de la perméabilité de culture de lignées cellulaires bronchiques.....	63

Figure 22: Etude de la viabilité des monocytes après une co-culture avec 16HBE14O-	64
Figure 23: Etude de la stimulation des Lymphocytes T au cours du temps.	65
Figure 24: Suivi de la résistance transépithéliale au cours d'une co-culture 16HBE14O- et cellules immunitaires.....	65
Figure 25: Analyse moléculaire des co-cultures 16HBE14O- et cellules immunitaires.	66
Figure 26: Analyse du contexte inflammatoire au cours de co-culture entre les 16HBE14O- et les cellules immunitaires.	67
Figure 27 : Activated T cells induce fibronectin and MMP-9 production in synergy with TGF- β 1 in primary human airway epithelial cells (AEC).	80
Figure 28 : Activated T cells induce MMP-9 production in synergy with TGF- β 1 in air-liquid interface (ALI) model of primary human airway epithelial cells (AECS).	81
Figure 29 : Pro-inflammatory cytokines are secreted during co-culture primary AECs with activated T cells in synergy with TGF- β 1.....	82
Figure 30 : Pro-inflammatory CCL2 secretion increased MMP-9 expression in synergy with TGF- β 1 in primary human airway epithelial cells (AEC).	83
Figure 31 : FEV1 and MMP-9 secretion in lung transplant.	85
Figure 32 : MMP-9 secretion in lung transplant : a new biomarker for CLAD.	86
Figure 33 : Déroulement du protocole COLT.	89
Figure 34 : Inclusions et suivi des patients de la cohorte COLT.	90
Figure 35 : Exemple de phénotypage des patients transplantés pulmonaires issus de la cohorte COLT.	91
Figure 36 : Classification des patients après 3 ans de suivis.	91
Figure 37 : Stratégie de sélection des patients BO pour le dosage plasmatique de MMP-9.	92
Figure 38 : Schéma bilan du mécanisme impliqué dans le remodelage bronchique au cours du CLAD.	100

Table des tableaux

Tableau 1: Classification des stades de la bronchiolite oblitérante.	21
Tableau 2: Tableau des anticorps utilisés en western blot et en Immunofluorescence	58
Tableau 3 : Tableau des anticorps utilisés en immunofluorescence.	58
Table 4 : Patient characteristics.	84

Liste des abréviations

α -SMA : L'actine α du muscle lisse
ALI : air-liquide interface
ARN : Acide ribonucléique
B-2b : Beas-2b
BCR : B cell receptor
BO : Bronchiolite Oblitérante
BOS : Bronchiolitis obliterans syndrome
BMP-7 : Bone morphogenetic protein-7
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BSA : bovine serum albumin
CC16 : Clara cell protein
CCR/CXCR : Récepteur aux chimiokines
CD : Cluster de différenciation
CEB : Cellules Epithéliales Bronchiques
CMH : Complexe majeur histocompatibilité
CML : Cellules musculaires lisses
CMV : Cytomégalovirus
COLT : COhort in lung transplantation
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CLAD : Chronique lung allograft dysfunction
CPT : Capacité pulmonaire totale
CTGF : connective tissue growth factor
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
CVF : capacité vitale forcée
DAMP : Damage associated molecular pattern molecules
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC : Cellule dendritique
EGF : epidermal growth factor
ERK1/2 : Extracellular signal regulated kinases
FITC : Fluorescein isothiocyanate
FGF : fibroblast growth factor
FSP-1 : Fibroblast specific protein 1
Fzd : Récepteur frizzled
HGF : Hepatocyte growth factor
Hh : Hedgehog

HLA : Human leucocyte antigen
HMGA2 : High motility group A2
HMGB1 : high mobility group box-1
HSP : heat shock protein
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
ICOS : Inductible Co-Stimulatory molecule
IDO : Indoléamine 2-3 dioxygénase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IGF : Insulin growth factor
IL : Interleukine
ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation
JAM : Junctional adhesion molecule
LB : Lymphocyte B
LBA : Lavages broncho-alvéolaires
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
MEC : Matrix metalloproteinase
MMF : Mycophenolate mofetil
MMP : Métalloprotéinases matricielles
moDC : Monocytes sanguins dérivés en cellules dendritiques
mTOR : Mammalian target of rapamycin
NK : Natural Killer
NRAD : Neutrophilic reversible allograft dysfunction
PAMP : Pathogen associated molecular patterns
PE : Phycoérythrine
PBS : Phosphate buffer saline
PDGF : Patelet growth factor
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinases
PRR : Pattern Recognition Receptors
RA : Rejet aigu
RAS : Restrictive allograft syndrome
RGO : Reflux gastro-oesophagien
RLM : Réaction leucocytaire mixte
ROS : Reactive oxygen species

RTE : Résistance transépithéliale
SHh : Sonic Hedgehog
SMO : Smoothened
SVF : Sérum de veau foetal
TBS : Tris buffer saline
TCR : T cell receptor
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF : Transforming growth factor
Th : Lymphocyte T helper
TIMP : Tissu inhibitor of metalloproteinase
TLR : Toll like receptors
TME : Transition mésenchymo épithéliale
TNF : Tumor necrosis factor
VEMS : Volume expiratoire maximal expiré par seconde
ZO : Zonula occludens

Avant-Propos

Au cours de mon cursus universitaire, je me suis dirigée rapidement vers la thématique « Santé » en effectuant une première année en faculté de médecine. Je me suis orientée vers un master 1 « sciences biologiques et médicales » à l'Université de Nantes dans le but de me rapprocher du domaine biochimie et biologie moléculaire lié à la santé humaine. J'ai poursuivi mon cursus en master 2 « sciences biologiques et médicales » spécialité « biologie, biotechnologie et recherche thérapeutique » en parallèle duquel j'ai acquis une double compétence par un « diplôme d'inter-universitaire (DIU) de formation aux attachés de recherche clinique (FARC) ». Dans le cadre de ce master, j'ai réalisé un stage à l'Institut du Thorax UMR1087, sous la direction du professeur Antoine Magnan au sein de l'équipe ATIP-AVENIR « pathologies bronchiques et allergies ». Cette équipe comporte deux axes majeurs de recherche, comprenant, d'une part, l'étude des mécanismes de l'allergie, avec le développement d'un modèle murin et de cohortes de patients asthmatiques. D'autre part, elle s'intéresse au rejet chronique du transplanté pulmonaire, plus particulièrement aux mécanismes et à l'identification de biomarqueurs de ce rejet.

Les travaux précédents de l'équipe, menés de façon transversale, ont contribué à la mise en évidence de populations lymphocytaires qui sembleraient jouer un rôle important dans la tolérance du greffon. Dans le but de vérifier ces résultats, une cohorte européenne de transplantés pulmonaires a été mise en place depuis septembre 2009 et est coordonnée par Antoine Magnan. L'objectif de cette cohorte COLT (COhort in Lung Transplantation) de 1000 patients nouvellement transplantés pulmonaires est de rechercher de nouveaux biomarqueurs spécifiques et prédictifs de la dysfonction chronique du greffon (CLAD). Cette cohorte est la seule qui suit les patients de façon longitudinale, sur 5 ans, avec la réalisation de prélèvements sanguins et *in situ* (expectoration induite, lavage broncho-alvéolaire, condensat de l'air exhalé et biopsies trans-bronchiques).

C'est dans cette thématique que s'est effectué mon stage de Master 2 où j'ai participé à la logistique des échantillons biologiques ainsi qu'à la réalisation du protocole scientifique concernant la recherche de facteurs prédictifs du CLAD. Dans la continuité de ce dernier, j'ai poursuivi en thèse sur un nouveau sujet sur lequel aucune étude fondamentale n'avait été développée. Mon projet de thèse a porté sur l'identification d'un nouveau biomarqueur du CLAD, à partir d'un modèle *in vitro*, jusqu'à la validation chez des patients transplantés pulmonaires. Les objectifs de mon projet ont consisté à :

- **La mise en place d'un modèle expérimental *in vitro***, permettant de tester l'influence des cellules immunitaires allogéniques sur le profil des cellules épithéliales bronchiques (CEB), par l'utilisation de deux lignées cellulaires bronchiques. A partir de ces lignées, j'ai pu établir les conditions expérimentales du modèle et mettre au point les techniques d'investigation nécessaires à l'étude de ce modèle.

- **L'application de ce modèle sur des CEB primaires**, dans le but de tester si le contexte allogénique pouvait contribuer à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et aboutir au remodelage bronchique.
- **L'identification et la validation de potentiels biomarqueurs prédictifs de la BO**, grâce à l'utilisation des prélèvements et des données de la cohorte COLT.

Ce manuscrit de thèse est articulé autour d'une introduction générale, suivie de la présentation des résultats et d'une discussion générale présentant les perspectives.

L'introduction générale présente le système immunitaire inné et adaptatif avec ses principaux acteurs, ainsi que la réaction immunitaire spécifique du contexte de transplantation. Une seconde partie s'attache plus particulièrement à décrire le rejet chronique de la transplantation pulmonaire. Enfin, une troisième partie présente une description du mécanisme de la TEM ainsi que son implication dans le développement du CLAD.

Les résultats divisés en deux parties, présentent tout d'abord les mises au point du modèle *in vitro* à l'aide de différentes lignées cellulaires bronchiques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Philippe Aubert et Bernard Lardeux (UMR 913, Nantes, Neuropathie du système nerveux entérique et pathologies digestives).

Nous avons transposé ce modèle sur des cellules épithéliales bronchiques (CEB) issues de donneur sain, afin d'étudier l'influence du contexte allogénique sur le profil de ces cellules et plus spécifiquement son rôle dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Pour terminer la partie conclusion de ce travail présente une discussion des résultats obtenus ainsi que les perspectives de ces travaux.

I- Introduction

I.1- Immunologie de la transplantation pulmonaire

I.1.1 Généralités de la transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire est la seule option thérapeutique pour les patients en phase terminale d'insuffisance respiratoire, souffrant de pathologies pulmonaires telles les fibroses pulmonaires, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), les dilatations des bronches diffuses et la mucoviscidose.

La première greffe expérimentale de poumon chez l'humain a été réalisée en 1963, par l'équipe du Pr James Hardy (Mississippi, Etats Unis) (HARDY et al., 1963). Même si cette tentative se solda par un échec, elle démontre la faisabilité chirurgicale de la transplantation pulmonaire. La découverte de la ciclosporine dans les années soixante-dix et l'amélioration des techniques chirurgicales ont contribué au premier succès à long terme de la transplantation cardio-pulmonaire réalisée en 1981 par le Dr Bruce Reitz (Reitz et al., 1981). Suite à cette avancée, d'autres transplantations ont été réalisées avec succès par l'équipe de Joel Cooper (Toronto) : la première greffe monopulmonaire (1983) et quelques années plus tard, la greffe bipulmonaire (Cooper et al., 1987). Grâce au progrès des techniques chirurgicales, la préservation des organes ainsi que l'amélioration du régime immunosuppresseur, plus de 32 000 procédures ont pu être réalisées dans le monde (Christie et al., 2010a).

En France, l'activité de greffe pulmonaire est en augmentation (664 greffes en 2012 contre 389 en 2005) (Agence de Biomédecine, 2014). Cependant, le nombre de nouveaux inscrits sur la liste d'attente pour une greffe cardio-pulmonaire augmente lui aussi (23 en 2012 contre 20 en 2011) comme celui des nouveaux inscrits pour une greffe pulmonaire (335 en 2012 contre 323 en 2011).

La médiane d'attente avant une greffe cardio-pulmonaire est de 7,7 mois en 2012 contre 10,8 mois en 2006 (Agence de Biomédecine, 2014). Le taux d'incidence de décès sur liste d'attente avant greffe cardio-pulmonaire (14,2%) et pulmonaire (12,1%) est en constante diminution. Ces diminutions sont probablement liées à la mise en place de liste de super-urgences et à l'amélioration des traitements médicaux avant greffe. La diminution de la pénurie d'organes contribue à ce phénomène principalement due à l'élargissement des critères d'acceptabilité du greffon, à l'efficacité des techniques de prélèvements cardio-pulmonaires, et maintenant au développement de la réhabilitation des greffons *ex-vivo* (Agence de Biomédecine, 2014).

Le taux de survie à court et moyen terme après une greffe pulmonaire se rapproche aujourd'hui de 80 %. Par contre, la survie à long terme reste inférieure à celle observée dans les autres transplantations d'organes solides. En effet, la médiane de survie des transplantés pulmonaires est de 5 ans (Figure 1) (Christie et al., 2010a), principalement en raison de la dysfonction chronique du greffon encore appelée CLAD (chronic lung allograft dysfunction). Malgré les améliorations des techniques chirurgicales et de prise en charge des patients, il n'existe aucun traitement curatif du CLAD (Todd and Palmer, 2011). L'unique solution pour ces patients est une nouvelle transplantation. Ceci justifie la nécessité de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du CLAD afin d'identifier des marqueurs précoces de la pathologie et de développer des traitements préventifs et curatifs.

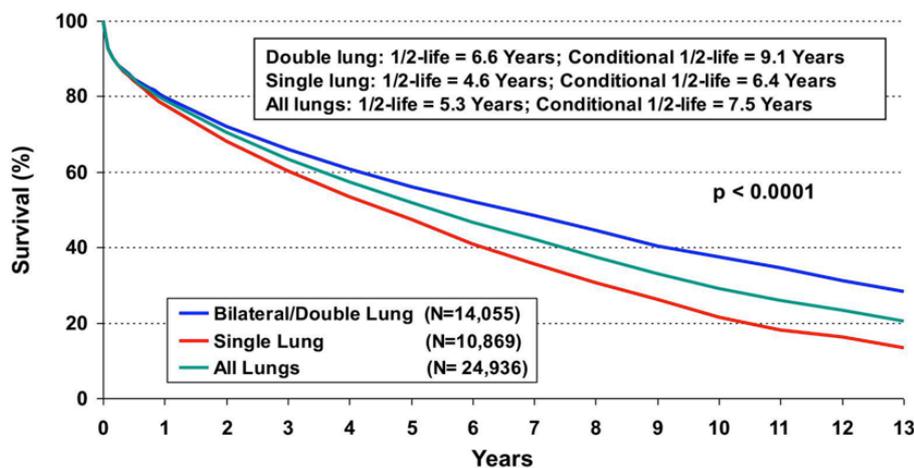


Figure 1: Courbes de survie après transplantation pulmonaire.

Courbe de Kaplan-Meier selon le type de transplantation pulmonaire chez l'adulte effectuée de Janvier 1994 à Juin 2008. Les transplantations monopulmonaires, bipulmonaires et l'ensemble de ces deux types de greffe sont présentées séparément. La demi-vie de la greffe et la demi-vie conditionnelle (temps de survie de 50% pour les receveurs vivants 1 an post-transplantation) sont présentées pour chaque type de greffe (Christie et al., 2010a).

Afin de mieux comprendre les mécanismes du CLAD, il est important que rappeler que l'implantation d'un poumon provenant d'un individu à un autre individu d'une même espèce provoque une réponse immunitaire allogénique rapide et intense de rejet. Dans un premier temps, je décrirai le système immunitaire et ses différentes composantes afin de mieux comprendre son implication au cours de la transplantation pulmonaire.

I.1.2- Rappel sur le système immunitaire

L'immunité désigne les mécanismes de défense utilisés par un organisme vivant contre les agents étrangers, notamment infectieux, susceptibles de menacer son bon fonctionnement ou sa survie. La reconnaissance d'une structure, moléculaire ou cellulaire, comme étrangère conduit à sa neutralisation et à son élimination par le déclenchement d'une réponse immunitaire. Le système immunitaire est constitué d'un ensemble complexe d'organes individualisés et de tissus entre lesquels circulent, de façon constante, des cellules immunocompétentes. L'organisme dispose de deux systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

I.1.2.1- L'immunité innée

L'immunité innée, encore appelée naturelle correspond à une réponse d'action immédiate, non spécifique de l'agent pathogène. Elle repose sur une distinction globale du soi et du non-soi par la reconnaissance *via* les « pattern recognition receptors » (PRR) de motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen associated molecular patterns ou PAMP) (Janeway, 1989). En fonction de leur mode d'action, l'activation des PRR déclenche une réponse inflammatoire par l'intermédiaire de mécanismes humoraux (voie du complément, cytokines, protéines de la phase aiguë de l'inflammation) et la neutralisation d'agents pathogènes. Ils peuvent faire intervenir des mécanismes cellulaires tels que la phagocytose par leur activation à la membrane des macrophages. Les PRR les plus décrits sont les « Toll like receptors » (TLR). Il existe les TLR extracellulaires (TLR1, 2, 4, 5 et 6) qui reconnaissent les PAMP extracellulaires et les TLR endosomaux (TLR3, 7, 8 et 9) qui reconnaissent les PAMP intracellulaires. La reconnaissance d'un PAMP par les TLR, comme celle du lipopolysaccharide (LPS) par le TLR4, induit un signal aboutissant à une activité effectrice immédiate de la cellule.

Toutefois, la capacité à identifier le « non-soi infectieux » n'explique pas tout. Matzinger et coll. ont proposé une hypothèse fondée sur la notion de danger (Matzinger, 2002). Lors d'un processus infectieux ou, plus largement pathologique, les cellules lésées engendrent des signaux de danger. Les PRR sont capables de détecter ces signaux de danger endogènes. En 2005, ces signaux sont nommés « alarmines » encore appelés DAMP (damage associated molecular pattern molecules) (Oppenheim and Yang, 2005). Leur classification n'est pas encore définie, mais certains considèrent les alarmines comme étant des signaux d'origine aseptique (contrairement aux PAMP, d'origine septique). Les alarmines permettent le recrutement de cellules immunitaires exprimant les PRR, notamment des cellules dendritiques (DC), et favorisent ainsi indirectement la réponse immunitaire adaptative. Elles participent au retour de l'homéostasie en promouvant la reconstruction du tissu lésé (Bianchi and

Manfredi, 2007). La protéine HMGB1 (High mobility group box-1) est l'alarmine la plus étudiée pour son rôle dans la signalisation immunitaire (Bianchi and Manfredi, 2007; Willingham et al., 2009) et plus particulièrement son interaction avec TLR2 et TLR4 (Park et al., 2004, 2006). D'autres alarmines sont décrites, comme la famille des protéines S100 (D'Ambrosio et al., 2003) et les protéines de choc thermique HSP (Heat shock protein) (Bianchi and Manfredi, 2007; Tsan and Gao, 2009). Certaines cytokines comme l'interleukine (IL)-1 α et l'IL-33 sont également considérées comme des alarmines (Moussion et al., 2008; Werman et al., 2004).

I.1.2.1.1 Les polynucléaires

Les polynucléaires neutrophiles sont les plus abondants dans le sang. Ils ont pour rôle principal d'éliminer les agents pathogènes par phagocytose. Ces cellules sont recrutées sur le site de l'inflammation en réponse à des facteurs chimiotactiques et à la surexpression de molécules d'adhérence vasculaire. Les polynucléaires éosinophiles sont également recrutés sur le site inflammatoire. Ils sont efficaces pour l'inactivation des parasites extracellulaires en dégranulant les contenus des vésicules préformées sur le parasite. Enfin, les polynucléaires basophiles sont impliqués dans la sécrétion de l'histamine au cours de la réaction allergique.

I.1.2.1.2 Les cellules NK

Les cellules natural killer (NK) sont des cellules cytotoxiques présentes dans le sang circulant et infiltrant rapidement les sites inflammatoires. Elles sont capables de détruire directement certaines cellules tumorales ou infectées par des virus ou autres micro-organismes. Elles ont un rôle important dans la défense infectieuse, notamment anti-virale. Leur activité cytotoxique est basée sur leur capacité à décharger sur les cellules cibles le contenu de granules intracytoplasmiques préformées.

I.1.2.1.3 Les cellules présentatrices d'antigènes

Il existe trois types de cellules capables de présenter l'antigène : les monocytes/macrophages, les DC et les lymphocytes B (LB). Les macrophages exercent diverses fonctions au cours de la réponse immunitaire innée mais aussi au cours de la réponse adaptative. L'une de leurs fonctions est d'ingérer et tuer les micro-organismes. Ils peuvent également éliminer les pathogènes ainsi que les cellules qui ont servi de cibles à la réponse immunitaire adaptative. Ils contribuent à l'inflammation et

à l'élimination des cellules mortes et autres débris cellulaires. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes et dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Elles forment un lien crucial entre les deux réponses du système immunitaire. Outre la production d'anticorps, les LB sont également capables de présenter les antigènes et seront détaillés dans un paragraphe ultérieur.

I.1.2.2 L'immunité adaptative

L'immunité adaptative ou acquise est une réponse spécifique de l'antigène identifié comme étranger à notre organisme, encore appelé antigène du « non-soi ». La réponse adaptative est limitée dans le temps, jusqu'à éradication de l'agresseur. Sa principale caractéristique est de créer la mémoire immunitaire lorsque l'organisme développe une réponse primaire au cours d'un premier contact antigénique. Ceci permettra lors d'un nouveau contact avec cet antigène de développer une réponse secondaire, plus rapide, plus intense et plus efficace que la réponse primaire.

I.1.2.2.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) expriment le TCR (T cell receptor), appartenant à la super-famille des immunoglobulines (Ig). Le TCR des LT matures est associé à des co-récepteurs tels que le cluster de différenciation (CD) 4 ou le CD8, permettant de distinguer deux populations : les LT CD4+ et les LT CD8+. Les LT reconnaissent les épitopes sous forme de peptides présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

a) Présentation antigénique et activation des LT

L'histocompatibilité est une notion introduite par Snell et Gorer en 1930. Ces derniers ont proposé l'existence de molécules provoquant un rejet de greffe par un organisme receveur de même espèce génétiquement distincte (allogreffe). La reconnaissance allogénique correspond à la réaction des cellules immunitaires du receveur avec les antigènes du donneur. Les principales cibles des cellules immunitaires du receveur contre le greffon sont les molécules de CMH encore appelées système HLA (Human Leucocyte Antigen) chez l'homme. Il désigne un ensemble de gènes, pour certains très polymorphes, qui ont une place centrale dans le système immunitaire adaptatif (Germain,

1994). Leur polymorphisme est tel qu'il est extrêmement rare que deux individus non apparentés possèdent les mêmes formes alléliques de ces molécules HLA. L'incompatibilité HLA représente donc une barrière significative pour le succès d'une transplantation. La reconnaissance de ces molécules de CMH du donneur est le premier événement à l'origine du rejet de greffe dont les LT du receveur sont les principaux effecteurs (Game and Lechler, 2002; Hernandez-Fuentes et al., 1999; Sherman and Chattopadhyay, 1993).

Les molécules de CMH peuvent être de classe I ou II et permettent la présentation d'antigène de sources différentes. Les molécules de CMH de classe I sont des glycoprotéines composées d'une chaîne α polymorphe à trois domaines, associée de façon non covalente à la β 2-microglobuline. Les molécules de CMH de classe I sont exprimées de manière constitutive à la surface de toutes cellules nucléées et sont conçues pour présenter les protéines endogènes cytosoliques et les protéines étrangères provenant d'agents infectieux d'origine virale ou bactérienne. Les cellules exprimant le plus de molécules de CMH I sont les LT, les DC, les macrophages, les cellules épithéliales et endothéliales. Leur niveau d'expression peut être augmenté par l'interféron γ (IFN). Les molécules de CMH I sont reconnues par le TCR des LT CD8⁺ assurant un mécanisme de surveillance dans le but de cibler les cellules infectées en vue de leur destruction (Figure 2).

Cependant, il existe un autre processus qui permet naturellement aux CPA de présenter des antigènes d'origine extracellulaire sur les molécules de CMH I (Carbone and Bevan, 1990). Ce processus est appelé présentation croisée (Figure 2). La présentation croisée concerne non seulement les antigènes de cellules ou de tissus greffés, mais aussi les antigènes bactériens, viraux ou tumoraux. Il a été démontré *in vitro* que les monocytes et les DC sont capables de présenter les peptides dérivés d'antigènes exogènes sur les molécules de CMH I (Norbury et al., 1997), et récemment il a été démontré que les LB peuvent également réaliser ce type de présentation (Heit et al., 2004; Tobian et al., 2005). Cependant des études *in vivo* démontrent que les DC sont les plus efficaces dans ce processus (Jung et al., 2002).

Les molécules CMH de classe II permettent la présentation d'antigènes exogènes, membranaires et endogènes. Ces molécules de classe II sont formées par l'assemblage de deux chaînes polymorphes α et β , ayant chacune un domaine transmembranaire. Elles sont exprimées principalement par les CPA professionnelles (DC, macrophages, LB) et les cellules épithéliales thymiques. Dans les autres cellules, leur expression peut être induite par l'IFN α , β ou γ . Ces molécules de classe II sont reconnues par les LT CD4⁺ et permettent de déclencher une réponse immune (Figure 2).

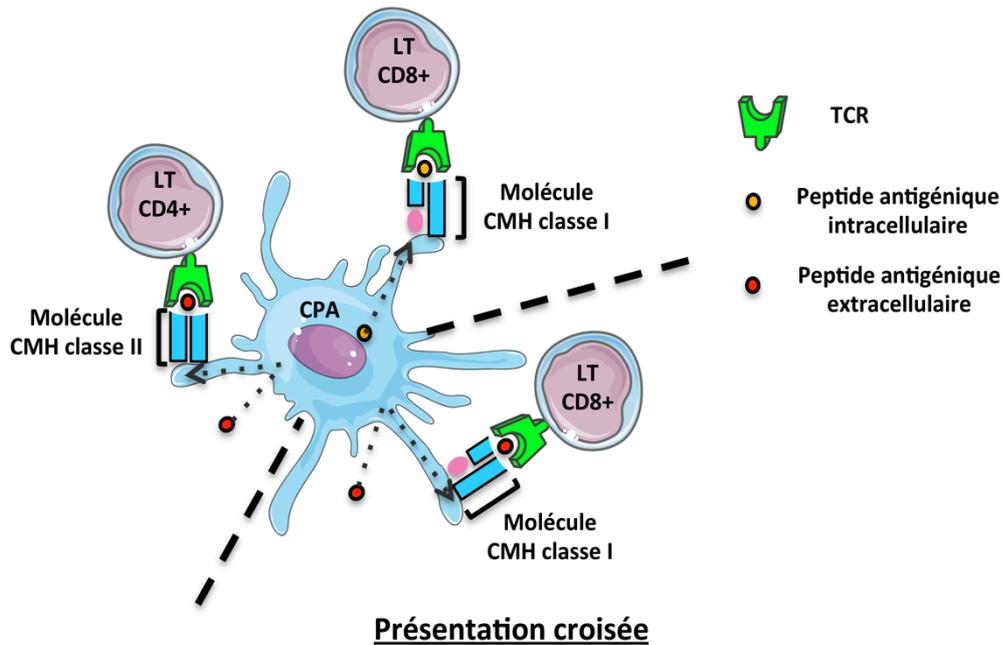


Figure 2: Les différentes présentations antigéniques.

Les CPA présentent des peptides aux LT CD4+ par les molécules du CMH de classe II. Elles présentent également des peptides aux LT CD8+ par les molécules de CMH de classe I. Les CPA ont la possibilité de présenter les peptides exogènes aux LT CD8+ par des molécules de CMH I lors de la présentation croisée.

Même si le rôle des antigènes du CMH est primordial, le rejet peut survenir après une transplantation entre deux individus avec des CMH identiques. Son origine provient alors du polymorphisme propre à chaque individu et se traduit par des peptides différents présentés aux LT par les molécules de CMH (Röttschke et al., 1990; Wallny and Rammensee, 1990). Des molécules du CMH de classe I et II lient et présentent une sélection de peptides dérivés de protéines produites dans la cellule, et si les polymorphismes de ces protéines signifient que des peptides différents sont produits chez différents membres d'une espèce, ceux-ci peuvent être reconnus comme antigènes mineurs d'histocompatibilité. Le plus souvent de nature peptidique, ces complexes mineurs d'histocompatibilité peuvent également provenir de glycoprotéines membranaires, mais aussi de protéines intracellulaires, telles que des facteurs de transcription ou la myosine. Les réponses à ces antigènes sont bien moins fortes que les réponses à des différences de CMH, car la fréquence des LT qui les reconnaissent est beaucoup plus faible, toutefois elle est analogue à une réponse contre les infections virales. Cependant, si la réponse antivirale élimine les cellules infectées, dans le cas des cellules d'un greffon exprimant des antigènes mineurs d'histocompatibilité, c'est le greffon entier qui est détruit par cette réaction. Lors d'une transplantation, il y a une quasi-certitude d'incompatibilité entre deux individus en raison de ces antigènes mineurs d'histocompatibilité.

Une autre contrainte liée au système immunitaire est le système ABO qui est composé par des oligosaccharides présents à la surface de différents types cellulaires et notamment par les érythrocytes

et par l'endothélium vasculaire. Lors de la greffe d'organe solide d'un donneur de groupe A et/ou B chez un receveur O, l'endothélium du greffon sera la cible des anticorps entraînant un rejet hyperaigu (Chopek et al., 1987). La contrainte ABO-rhésus étant toujours respectée (identité ou compatibilité donneur-receveur) dans le cas de la transplantation pulmonaire, elle ne participe pas à l'alloréactivité.

c) Initiation de la réponse alloimmune

Les LT naïfs peuvent être activés dans les organes lymphoïdes secondaires (amygdales, rate, ganglions lymphatiques, plaque de Peyer de l'intestin) suite à la rencontre avec une CPA. En 1970, Bretscher et Cohn proposent un modèle d'activation des LT par plusieurs signaux (Bretscher and Cohn, 1970). Lors de la transplantation d'organe, l'activation des LT requiert la reconnaissance de l'antigène par liaison du CMH avec le TCR des LT (Figure 3). Cette liaison permet de générer le signal 1. Ensuite d'autres molécules complémentaires exprimées sur les CPA et les LT s'associent. En effet, le signal 2 plus communément appelé « co-stimulation » traduit l'interaction entre le CD28 des LT et les CD80/CD86 situés à la surface membranaire des CPA (Sayegh and Turka, 1998). Enfin, un troisième signal est induit pour terminer l'activation des LT. Ce signal 3 provient de l'induction de cytokines stimulatrices (principalement de l'IL-2) de façon paracrine et autocrine. L'IL-2 se fixe avec une forte affinité sur les sous-unités de son récepteur localisé à la surface cellulaire des LT, telles que la sous unité α (CD25), β (CD122) et γ (CD132). Une des premières étapes de l'activation des LT est l'augmentation de l'expression du de l'IL-2 récepteur (CD25), rendant les LT répondeurs à l'IL-2.

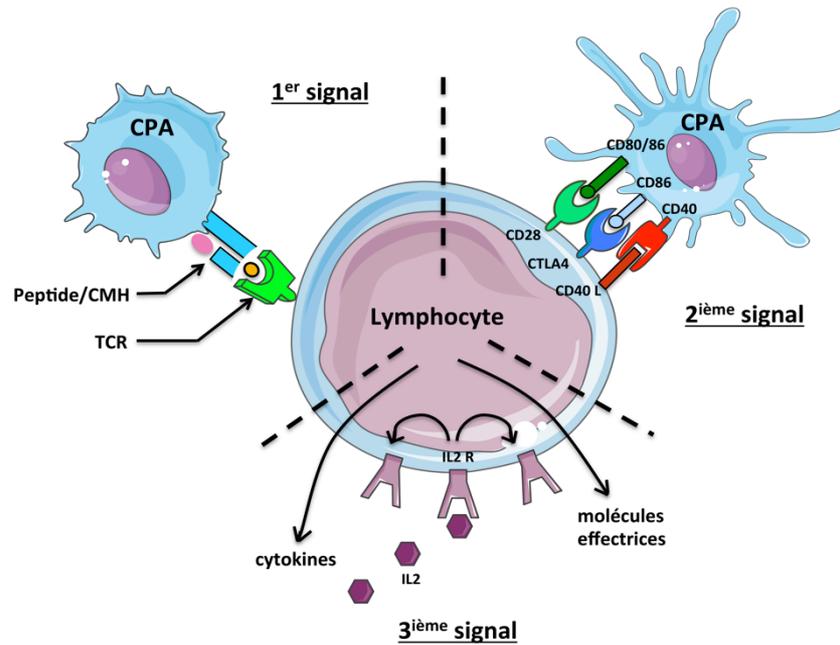


Figure 3: Les différents signaux d'activation du lymphocyte T.

Inspiré de Kahan et al, *Nature reviews immunology*, 2003 (3) :831-838). L'activation des LT s'effectue par trois signaux. Le premier signal correspond à la liaison de la molécule de CMH des CPA avec le TCR du LT. Le second signal, appelé signal de co-stimulation est réalisé par l'interaction du CD28 du LT avec les molécules CD80/CD86 situées à la membrane des CPA. Enfin, le troisième signal se traduit par la sécrétion paracrine et autocrine de l'IL-2 associée à une augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-2 (IL-2R).

d) La polarisation des LT

L'activation des LT est caractérisée par une expansion clonale et une différenciation des LT spécifiques des alloantigènes rencontrés en LT effecteurs (Kaech et al., 2002; Lanzavecchia and Sallusto, 2002). Après leur activation, ils reçoivent d'autres signaux et sous certaines conditions environnementales, se différencient, avec une signature cytokinique et des fonctions spécifiques. Ces LT activés peuvent se différencier en cellules mémoires, qui sont responsables de l'immunité de longue durée. Ces cellules pourront se différencier facilement en cellules effectrices lors d'une seconde rencontre avec l'antigène spécifique.

Les LT CD8+

Les LT CD8+ sont dits cytotoxiques et peuvent être divisés en sous types en fonction de leur production de cytokines, dont Tc1 et Tc2 sont les plus décrits. Les LT CD8+ ont une activité cytolytique et éliminent les cellules étrangères ainsi que les cellules infectées par un virus ou un parasite intracellulaire. La lyse cellulaire médiée par ces cellules est produite par le relâchement de substances cytotoxiques contenues dans des granules. Ces substances incluent la perforine, qui perce la membrane des cellules cibles, et le granzyme B, qui induit l'apoptose de la cellule cible. Les LT CD8+ peuvent aussi détruire les cellules cibles par l'interaction spécifique FAS/FAS ligand en induisant l'apoptose.

Les LT CD4+

Les LT CD4+ jouent un rôle primordial dans l'organisation de la réponse immunitaire. Ils agissent sur la prolifération et la régulation de nombreuses autres cellules du système immunitaire par l'intermédiaire de facteurs solubles qu'ils libèrent. Les LT CD4+ se différencient en LT auxiliaires (helper) : Th1, Th2 et Th17 ou en LT régulateurs distingués par leur profil cytokinique, et leurs différents marqueurs de surface.

Les LT Th1

Les LT Th1 sont impliqués dans la réponse immunitaire contre les cellules infectées par les pathogènes intracellulaires, d'origine virale ou bactérienne. Ils sont caractérisés par la sécrétion d'IFN γ , de l'IL-2, de l'IL-3, des lymphotoxines, du « tumor necrosis factor » (TNF) β ainsi que par l'expression du facteur de transcription T-bet. L'IFN γ peut induire la sécrétion d'IL-2 et inhiber la sécrétion d'IL-10 (Farrar and Schreiber, 1993; Fiorentino et al., 1991; Thierfelder et al., 1996). La présence d'IL-2 induit la différenciation des LT CD4+ en LT Th1. Ils interagissent préférentiellement avec les macrophages et les cellules NK (Figure 4).

Les LT Th2

Les LT CD4+ Th2 sont principalement dirigées vers l'élimination des pathogènes extracellulaires et des parasites. Ils vont principalement sécréter IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 (chez la

souris), IL-13 ainsi que le TGF- β , et sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription GATA3. Cette voie induit, également, l'expansion clonale des LB activés et la production d'anticorps dirigés contre les alloantigènes.

Les LT Th17

Une nouvelle population de LT CD4⁺ auxiliaires sécrétant les cytokines IL-17A et IL-17F, caractérisée par l'expression spécifique du facteur de transcription ROR gamma t (ROR γ t), a été définie comme une sous population distincte des Th1 et Th2, appelées Th17. Cette population est caractérisée par la sécrétion d'IL-17, puissante cytokine pro-inflammatoire agissant sur les cellules épithéliales, endothéliales, stromales et monocytaires en induisant la sécrétion de médiateurs inflammatoires comme CXCL8 (IL-8), CXCL1, TNF- α et des facteurs de croissance (Kolls and Lindén, 2004). Ces effets contribuent à l'amplification des réponses inflammatoires par l'attraction des cellules immunitaires notamment des granulocytes (éosinophiles, neutrophiles) sur le site de l'inflammation.

Les Th17 ont un rôle physiologique dans la protection des muqueuses, et ont été principalement identifiés dans les intestins, la peau et les poumons. Les Th17 ont un rôle prépondérant au niveau pulmonaire, en assurant un rôle anti-bactérien et anti-fongique mais peuvent aussi être pathogènes dans certaines maladies bronchiques comme la BPCO, ou l'asthme allergique (Doe et al., 2010). Les LT CD4⁺ naïves peuvent se différencier en population Th17 sous l'instruction de signaux spécifiques. Chez l'homme l'action conjointe d'IL-1 β , IL-6/IL-23 ou d'IL-23 seule permet la différenciation de LT naïfs en Th17. Néanmoins, certaines études montrent que le TGF- β aide à la différenciation en Th17 de manière indirecte en inhibant la différenciation Th1 au profit des Th17 (Bettelli et al., 2006; Maddur et al., 2012; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006) (Figure 4).

Les LT régulateurs

Les LT régulateurs sont spécialisés dans la suppression de l'activation du système immunitaire aboutissant à l'homéostasie et à la tolérance (Bluestone and Abbas, 2003; Sakaguchi, 2004). Des études démontrent que l'inhibition de la prolifération des LT s'effectue par un contact physique entre les cellules (Bluestone and Abbas, 2003; Shevach, 2002; Toda and Piccirillo, 2006). D'autres études suggèrent que la régulation s'effectue par la sécrétion d'IL-10 et/ou de TGF- β (Annacker et al., 2001; Bickerstaff et al., 2000; Bluestone and Abbas, 2003; Hara et al., 2001; Kingsley et al., 2002; Kitani et al., 2003; Maloy et al., 2003). Il est fortement suggéré que ces deux modes d'actions agissent de façon concomitante durant la réponse immune (Annacker et al., 2001; Bickerstaff et al., 2000; Bluestone and Abbas, 2003; Hara et al., 2001; Kingsley et al., 2002; Kitani et al., 2003; Maloy et al., 2003).

L'identification des LT régulateurs est basée sur l'expression d'antigènes de surface (CD4+, CD25+, CD127+) ainsi que sur l'expression du facteur de transcription Foxp3.

On distingue les LT régulateurs naturels, issus du thymus qui expriment très fortement le marqueur CD45RA et le CCR7 (Valmori et al., 2005) et les LT régulateurs mémoires Tr1 issus de cellules naïves qui sont induites en périphérie par une stimulation CMH/Peptide. Ces derniers produisent de l'IL-10, de l'IL-5 et de l'IFN γ . Les LT régulateurs ont été largement étudiés en transplantation d'organes et représentent à eux seuls une voie thérapeutique majeure (Figure 4).

I.1.2.2.2 Les lymphocytes B

Les LB constituent une population hétérogène de cellules dérivées de la moelle osseuse. Ils peuvent reconnaître des épitopes dans leur forme native par la liaison d'un antigène au récepteur présent à sa surface appelé BCR (B cell receptor). L'internalisation du complexe BCR/antigène aboutit à la dégradation de l'antigène. Les fragments peptidiques obtenus seront associés à des molécules du CMH II, conférant au LB le statut de CPA. Des signaux de co-stimulation sont indispensables à une activation totale du LB (CD19, CD21 et CD81) contribuant à l'amplification du signal. D'autres types d'antigènes, comme le LPS, induisent l'activation des LB en liant plusieurs récepteurs sur la même cellule.

Une fois activés, les LB reçoivent des signaux de prolifération *via* l'interaction entre le CD40L présent à la surface des LT Th2 et le CD40 présent à la surface des LB. Ces derniers sont activés et se divisent rapidement pour se différencier en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps. Ces plasmocytes sont la forme effectrice du LB, produisant la forme sécrétée du BCR et qui a une spécificité antigénique identique. Les anticorps sont des immunoglobulines (Ig), pouvant être de surface ou membranaire et jouant le rôle de médiateur de l'immunité humorale. Ils ont la propriété de se lier spécifiquement à l'antigène, entraînant ainsi trois effets complémentaires : la neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément. Il existe plusieurs classes d'Ig. Les **IgM** sont les premières Ig présentes à la surface des LB lors de l'expression du BCR et sont les premiers anticorps circulants exprimés par les plasmocytes suite à une primo-infection par un agent pathogène. Ils jouent un rôle efficace dans l'agglutination des antigènes, ainsi que dans l'activation du complément. Co-exprimés à la surface des LB, les **IgD** participent à la différenciation des LB en plasmocytes et cellules mémoires. Les **IgG** sont les plus abondantes des anticorps circulants et sont importants dans la détection d'infection *via* l'activation du complément. Il existe quatre sous-classes d'IgG (**IgG1**, **IgG2**, **IgG3** et **IgG4**). Les **IgA** interviennent au niveau des muqueuses (digestives, respiratoires, génito-urinaires), empêchant ainsi la fixation des agents pathogènes aux surfaces des cellules épithéliales. On distingue deux sous classes d'IgA (**IgA1** et **IgA2**). Enfin, les **IgE** sont impliquées dans les mécanismes allergiques (Figure 4).

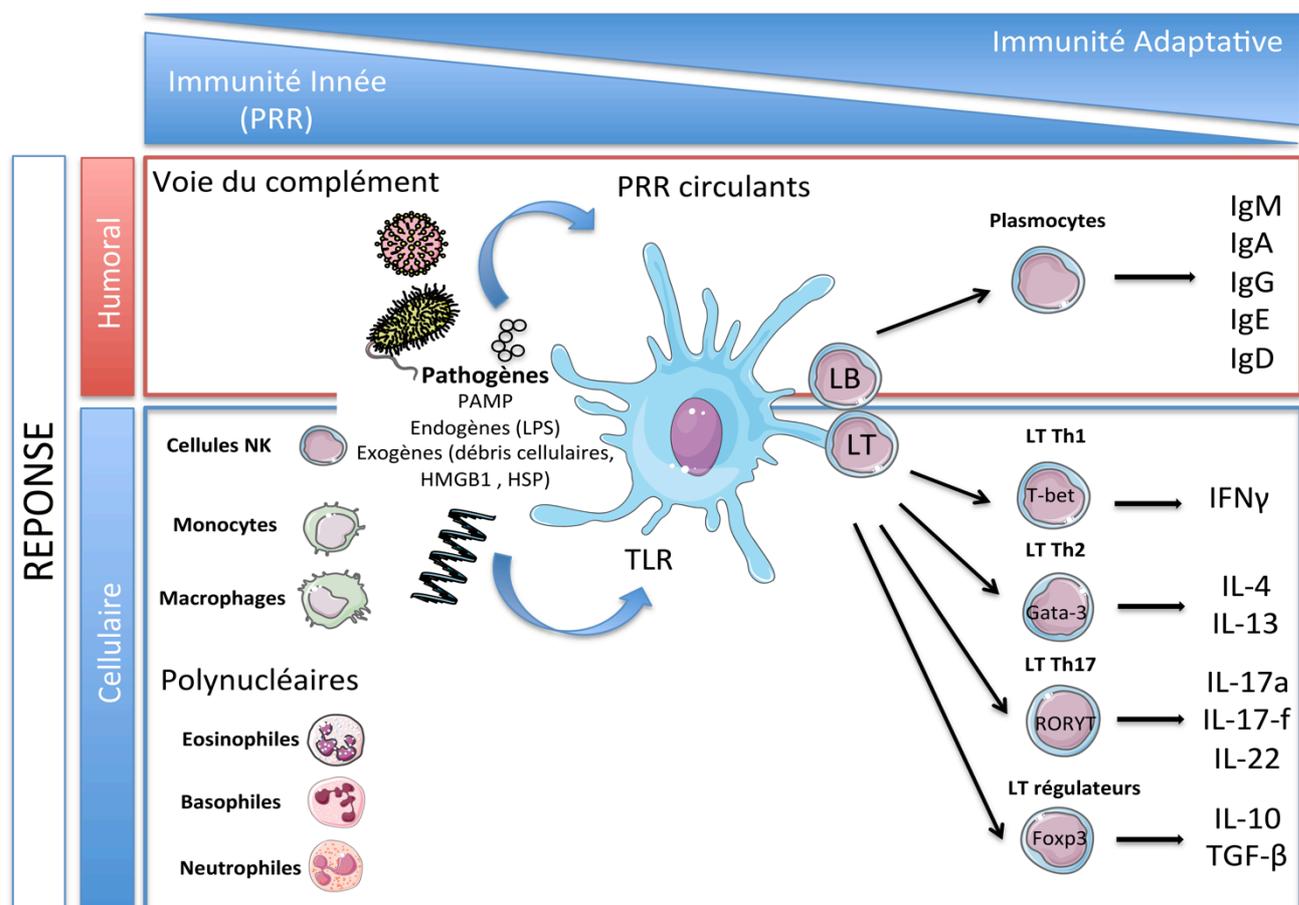


Figure 4: Schéma de l'organisation du système immunitaire et ses différents acteurs.

Présentation des deux composantes du système immunitaire (innée et adaptative) associées aux deux types de réponses (cellulaire et humorale) impliquant différents acteurs (Plasmocytes, LT polynucléaires, cellules NK et CPA).

I.1.3 La réaction immunitaire lors de la transplantation pulmonaire

La transplantation d'un organe d'un individu à un autre individu d'une même espèce provoque une réponse immune rapide et intense. La reconnaissance des antigènes dits « étrangers », encore appelés alloantigènes, présents dans le greffon correspond à la phase initiale du rejet ou reconnaissance allogénique. Ces alloantigènes peuvent varier selon leur distribution tissulaire, leur structure ou leurs fonctions physiologiques. La réaction des cellules immunitaires à l'encontre des alloantigènes se traduit par le rejet de transplantation.

1.1.3.1 Les différentes modalités de la reconnaissance allogénique

La réponse alloimmune correspond à la reconnaissance des antigènes du donneur, considérés comme « non-soi » par les cellules immunitaires du receveur. L'activation du système immunitaire du receveur a lieu au niveau des ganglions drainants l'organe greffé. Les LT ainsi activés prolifèrent puis migrent vers le greffon où ils sont attirés par les molécules d'adhérence exprimées par l'endothélium devenu inflammatoire. L'activation des LT alloréactifs peut s'effectuer selon deux voies principales, mais non mutuellement exclusives: la voie directe et indirecte (Jiang et al., 2004). Ces voies sont définies par l'origine des CPA du donneur ou receveur.

I.1.3.1.1 La reconnaissance directe

La reconnaissance allogénique dite « directe » correspond à une interaction entre les molécules du CMH intactes présentes à la surface des CPA du donneur et le TCR des LT du receveur (Warrens et al., 1994). Classiquement, la voie directe est prédominante dans le rejet aigu (RA). En effet, la sensibilisation des LT alloréactifs ne survient probablement qu'en début de greffe, tant que les CPA du donneur persistent (Figure 5).

Normalement, les LT sont éduqués dans le thymus pour reconnaître spécifiquement les molécules du CMH du soi. Pourtant dans la présentation directe, ces LT sont capables de reconnaître les molécules du CMH allogéniques, suggérant une analogie structurale entre les molécules du soi et du non soi. Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer cette reconnaissance. Le premier modèle dit de **déterminant de haute densité**, suggère que l'énergie nécessaire pour l'activation des LT provient essentiellement de l'interaction directe entre le TCR et la molécule du CMH allogénique, et ce indépendamment du peptide présenté (Bevan MJ et al, 1984). Le second modèle, appelé **modèle du complexe binaire simplifié**, propose que le peptide joue un rôle central dans la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR (Matzinger and Bevan, 1977). Au sein de ce dernier modèle, on peut distinguer la reconnaissance restreinte au peptide. La surface de reconnaissance de la molécule du CMH allogénique possède des différences mineures comparables à la molécule du CMH du soi et n'ayant aucun impact sur l'affinité entre le TCR et la molécule de CMH. Cette reconnaissance s'effectue avec des molécules de CMH allogéniques, qui ont une conservation des acides aminés impliqués dans la surface de présentation. Un autre modèle de reconnaissance, dit dépendant du peptide, suggère que celui-ci joue un rôle dans le maintien de la conformation des molécules du CMH.

I.1.3.1.2 La reconnaissance indirecte

L'existence de l'implication d'une autre voie de reconnaissance provient de l'observation d'un rejet qui s'établit plus lentement et ce, malgré la déplétion des cellules résidentes du greffon. Ainsi il a été suggéré que les molécules du CMH du donneur pouvaient être apprêtées en antigène, et présentées par les CPA du receveur, constituant ainsi la présentation indirecte. La reconnaissance allogénique dite « indirecte » correspond à l'apprêtement des antigènes du donneur par les CPA du receveur qui sont présentés au niveau des molécules du CMH de classe II et classe I (présentation croisée) du receveur et reconnus par les LT. Cette voie de reconnaissance serait plutôt impliquée dans le rejet chronique (Figure 5).

I.1.3.1.3 La reconnaissance semi-directe

Habituellement, les voies directes et indirectes sont considérées comme les seuls mécanismes de stimulation des LT allospécifiques du receveur. Cependant, ces présentations ne peuvent pas tout expliquer. Il a été montré que l'activation des LT CD8+ liée au CPA du donneur (présentation directe) pouvait être amplifiée par les LT CD4+ activés par les CPA du receveur (présentation indirecte). Pour expliquer le lien entre les deux voies de présentation, une troisième voie a été récemment proposée par le groupe de R. Lechler, appelée voie semi-directe (Herrera et al., 2004; Jiang et al., 2004). Les CPA du receveur seraient capables de capturer les fragments membranaires de cellules allogéniques, notamment des cellules endothéliales du greffon (Kreisel et al., 2002), et d'acquérir les molécules du CMH du donneur et de les présenter pour activer les LT (Figure 5). Le transfert de ces molécules peut s'effectuer par contact cellulaire mais aussi par la libération ou la capture de petites vésicules appelées exosomes (Herrera et al., 2004). Dans le contexte d'une transplantation allogénique, les CPA du receveur pourraient ainsi acquérir et présenter des molécules HLA de classe I autologues intactes aux LT CD8+ tout en conservant la possibilité de présenter les mêmes peptides allogéniques par la présentation indirecte au LT CD4+ (Herrera et al., 2004).

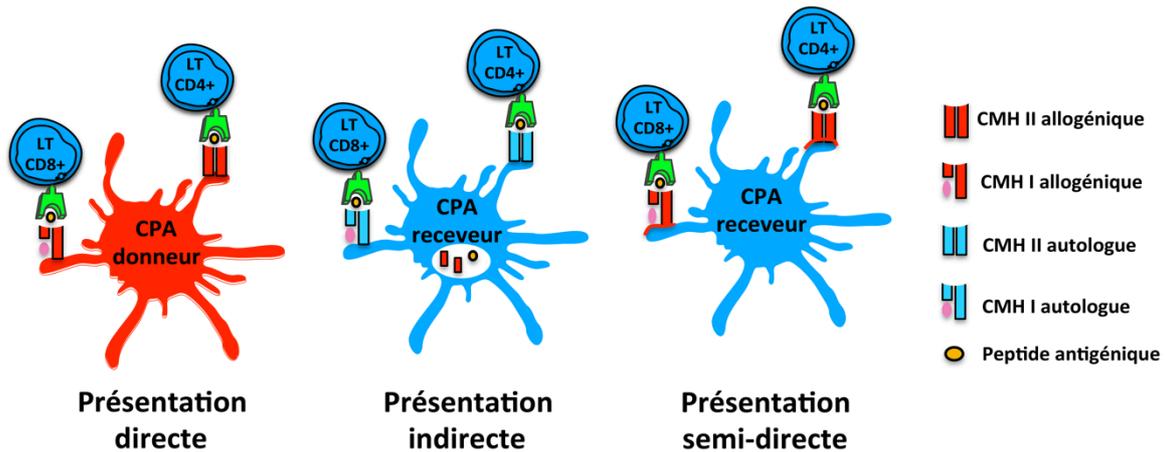


Figure 5: Les différentes voies de la reconnaissance allogénique.

La présentation directe est effectuée entre les CPA du donneur et les LT du receveur. Lors de la présentation indirecte, les CPA du receveur présentent des peptides antigéniques aux LT autologues. La présentation semi-directe permet aux CPA du donneur de présenter des molécules de CMH allogéniques aux LT autologues.

1.1.3.2 Les différents types de rejet

La principale complication de la transplantation est le phénomène de rejet. Ce dernier va dépendre essentiellement de la réaction immunologique du receveur contre le greffon. Cette réaction immunologique est très proche de celle générée au cours de la défense contre les infections, mettant en jeu les différents acteurs du système immunitaire vus précédemment. Il existe plusieurs formes de rejets qui se distinguent par leur cinétique d'apparition, plus ou moins précoce après la transplantation. Les traitements immunosuppresseurs sont indispensables pour diminuer l'intensité de la réponse immune et permettre la survie du greffon. Ils agissent principalement en bloquant les voies de signalisation impliquées dans l'expansion clonale des LT.

1.1.3.2.1 Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu survient dans les heures qui suivent la re-perfusion de l'organe. Il correspond à une réponse massive d'allo-anticorps préformés dans le sérum du donneur à l'encontre des antigènes du receveur exprimés par les cellules vasculaires du greffon. Le rejet hyper aigu s'observe quand le donneur a déjà été exposé à des alloantigènes par des produits sanguins (transfusion), après une grossesse ou une première transplantation. Ces anticorps pré-formés sont

classés en deux catégories : les Ig de faibles affinités (IgM) qui sont spécifiques du système ABO des groupes sanguins, et les anticorps de fortes affinités (IgG) dirigés contre les molécules HLA. Cette reconnaissance entraîne l'activation de la cascade du complément contribuant à la destruction des cellules cibles avec la libération de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-8, CCL2 (encore appelé monocyte chemoattractant protein, MCP-1) ou le facteur de von Willebrand (Nakashima et al., 2002). En réponse, les cellules de l'endothélium vont se rétracter ce qui aboutit à une perte de l'intégrité vasculaire provoquant des hémorragies ainsi que la perte de l'expression de molécules anti-coagulantes ce qui contribuera à la thrombose et à terme à la nécrose de l'organe (Rocha et al., 2003). Afin de prévenir ce type de rejet, l'approche clinique consiste à vérifier la compatibilité donneur-receveur, par la recherche systématique d'allo-anticorps présents chez le receveur. Enfin dans certaines circonstances, il peut être réalisé un renouvellement de plasma, un traitement au rituximab (anti-CD20) ou une splénectomie dans le but d'épurer les anticorps et/ou les plasmocytes.

I.1.3.2.2 Le rejet aigu

Le RA apparaît durant le premier trimestre suivant la transplantation, mais il peut aussi survenir à distance de la transplantation. En l'absence d'immunosuppression, le greffon succombe au RA dans les jours et les semaines suivants. Il est caractérisé histologiquement par une infiltration perivascularaire et/ou peribronchique du greffon par des LT CD4+ et CD8+, plus particulièrement des LT CD8+ avec un phénotype activé ou mémoire (Ibrahim et al., 1995). Le diagnostic de RA est posé formellement sur l'analyse anatomopathologique de biopsies transbronchiques (Chakinala et al., 2005; Colombat et al., 2005).

Le RA peut être le résultat de deux mécanismes immunologiques qui peuvent agir seuls ou de façon combinée (Marks and Finke, 2006). Tout d'abord, le rejet aigu cellulaire est dû à la reconnaissance par les LT du receveur des allo-antigènes du donneur. Le second mécanisme est dépendant des LB, associé à des anticorps spécifiques du HLA du donneur induisant le rejet aigu humoral. La présence d'allo-anticorps donneur-spécifique préexistant à la greffe expose le patient au risque de rejet humoral aigu et augmente vraisemblablement l'incidence du rejet cellulaire.

Les épisodes de RA suspectés ou confirmés se traitent par l'intensification du régime d'immunosuppression. Plusieurs études dans les années 1990s ont montré l'efficacité des bolus de corticoïdes face à ces RA cellulaires. Cependant, il n'existe pas de consensus sur la dose de ces bolus. Les patients réfractaires à ces traitements peuvent avoir recours à des traitements d'induction comme des anticorps anti-récepteur à l'IL-2/CD25 (basiliximab, daclizumab), des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules exprimant le marqueur CD3 (OKT3), ou des anticorps monoclonaux anti

CD52 (alemtuzumab) (Reams et al., 2007). De façon moins courante, certains traitements du rejet aigu peuvent inclure une irradiation lymphoïde ou une photophorèse.

Un autre type de rejet appelé « dysfonction chronique du greffon » apparaît plus tardivement après la transplantation et est aujourd'hui la principale cause de perte du greffon en transplantation d'organes solides. Mes travaux de thèse portent sur les mécanismes associés à ce rejet, c'est la raison pour laquelle une présentation détaillée de ce dernier est effectuée dans la partie suivante de mon introduction.

I.2 La dysfonction chronique du greffon

Le CLAD est l'obstacle majeur de la réussite à long terme de la transplantation pulmonaire. Le taux de survie à 5 ans des patients transplantés pulmonaires est seulement de 50% (Christie et al., 2009), ce qui est significativement inférieur aux autres transplantations d'organes solides (Sumpter and Wilkes, 2004). Cette dysfonction se traduit par une détérioration lente, progressive et irréversible de la fonction pulmonaire causée par une atteinte vasculaire ou une atteinte au niveau des bronchioles (Boehler et al., 1998). Son mécanisme physiopathologique est principalement dû à l'inflammation, aux attaques à répétition du greffon d'origine immune ou non-immune ainsi qu'une réparation tissulaire qui se réalise de façon excessive. Le CLAD a été initialement associée au syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS).

I.2.1 Manifestations cliniques et fonctionnelles du CLAD

I.2.1.1 La bronchiolite oblitérante

Le syndrome ventilatoire obstructif survient plusieurs années après la transplantation et est la conséquence de l'oblitération des petites voies aériennes ou BO (Nicod, 2006). Cette dernière fut décrite pour la première fois en 1984 (université de Stanford), chez un patient transplanté cœur-poumon qui avait une diminution progressive du volume maximal expiré en une seconde (VEMS) (Burke et al., 1984) (Figure 6). La biopsie transbronchique a révélé un dépôt fibromyxoïde intraluminal et un infiltrat d'eosinophiles dans la sous-muqueuse bronchique. Ces lésions anatomiques contribuent à l'apparition de la BO. Cette dernière se définit par une obstruction progressive des voies aériennes associée à une détérioration de la fonction respiratoire. Il existe également une atteinte

vasculaire, qui est la forme la moins fréquente et la moins morbide, caractérisée par une athérosclérose de la vascularisation pulmonaire (Saggar et al., 2008; Stewart et al., 2007).

La BO aboutit à la perte du greffon, à une insuffisance respiratoire terminale et à terme à une indication de re-transplantation (Trulock et al., 2007). Si certains facteurs de risques sont suspectés ou confirmés, les mécanismes de la BO sont encore mal connus. Il n'existe aucun marqueur précoce prouvé qui permettrait un diagnostic et une prise en charge précoce.

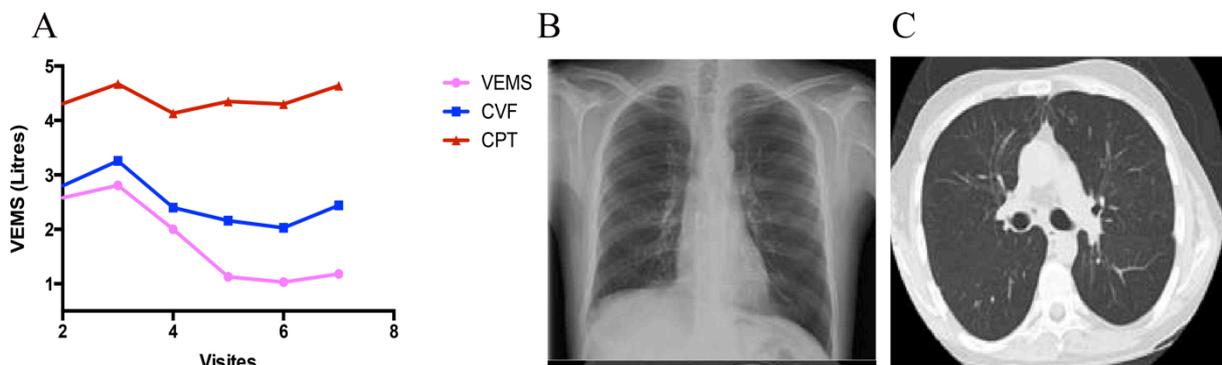


Figure 6 : Mesure de volumes pulmonaires et radiographie de patients atteints de bronchiolite oblitérante.

(A) Mesures du VEMS, de la capacité vitale forcée (CVF) et de la capacité pulmonaire totale (CPT) chez un patient atteint de BO. (B) Radiographie pulmonaire et (C) Scanner thoracique d'un patient atteint de BO. D'après M. Sato, *JHLT* 2011, Vol13 issue 7, pages 735-742.

1.2.1.2 Le syndrome restrictif

De récentes publications ont identifié un syndrome restrictif, appelé RAS (Restrictive allograft syndrome) qui correspond à un autre groupe de dysfonction chronique du greffon (Sato et al., 2011). Du à un processus fibrosant intra-parenchymateux, il se traduit par une diminution des volumes expirés maximaux et une diminution de la CPT (Figure 7). Le diagnostic est établi par l'existence d'un syndrome restrictif associé à des lésions parenchymateuses se traduisant par un syndrome interstitiel radiologique (Sato et al., 2011) (Figure 7). Ce syndrome restrictif semblerait corrélé avec l'inflammation et le processus fibrotique, pouvant à terme contribuer à la dysfonction chronique du greffon. Le diagnostic d'un RAS chez un patient est associé à un plus mauvais pronostique.

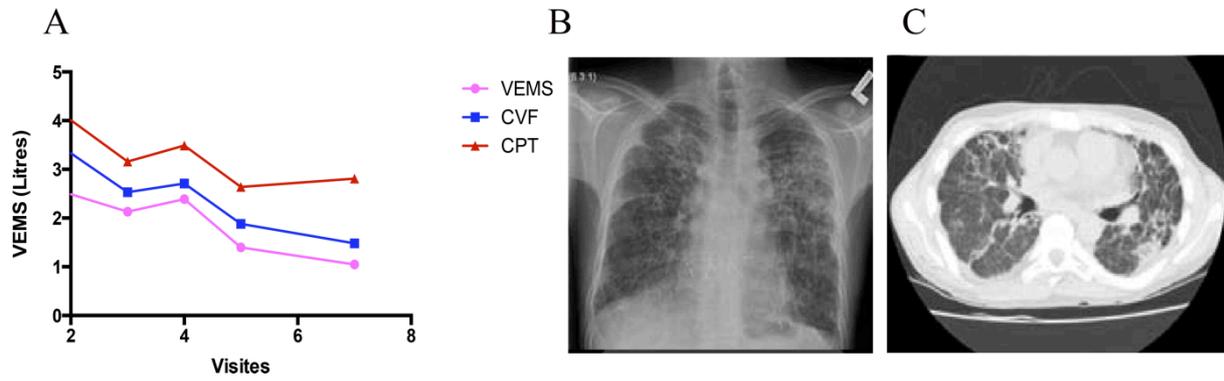


Figure 7 : Mesures de volumes pulmonaires et radiographie d'un patient atteint d'un syndrome restrictif.

(A) Mesures du VEMS, de la CVF et de la CPT chez un patient atteint de RAS. (B) Radiographie pulmonaire et (C) Scanner thoracique d'un patient atteint de RAS. D'après M. Sato, *JHLT* 2011, *Voll3 issue 7*, pages 735-742.

Récemment, différents phénotypes de CLAD ont été identifiés. Certains patients classifiés BO démontrent une amélioration de leur VEMS après un traitement à l'azithromycine. Ces patients sont caractérisés par la présence de neutrophiles dans les LBA ($\geq 15\%$) en l'absence de toute infection. Ce nouveau phénotype est appelé « neutrophilic reversible allograft dysfunction » (NRAD). Ces patients ont généralement un meilleur pronostic (Vanaudenaerde et al., 2008a). Les auteurs suggèrent de considérer les patients qui ne répondent pas à l'azithromycine comme des patients atteints de BO fibreuse (Federica et al., 2011).

1.2.1.3 La prise en charge du CLAD

Le maintien de l'immunosuppression chez la plupart des patients transplantés pulmonaires est basé sur une triple médication comprenant des inhibiteurs de la calcineurine (Ciclosporine A ou Tacrolimus), des anti-métabolites comme l'azathioprine, le mycophenolate mofetil (MMF) et des stéroïdes. Le groupe des inhibiteurs mTOR (mammalian target of rapamycin) composé de l'everolimus ou du sirolimus, peut être utilisé en substitution des inhibiteurs à la calcineurine ou des anti-métabolites.

L'intensification ou la modification du traitement immunosuppresseur est l'attitude habituelle de prise en charge du CLAD (Corris, 2003). Par exemple des patients sous azathioprine et ciclosporine A, peuvent changer pour Tacrolimus et/ou MMF. Des études ont démontré que ces changements permettent de stabiliser des patients en rejet chronique (Groetzner et al., 2006; Whyte et al., 1997)

mais ne sont pas contrôlées. D'une manière générale, la stabilisation de la fonction pulmonaire pourrait être attribuée à l'intensification du suivi médical plutôt qu'à l'augmentation de thérapeutique.

Le CLAD regroupe deux phénotypes : la BO et le RAS. Cependant, la description récente du RAS associée à sa faible fréquence d'apparition sont les raisons pour lesquelles mes travaux de thèse portent sur les mécanismes associés au développement de la BO. Une présentation détaillée de la BO est effectuée dans la partie suivante de mon introduction.

I.2.2 Physiopathologie de la BO

I.2.2.1 Mise en évidence et classifications de la BO

Selon la société internationale de transplantation cardio-pulmonaire (ISHLT), le diagnostic de BO repose sur l'évaluation de critères spirométriques et histologiques (Tableau 1). Les mesures de fonction respiratoire sont fréquemment réalisées dans le cadre du suivi du transplanté pulmonaire. La BO se définit par une diminution du VEMS (témoignant de l'obstruction) sans cause évidente de dysfonction pulmonaire (complications anastomosiques, infections, rejets aigus, réapparition de la maladie d'origine) (Estenne et al., 2002). La référence du VEMS est définie par la moyenne des deux plus grandes valeurs obtenues sans l'utilisation de bronchodilatateurs, au plus tard trois semaines après la transplantation pulmonaire. Les patients sans obstruction bronchique sont classés BOS 0 (VEMS > 90% de la valeur de référence). Les autres grades de classification reflètent le degré d'obstruction (Estenne et al., 2002). En 2003, la nouvelle classification introduit un stade BOS 0-p, identifiant les patients potentiellement BO.

Classification de la BO (2003)	
BOS 0	VEMS > 90% du VEMS de base et VEMS ₂₅₋₇₅ > 75 % de la valeur de base
BOS 0 p	VEMS > 81-90 % du VEMS de base et/ou VEMS ₂₅₋₇₅ ≤ 75 % de la valeur de base
BOS 1	VEMS entre 66-80% du VEMS de base
BOS 2	VEMS entre 51-65% du VEMS de base
BOS 3	VEMS ≤ 50% du VEMS de base

Tableau 1: Classification des stades de la bronchiolite oblitérante.

Classification revue en 2003 selon l'ISHLT pour y inclure le stade BOS 0p et le VEMS₂₅₋₇₅ (correspondant au débit expiratoire maximum médian) comme critère fonctionnel.

Dans le cadre du diagnostic de la BO, les biopsies transbronchiques servent essentiellement à exclure d'autres diagnostics, comme les infections et les RA (Aboyoun et al., 2001; Chakinala et al., 2004; Hopkins et al., 2002). Leur utilisation peut être bénéfique pour découpler l'association entre le RA et la BO (Swanson et al., 2000). Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) peuvent être réalisés en complément de la spirométrie et des biopsies, permettant d'obtenir une information sur la composition cellulaire pulmonaire et éliminer le diagnostic d'infection. Cependant, la pratique de LBA et de biopsies est invasive et elle n'est pas réalisée de façon systématique dans le suivi de patients transplantés pulmonaires.

I.2.2.2 Les facteurs de risques associés au développement de la BO

Plusieurs facteurs de risques sont identifiés ou suspectés (Sharples et al., 2002), pouvant agir seuls ou de façon combinée (Belperio et al., 2003a; Knoop and Estenne, 2006a). Ces derniers peuvent être classés en deux groupes : des facteurs allo-dépendants et allo-indépendants.

I.2.2.2.1 Les facteurs de risques dits « allo-dépendants »

Certains facteurs de risque dits allo-dépendants provoquent des lésions épithéliales et endothéliales sévères et contribuent à l'environnement inflammatoire pouvant déclencher une réponse allogénique (Figure 8).

a) Le rejet aigu

De nombreuses études rétrospectives ont montré que les épisodes de RA constituaient un facteur de risque très significatif de BO, d'autant qu'ils sont sévères répétés et précoces (Estenne et al., 2002; Heng et al., 1998a; Husain et al., 1999; Sharples et al., 1996, 2002). En effet, le RA correspond à une réponse immune dirigée contre les cellules épithéliales et endothéliales, capable d'initier le processus de BO. Cependant, certains patients ayant eu des épisodes de RA ne développent jamais de BO, tout comme certains patients développent une BO sans avoir eu de RA (Jackson et al., 2002).

b) La bronchite lymphocytaire

De la même façon, la bronchite ou bronchiolite lymphocytaire, qui se manifeste au niveau des voies respiratoires en absence de rejets ou d'infections, est associée au développement de la BO (Husain et al., 1999; Ross et al., 1997). Dans une étude rétrospective de 341 transplantés pulmonaires, la sévérité de la bronchiolite lymphocytaire semble être un facteur de risque important dans le développement de la BO (Glanville et al., 2008). Ce processus pourrait correspondre à une forme de rejet aigu.

c) L'incompatibilité HLA

En lien avec les épisodes de rejets ou indépendamment de ceux-ci, l'incompatibilité HLA pourrait être en soi un facteur de risque de BO. La production d'anticorps anti-HLA de classe I et II après la transplantation pulmonaire est associée à la BO (Knoop and Estenne, 2006; Palmer et al., 2002). La présence de tels anticorps augmente le risque de persistance/récurrence de rejet aigu cellulaire, de bronchite lymphocytaire et de BO (Girnit et al., 2004, 2005). En effet, les patients avec des anticorps anti-HLA avant la transplantation augmentent leurs risques de développer un RA et une BO (Lau et al., 2000). Toutefois, l'influence de l'incompatibilité HLA est encore discutée. Les résultats du registre de l'ISHLT démontrent qu'au moins 4 incompatibilités HLA sont associées à un mauvais pronostic de survie (Trulock et al., 2007). Les cellules épithéliales, capables d'exprimer des molécules de CMH de classe I, deviennent une cible pour le système immunitaire du receveur (Rabinowich et al., 1990). L'expression de ces molécules de CMH par ces cellules épithéliales est augmentée durant le rejet chronique (Iacono et al., 1997; Räisänen-Sokolowski et al., 1998).

II-2.2.2 Les facteurs de risques dits « allo-indépendants »

Au cours de toute transplantation pulmonaire, le greffon subit des dommages liés à l'intervention chirurgicale, plus particulièrement à l'explantation, l'ischémie froide, aux lésions mécaniques liées à sa manipulation et à la reperfusion. Ces lésions augmentent le risque de dysfonction primaire du greffon, pouvant être de gravité très variable, les plus sévères interférant avec la survie à long terme des patients et augmentant le risque de BO (Christie et al., 2005). De plus, le poumon est un organe exposé à des agents inhalés comme des micro-organismes, des toxines ou des agents irritants. Ces derniers peuvent interagir directement avec les cellules épithéliales ou les cellules phagocytaires des voies aériennes et déclencher une réaction inflammatoire (Toews GB et al., 2005 ;

Johnston SL et al., 2005) (Figure 8). Ces agressions sont autant de facteurs à même de déclencher ou de renforcer la réaction allogénique en stimulant l'immunité innée, et ainsi de multiplier le risque de CLAD.

a) Les infections

Les infections bactériennes et fongiques sont connues pour directement contribuer au développement de la BO et à l'augmentation de fréquence des RA (Girgis et al., 1996). L'infection au cytomégalovirus (CMV) constitue un facteur de risque de la BO (Borchers et al., 1999; Smith et al., 1998). Cette infection pourrait agir par le biais d'une régulation positive de l'expression des antigènes CMH sur les cellules endothéliales et épithéliales, sous l'influence de cytokines produites au cours de l'infection virale (Borchers et al., 1999) et de l'immunosuppression. Le CMV partage des homologies de séquences d'acides nucléiques avec les molécules de CMH de classe I et l'antigène HLA-DR (Luckraz et al., 2003). Dans certaines études, l'infection au CMV constitue un facteur de risque indépendant du développement de la BO (Heng et al., 1998a; Kroshus et al., 1997; Smith et al., 1998), mais son rôle reste encore discuté (Bando et al., 1995; Husain et al., 1999; Luckraz et al., 2003; Tamm et al., 2004; Valentine et al., 1996).

Les infections par des virus respiratoires syncytial, parainfluenza, adenovirus, influenza A et B, sont fréquentes chez les patients transplantés pulmonaires (Billings et al., 2001; Vilchez et al., 2001). Cependant, le lien de causalité avec l'apparition de la BO n'a pu être clairement établi. Certaines infections virales, telles que la pneumonie à chlamydia (Kotsimbos et al., 2005) ou au virus humain de l'herpès 6 (virus de la roséole) (Neurohr et al., 2005) peuvent augmenter le risque de RA cellulaire et de BO. D'autres exemples de pathogènes, comme la colonisation au *Pseudomonas aeruginosa* peuvent possiblement augmenter le risque de développer une BO (Botha et al., 2008; Vos et al., 2008). Récemment, il a été démontré que les infections à *Aspergillus sp.* augmentent le risque de BO et de décès (Weigt et al., 2013a). Billings et coll. ont prouvé que les patients présentant des infections virales sont prédisposés au développement de la BO de haut grade (Billings et al., 2002).

b) La dysfonction primaire du greffon

La dysfonction primaire du greffon résulte principalement des lésions créées par l'ischémie du greffon. L'ischémie est la résultante de deux mécanismes. Premièrement, l'ischémie chronique est provoquée par l'interruption de la vascularisation de l'artère bronchique lors de la réimplantation. Le second mécanisme, appelé ischémie froide, provient du temps entre le prélèvement de l'organe sur le

donneur et la transplantation chez le receveur. Cette dysfonction primaire est associée à un mauvais pronostic de survie (Daud et al., 2007; Prekker et al., 2006). La survie à long terme post-greffe pulmonaire, prenant en compte toutes les causes de décès, dont la BO, est plus courte lorsque le temps d'ischémie/re-perfusion est plus long (Thabut et al., 2005). Dans une étude rétrospective monocentrique, les auteurs ont montré que les patients avec une dysfonction primaire du greffon avaient un haut risque de développer une BO, et ce indépendamment des épisodes de rejet aigu, de bronchite lymphocytaire ou d'autres infections (Daud et al., 2007).

c) Le reflux gastro-oesophagien

Le reflux gastro-oesophagien (RGO) intervient de façon fréquente après la transplantation pulmonaire (D'Ovidio et al., 2005). Le RGO est principalement dû aux lésions du nerf vague lors de l'acte chirurgical et aux traitements immunosuppresseurs. Le mécanisme par lequel le RGO est impliqué dans la BO est mal connu, mais il peut participer aux agressions répétées sur le greffon (Knoop and Estenne, 2006) constituant ainsi un facteur de risque de la BO.

La présence d'acide biliaire et de pepsine dans les LBA de patients transplantés pulmonaires suggère que leur aspiration peut provoquer des lésions épithéliales (D'Ovidio et al., 2005; Young et al., 2003). De plus, le traitement du RGO avec des inhibiteurs de la pompe à proton réduit le RGO mais n'affecte pas le reflux médié par la bile ou les pepsines (Young et al., 2003). La présence de bile ou de pepsine dans les LBA pourrait constituer un facteur de risque de la BO (Young et al., 2003). Une étude rétrospective a démontré que le recours à la technique chirurgicale de fundoplicature précoce (3 mois après la transplantation) était associé au non-développement de la BO (Blondeau et al., 2008; Cantu et al., 2004) et à l'amélioration de la fonction respiratoire chez des patients transplantés pulmonaires avec un RGO (Davis et al., 2003).

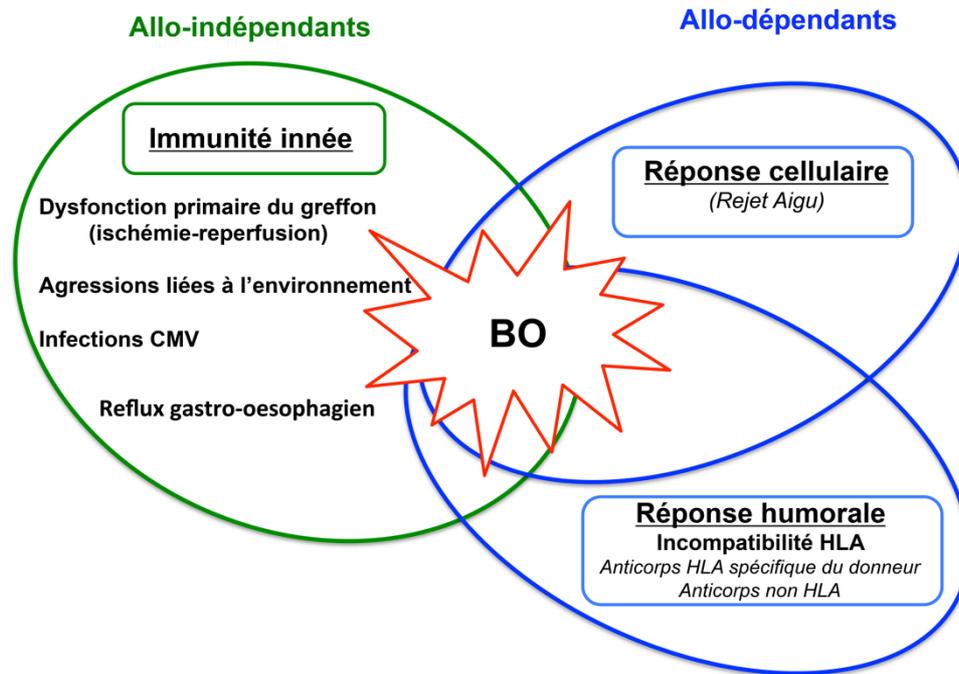


Figure 8: Les différents facteurs de risques de la bronchiolite oblitérante.

Représentation schématique des différents facteurs de risques, d'origine allo-dépendant et allo-indépendant, impliqués dans le développement de la BO.

1.2.2.3 Les mécanismes physiopathologiques de la BO

Les mécanismes physiopathologiques de la BO sont encore mal connus. La BO serait la résultante d'agressions, principalement dues au contexte inflammatoire auquel contribue la réponse immune, qui initie une réparation tissulaire anormale et aboutit à l'obstruction bronchique.

1.2.2.3.1 Le processus inflammatoire

Le processus inflammatoire associé au développement de la BO provient tout d'abord des différentes réponses allogéniques entre les cellules du greffon et les LT du receveur. L'activation des voies directes et indirectes de l'allo-reconnaissance est capable d'induire une réponse inflammatoire dirigée contre le greffon en dépit du traitement immunosuppresseur. Indépendamment du contexte allogénique, l'ischémie du greffon, l'acidité du RGO et les divers pathogènes, décrits précédemment dans les facteurs de risques, peuvent contribuer à ce processus inflammatoire soit directement soit en réactivant l'alloréactivité par la surexpression des molécules du CMH.

La réponse inflammatoire se traduit par l'afflux de cellules inflammatoires dans les bronchioles (Elssner et al., 2000a; Reynaud-Gaubert et al., 2002a; Scholma et al., 2000), attirées par des chimiokines (IL-8, RANTES, MCP-1) produites par les cellules épithéliales, les LT activés, les macrophages et les cellules musculaires lisses (CML). En réponse à cette agression, diverses sécrétions de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17, IL-13) vont permettre une boucle d'amplification maintenant le contexte inflammatoire (Keane et al., 2007; Reynaud-Gaubert et al., 2002a; Scholma et al., 2000).

a) Implication des polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles ont largement été étudiés et sembleraient contribuer au développement de la BO. En effet, une augmentation du nombre de neutrophiles (et d'éosinophiles) est retrouvée dans les LBA de patients atteints de BO (Reynaud-Gaubert et al., 2000, 2002a; Scholma et al., 2000; Zheng et al., 2000) comparés aux patients stables (Slebos et al., 2002; Snell et al., 1997; Ward et al., 2001; Zheng et al., 2000).

La neutrophilie dans les LBA a été proposée comme marqueur prédictif de la BO (DiGiovine et al., 1996; Reynaud-Gaubert et al., 2000). Certaines études démontrent que la présence de neutrophiles dans les LBA pourrait prédire le stade BOS 1 (DiGiovine et al., 1996; Reynaud-Gaubert et al., 2000, 2002a). Cette neutrophilie est également retrouvée dans les expectorations induites (Beeh et al., 2001; Mamessier et al., 2006, 2007) et dans les biopsies pulmonaires (Devouassoux et al., 2001). Un des médiateurs les plus importants de l'inflammation pulmonaire lié à la BO est l'IL-8, qui attire et active les neutrophiles. Cette cytokine est sécrétée par les CEB (Elssner et al., 2000a) et les CML (DiGiovine et al., 1996) et sa concentration dans les LBA de patients atteints de BO est hautement corrélée avec la neutrophilie (DiGiovine et al., 1996; Elssner et al., 2000a; Reynaud-Gaubert et al., 2002a; Riise et al., 1999; Scholma et al., 2000). Cependant, la présence de ces neutrophiles dans les LBA est encore discutée : est-ce une caractéristique spécifique de la BO ou bien le reflet d'infections concomitantes au développement de la BO ?

L'activation des neutrophiles peut contribuer à la destruction du greffon par la production de ROS (reactive oxygen species) et de protéases (Elssner and Vogelmeier, 2001). Des marqueurs de l'activation des granulocytes, comme les enzymes oxydatives myéloperoxidase et protéines cationiques éosinophiles, sont détectées dans les LBA plusieurs mois avant le diagnostic clinique de la BO (Behr et al., 2000; Hirsch et al., 1999; Meyer et al., 2001; Riise et al., 1999). Bien que le stress oxydatif chez des patients transplantés pulmonaires indemnes de BO reste encore discuté (Williams et al., 1999), il se retrouve augmenté lors du développement de la BO (Behr et al., 2000; Hirsch et al.,

1999). L'augmentation de ce stress reflète l'influx des neutrophiles. Cependant, l'augmentation de fer, causée par des lésions microvasculaires peut amplifier ce stress oxydatif (Dai et al., 2002; Reid et al., 2001).

La BO est associée à un défaut d'activité d'anti-protéase, qui a été mise en évidence par une diminution de sécrétion de protéases inhibitrices des leucocytes dans les LBA de patients atteints de BO (Hirsch et al., 1999). L'activité de la neutrophile élastase est fréquemment retrouvée dans les LBA des patients transplantés pulmonaires, et est associée à une infection bactérienne dans le contexte de la BO (Heng et al., 1998a). Actuellement, il n'y a pas de lien clairement établi entre le stress oxydatif et la diminution d'activité des protéases/antiprotéases.

b) Implication des autres acteurs de la réponse innée

Dans le cadre de la transplantation pulmonaire, des études génétiques soulignent l'importance de la réponse innée et des TLRs dans le développement de la BO. Des polymorphismes sur le gène codant le TLR4 et le CD14, liant le LPS ont été démontrés comme ayant un impact dans le développement de la BO. Les transplantés pulmonaires avec un polymorphisme de type perte de fonction du TLR4, développent moins de rejet aigu et ont tendance à développer une BO de grade réduit (Palmer et al., 2005). Au contraire, les patients avec un polymorphisme de type gain de fonction sur le gène codant pour le CD14, développent une BO de façon précoce, associée à une survie moindre (Palmer et al., 2007).

Les biopsies bronchiques de patients atteints de BO mettent en évidence une augmentation du nombre de DC et de macrophages (Leonard et al., 2000; Yousem et al., 1990). Ces DC expriment des molécules de co-stimulation appartenant à la famille B7 (plus particulièrement B7-2) capables d'induire une stimulation optimale des LT (Leonard et al., 2000). De plus, ces cellules peuvent probablement initier localement la réponse immune, contribuant au processus de rejet chronique. Les travaux de notre groupe sur l'interaction entre les LT et les monocytes sanguins dérivés en DC (moDC) ont démontré que ces moDC produisaient significativement plus d'Indoléamine 2-3 dioxygénase (IDO) chez les receveurs tolérants par rapport à ceux atteints de BO (Botturi et al., 2008). IDO est une enzyme impliquée dans le métabolisme du tryptophane, et est impliquée dans l'induction des LT régulateurs par les DC (Hwu et al., 2000). Dans cette même étude, nous avons observé une surexpression de CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4), co-récepteur impliqué dans l'induction de la tolérance (Eagar et al., 2002), sur les LT de patients indemnes de rejet chronique, et de façon indépendante de traitement immunosuppresseur. Inversement chez les patients atteints de BO,

cette interaction induisait un phénotype pro-inflammatoire des LT avec expression du co-récepteur ICOS (Inductible Co-Stimulatory molecule).

c) Implication de la réponse immune adaptative

Chez l'homme, l'infiltrat lymphocytaire a également été associé à la BO, mais de façon moins évidente. En effet, des études ont comparé les populations lymphocytaires de patients transplantés stables et de sujets atteints de BO. Certains groupes ont démontré une augmentation des LT CD4+ et CD8+ (Milne et al., 1994), d'autres une expansion oligoclonale de LT CD4+ et d'autres encore une augmentation de la sous-population CD8+ seulement (Hodge et al., 2005; Zheng et al., 2005). Une étude prospective récente démontre une corrélation entre les LT CD8+ mémoire et le risque de RA (San Segundo et al., 2013).

Concernant l'étude des différentes sous-populations de LT, notre groupe a pu mettre en évidence une activation des LT Th1, mais aussi Th2 (Mamessier et al., 2006) et Th17 (Magnan et al., 1994, 1996) chez des patients atteints de BO. Le rôle exact de ces différentes sous populations de lymphocytes dans la BO reste à être déterminé. Les LT régulateurs ont été largement étudiés en transplantation d'organes représentant à eux-seuls une voie thérapeutique majeure (Joffre et al., 2008). Dans une étude de 21 transplantés pulmonaires, une diminution de la quantité de cellules CD4+ CD25+ circulantes chez les patients atteints de BO a été observée par rapport aux sujets transplantés sans complication et à un groupe de volontaires sains, (Meloni et al., 2004). Dans notre expérience, des résultats plus contrastés ont été obtenus (Mamessier et al., 2007), avec une augmentation des LT régulateurs chez des patients atteints de BO stabilisée. Cependant, ces résultats ont été obtenus sur un petit nombre de malades et de façon transversale. Il est évidemment important de savoir si ces résultats seraient obtenus chez les mêmes patients avant la survenue de la BO, permettant un diagnostic précoce de la complication.

I.2.2.3.2 Le processus fibrotique

En réponse aux agressions répétées, une réparation tissulaire se met en place. L'activation des fibroblastes et le dépôt de matrice extracellulaire (MEC) contribuent à un mécanisme physiologique lors du processus de cicatrisation. Toutefois, ce processus de réparation se réalise de façon excessive et aberrante dans la BO. L'augmentation de l'activité de prolifération des fibroblastes dans les LBA précéderait l'altération de la fonction respiratoire (Jonosono et al., 1999). Cependant, le dosage de ces

marqueurs n'est pas réalisé systématiquement dans le suivi de patients transplantés pulmonaires, il est donc difficile de déterminer si ces marqueurs pourraient prévenir ou protéger de la BO.

Lors de leur activation, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes, caractérisés par l'expression de l'actine α du muscle lisse (α -SMA), un phénotype intermédiaire entre les fibroblastes et les CML. Les myofibroblastes sont les cellules effectrices de la fibrose par leur capacité augmentée à produire du collagène interstitiel. Le TGF- β 1 joue un rôle clé dans l'augmentation de la différenciation des myofibroblastes (Tomasek et al., 2002). Ces myofibroblastes sont observés dans les lésions de BO (Bröcker et al., 2006; Lama et al., 2006) et participent au dépôt excessif de MEC (Tomasek et al., 2002).

D'autres cytokines pro-fibrotiques contribuent à ce processus telles que MCP-1 (Scholma et al., 2000), RANTES (Reynaud-Gaubert et al., 2002a), le PDGF (Platelet growth factor) (Hertz et al., 1992), l'IGF (insuline growth factor)-1 (Charpin et al., 2001), le TGF- β 1 (El-Gamel et al., 1999; Elssner et al., 2000a; Magnan et al., 1996) et sont augmentées chez les patients atteints de BO. Ces cytokines pro-fibrotiques sont responsables de l'augmentation de l'activité de prolifération des fibroblastes dans les surnageants de LBA (Jonosono et al., 1999). Récemment, il a été démontré que l'augmentation de la concentration de l'hyaluronane dans les LBA et plasma de patients transplantés pulmonaires, pourrait contribuer au développement de la BO par l'activation de l'immunité innée (Todd et al., 2014). L'IL-13, cytokine pro-Th2, associée à une surexpression de pro-collagène I et III contribue au phénomène fibroprolifératif de la BO (Keane et al., 2007; Lama et al., 2006). Le récepteur de cette cytokine est exprimé par les myofibroblastes, les cellules épithéliales et les CML chez les patients atteints de BO (Lama et al., 2006). L'attraction des neutrophiles et éosinophiles peut également être induite par l'endothéline-1. Cette dernière possède des propriétés pro-fibrotiques et est impliquée dans le remodelage bronchique ainsi que plusieurs maladies inflammatoires. Sa production est augmentée lors d'infections bactériennes chez les patients transplantés pulmonaires (Charpin et al., 2001).

a) Implication de l'épithélium

L'épithélium joue un rôle important dans le développement de la BO, en étant un des principaux acteurs du remodelage bronchique. La présentation d'antigènes épithéliaux par la voie indirecte contribue à la sensibilisation des LT chez les patients atteints de BO (SivaSai et al., 1999) et la production d'anticorps anti-HLA classe I (Jaramillo et al., 1999). Des anticorps circulants dirigés contre l'épithélium respiratoire sont retrouvés chez des patients atteints de BO et la fixation de ces anticorps augmente la sécrétion de facteurs de croissance tels que le TGF- β 1 (Jaramillo et al., 2001).

Chez des patients porteurs de BO, une sur-expression de l'antigène Ki-67 (Devouassoux et al., 2001) marqueur de la prolifération, et des molécules de co-stimulation de la famille B7 (Elssner et al., 2002) a été identifiée. Ces antigènes contribuent à la destruction de l'épithélium bronchique, notamment par une réduction des fonctions des cellules de Clara, identifiable par la diminution de production protéique de CC16 (Clara cell protein) dans les LBA (Nord et al., 2002). Récemment, un polymorphisme génétique sur les cellules de Clara du donneur a été identifié et serait associé à la diminution de sécrétion CC16 (Bourdin et al., 2012).

L'épithélium bronchique participe au phénomène de fibroprolifération en contribuant au dépôt excessif de MEC. Ainsi, Hübner démontre que la BO est associée à une dérégulation de la balance métalloprotéinase-9 (MMP-9) et son inhibiteur naturel TIMP-1 (Tissu inhibitor of metalloproteinase), mis en évidence dans les LBA de patients atteints de BO (Hübner et al., 2005). Banarjee et coll. ont démontré que les cellules épithéliales étaient la source directe de MMP-9, par sa sur-production dans les LBA de patients atteints de BO (Banerjee et al., 2011).

b) Implication de l'auto-immunité

Sumpter et Wilkes ont développé le concept de rejet en deux phases : l'agression du tissu et l'implication de l'auto-immunité (Sumpter and Wilkes, 2004). En effet, l'agression du tissu (d'origine immune ou non allo-immune) permet d'exposer des antigènes séquestrés. Leurs fragments sont relargués et agissent comme des déclencheurs de la prolifération de LT autoréactifs et la production d'anticorps. Le collagène de type V, localisé dans la membrane basale des tissus peribronchique et périvasculaire du poumon (Madri and Furthmayr, 1980) a été le premier de ces fragments décrit. Burlingham et coll. ont suivi de façon prospective la réponse au collagène V pendant 7 ans, chez des patients transplantés pulmonaires. Les résultats démontrent que les patients ayant des réactions auto-immunes au collagène V ont 5 à 10 fois plus de risques de développer une BO (Burlingham et al., 2007). Dans cette même étude, ils déterminent un lien entre l'IL-17 et la réponse immune contre le collagène V chez les patients atteints de BO (Burlingham et al., 2007). Verleden et coll. ont pu identifier la présence d'IL-17 dans les LBA de patients développant une bronchite lymphocytaire, mais pas chez les patients en rejet aigu ou chronique (Verleden et al., 2013). Vittal et coll., ont mis en évidence la présence d'IL-17 en lien avec le collagène V dans les biopsies de patients atteints BO (Vittal et al., 2013). Un variant génétique du récepteur à l'IL-17 (rs879574A) a été associé au développement de la BO ainsi qu'à la neutrophilie (Ruttens et al., 2013). Le rôle de l'IL-17 dans ces réactions est encore discuté.

Une autre cible de la réaction auto-immune a été identifiée, la $K\alpha 1$ -tubuline, qui lorsqu'elle se lie aux anticorps contribue à la fibroprolifération *in vitro* (Goers et al., 2008). Dans une étude récente, Tiriveedhi et coll. ont démontré une corrélation entre la présence d'anticorps spécifiques à $K\alpha 1$ -tubuline et au collagène V avant la transplantation, et le risque de développement d'une dysfonction primaire du greffon (Tiriveedhi et al., 2013).

I.3 La transition épithélio-mésenchymateuse et la BO

I.3.1 L'épithélium bronchique

I.3.1.1 Définition et anatomie

Un épithélium est composé de cellules jointives, juxtaposées, solidaires les unes des autres par un système de jonctions séparées du tissu conjonctif sous-jacent par une lame basale. Au sein de l'appareil respiratoire, on retrouve deux types d'épithélia. Tout d'abord, les épithélia de revêtement tapissent les différentes cavités de l'organisme ainsi que la surface du corps. Dans le poumon, il est contact direct avec l'air inspiré. Les épithélia glandulaires, situés dans la sous-muqueuse, sont composés de glandes séro-muqueuses, responsables de la sécrétion des facteurs de défense ou des composants du mucus. La structure de l'épithélium respiratoire varie en fonction du diamètre des voies aériennes en trois types différents :

- **L'épithélium trachéo-bronchique (Figure 9)** : C'est un épithélium de revêtement pseudo stratifié, prismatique/cylindrique cilié contenant des cellules à mucus. Il est composé de 4 types cellulaires : cellules ciliées, cellules caliciformes, cellules intermédiaires et basales.
- **L'épithélium bronchiolaire** : Cette pseudo-stratification disparaît au niveau des bronchioles où l'épithélium est alors monostratifié prismatique, cylindrique et composé de trois types cellulaires : cellules ciliées, neuro-épithéliales et de clara.
- **L'épithélium alvéolaire** : de type monostratifié et composé de deux types cellulaires, les pneumocytes de type I et de type II.

L'épithélium pulmonaire est composé d'au moins 8 types de cellules épithéliales, distinctes d'un point de vue morphologique. L'épithélium bronchique est composé de 3 types cellulaires

majoritaires pouvant être classés en fonction de leurs propriétés structurales, fonctionnelles et biochimiques.

- **Les cellules basales** représentent approximativement 30 % de la population cellulaire de l'épithélium bronchique (Rock et al., 2009) et sont localisées dans la partie basale de ce dernier. Elles sont en contact direct avec la lame basale, qu'elles recouvrent à 90 % (Mercer et al., 1994). Elles ont un rôle majeur dans la plasticité cellulaire en particulier lors des processus de régénération et de réparation tissulaire (Davreux et al., 1993; Hajj et al., 2007; Maouche et al., 2009).

- **Les cellules ciliées** constituent plus de 56 % de la population cellulaire au sein de l'épithélium bronchique et assurent une fonction essentielle dans la clairance mucociliaire par le battement coordonné des cils. Elles participent au maintien des caractéristiques physico-chimiques du mucus (hydratation, pH, ...) par la régulation des échanges d'ions.

- **Les cellules sécrétrices** assurent une partie de la sécrétion du mucus. Elles sont également responsables de la sécrétion de protéines anti-bactériennes (Christensen and Hayes, 1982; Christensen et al., 1981; Goodman et al., 1981). On distingue les cellules calciformes dans la partie proximale de l'appareil respiratoire et les cellules de Clara dans les bronchioles.

Il existe un autre type de cellules, appelées cellules intermédiaires ou parabasales. Elles sont localisées entre les cellules basales et cylindriques (Boers et al., 1998) et constituent 7 % de la population totale des cellules de l'épithélium bronchique. Ces cellules ont pour caractéristiques d'être en cours de différenciation et contribueraient au renouvellement des cellules cylindriques (Donnelly et al., 1982).

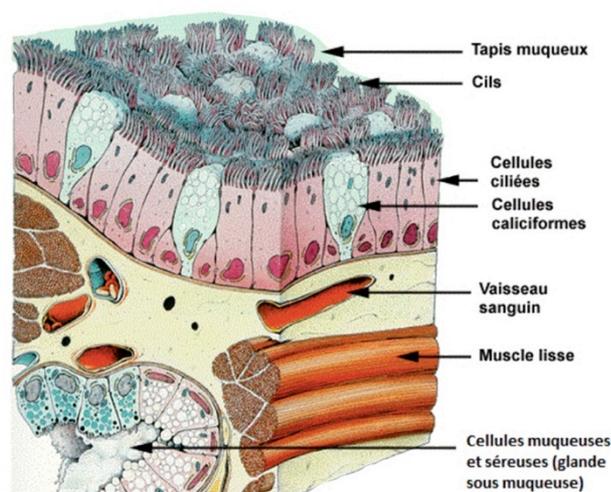


Figure 9 : Représentation schématique des épithélia de la surface trachéo-bronchique et glandulaire.

L'épithélium trachéo-bronchique de surface est un épithélium pseudostratifié composé de cellules basales, intermédiaires, calciformes et ciliées. Cet épithélium repose sur un épithélium glandulaire.

I.3.1.2 Fonctions

L'épithélium respiratoire constitue une barrière physique qui protège le poumon contre les corps étrangers contenus dans l'air. Son rôle principal est de former une barrière étanche entre le compartiment sanguin et le compartiment aérien. Cette propriété essentielle est assurée par plusieurs moyens de défense, d'une part par la propriété même d'un épithélium qui est défini comme un ensemble cellulaire très cohésif qui va donc constituer une barrière physique. D'autre part, l'épithélium est capable d'éliminer les particules inhalées par la clairance mucociliaire. Également, il participe à de nombreuses fonctions, parmi lesquelles la participation à l'inflammation et à terme à la réaction immunitaire adaptative, *via* la production de mucines, défensines et cytokines. Enfin, il permet la formation de mucus en vue de réaliser l'épuration mucociliaire.

I.3.1.3 Les différentes jonctions cellulaires

L'épithélium respiratoire constitue une barrière physique vis à vis des particules inhalées et pathogènes, du fait de son architecture pseudostratifiée et de son ancrage à la lame basale. Les différents types de jonctions assurent la cohésion et régulent l'imperméabilité de cet épithélium.

I.3.1.3.1 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées forment un réseau à la partie apicale de la membrane basolatérale des cellules ciliées (Figure 10). Une jonction serrée est constituée par l'association de complexes multiprotéiques formés par la zonula occludens-1 (ZO-1), ZO-2 et ZO-3 (Gumbiner et al., 1991; Haskins et al., 1998; Jesaitis and Goodenough, 1994) liées aux protéines membranaires d'occludine, de claudines et de JAM (Junctional Adhesion molecule). Ces jonctions serrées assurent l'imperméabilité de l'épithélium grâce à un cloisonnement étanche des espaces intercellulaires, mais permettent aussi le passage sélectif de certaines petites molécules par transport paracellulaire et transcellulaire. Ces jonctions constituent une barrière physique de diffusion évitant ainsi la pénétration des bactéries dans la muqueuse respiratoire (Godfrey et al., 1992).

I.3.1.3.2 Les jonctions intermédiaires

Situées en dessous des jonctions serrées, les jonctions intermédiaires (ou zonula adherens) forment une ceinture cellulaire et sont impliquées dans l'adhérence intercellulaire (Figure 10). Les protéines centrales de ce type de jonction sont les cadhérines. Ces protéines transmembranaires s'associent à des filaments d'actine par un complexe protéique composé de différentes protéines, telles que les caténines, la vinculine et l' α -actinine. Ces jonctions intermédiaires ont pour rôle de renforcer l'intégrité de l'épithélium lors des modifications de formes induites par une réorganisation des filaments d'actine (Perez-Moreno et al., 2003).

I.3.1.3.3 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes, encore appelées jonctions gap, sont constituées par l'association de connexions de cellules adjacentes, formant ainsi un pore constitué principalement d'hexamères de molécules de connexines (Figure 10). Ces protéines transmembranaires permettent l'échange de très petites molécules (inférieure à 1kDa) par diffusion passive.

I.3.1.3.4 Les desmosomes

Les desmosomes assurent de la cohésion épithéliale, en maintenant les cellules fermement fixées les unes aux autres. Les desmosomes sont situés le long des membranes au niveau des contacts intercellulaires, regroupés en macula adherens. Ils sont composés des desmoplakines, de la plakoglobuline et des plakophilines, reliant les cadhérines aux filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette (Kottke et al., 2006). Des structures similaires aux desmosomes, les hémidesmosomes sont localisés au pôle basal des cellules basales (Figure 10). Les hémidesmosomes sont des structures dynamiques impliquées dans le maintien de la cohésion cellulaire lors de l'assemblage/désassemblage moléculaire intervenant au cours du remodelage tissulaire (Tsuruta et al., 2003).

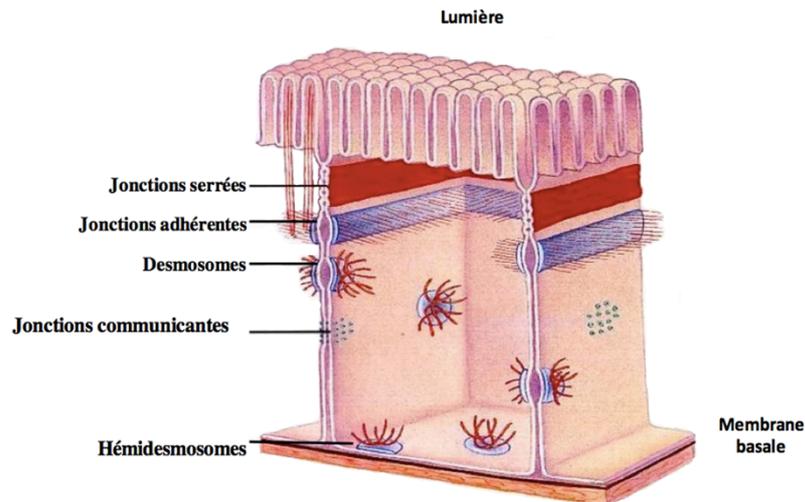


Figure 10: Les différentes jonctions exprimées par les cellules épithéliales respiratoires.

Représentation schématique d'une cellule épithéliale attachée à la membrane basale par les hémidesmosomes et établissant des jonctions serrées, adhérentes, communicantes et des desmosomes avec les cellules adjacentes.

I.3.2 La transition épithélio-mésenchymateuse

I.3.2.1 Les différents types de transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) décrit un phénomène biologique par lequel un épithélium polarisé, avec des contacts cellule-cellule et attaché à la membrane basale, se différencie en cellules mésenchymateuses de type fibroblastique (Figure 11) (Hay, 2005). Ce processus démontre la plasticité des cellules qui ont également la possibilité d'effectuer le phénomène inverse, c'est à dire une transition dite « mésenchymo-épithéliale » (TME) (Thiery and Sleeman, 2006). La TEM se caractérise par des modifications cellulaires comprenant d'une part une perte de polarité épithéliale due à un désassemblage des contacts cellules-cellules ou des jonctions adhérentes (E-cadhérine), et une perte de jonctions serrées (ZO-1), et d'autre part l'apparition de protéines mésenchymateuses comme l' α -SMA, la vimentine et/ou la fibronectine (Ikenouchi et al., 2003; Ozdamar et al., 2005). La perte de jonctions adhérentes des cellules épithéliales participe à la destruction de l'intégrité de l'épithélium et à la libération de la β -caténine, contribuant à une modification d'expression de cytokératines et à la réorganisation du cytosquelette. L'acquisition de la capacité de migration résulte de la modification de l'expression des composants de la MEC (fibronectine, collagènes) et de ses

régulateurs (MMP) qui conduit à une perte de l'adhérence des cellules à la MEC. Trois types de TEM ont été décrits et sont détaillés dans la partie suivante.

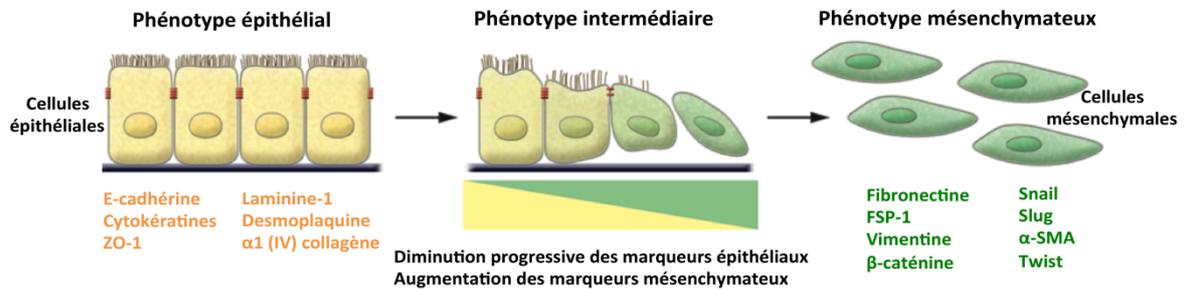


Figure 11: Schéma du mécanisme de la transition épithélio-mésenchymateuse.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus par lequel les cellules épithéliales perdent progressivement l'expression de protéines épithéliales pour acquérir l'expression de protéines mésenchymateuses (*Modifié d'après R. Kalluri and R. Weinberg, The journal of clinical investigation clin, 2009 ; vol 119 number 6*).

a) La TEM de type I

La TEM de type I est associée à des phénomènes physiologiques tels que l'embryogenèse et le développement des organes (Kalluri, 2009). Plus précisément, au cours de l'embryogenèse, la TEM de type I est associée à l'étape de gastrulation, produisant le mésoderme, l'endoderme et les cellules de la crête neurale. Elle permet à partir de l'épiblaste (épithélium primitif) de générer le mésenchyme primaire. Cependant, cette transition est réversible car une transition des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales (TME) est nécessaire afin de finaliser la différenciation des cellules et de permettre la structure tridimensionnelle des organes. Ainsi, le mésenchyme primaire peut subir une re-transformation en épithélium secondaire. Ces cycles de TEM et TME permettent le développement du foie (Tanimizu and Miyajima, 2007), des îlots de Langerhans (Johansson and Grapin-Botton, 2002) ainsi que la formation du cœur (Nakajima et al., 2000; Nawshad et al., 2005).

b) La TEM de type II

La TEM peut également intervenir lors de processus de cicatrisation contribuant à l'apport des cellules mésenchymateuses nécessaires à la régénération tissulaire. Toutefois, en réponse à des conditions inflammatoires maintenues, la TEM dite de type 2 est associée à la fibrose du tissu, due à une réparation tissulaire excessive (Figure 12). Dans ce processus de fibrose, les fibroblastes

s'accumulent en sécrétant du collagène déposé en fibres, aboutissant à la dysfonction de l'organe. Iwano et al. ont démontré dans un modèle transgénique murin que les cellules épithéliales rénales pouvaient subir la TEM contribuant ainsi au phénomène de fibrose (Iwano et al., 2002). D'autres études démontrent que la TEM est associée à la fibrose du rein, du foie, du poumon et de l'intestin (Guarino et al., 2009; Kim et al., 2006). C'est vraisemblablement ce type de TEM qui est impliqué dans la BO.

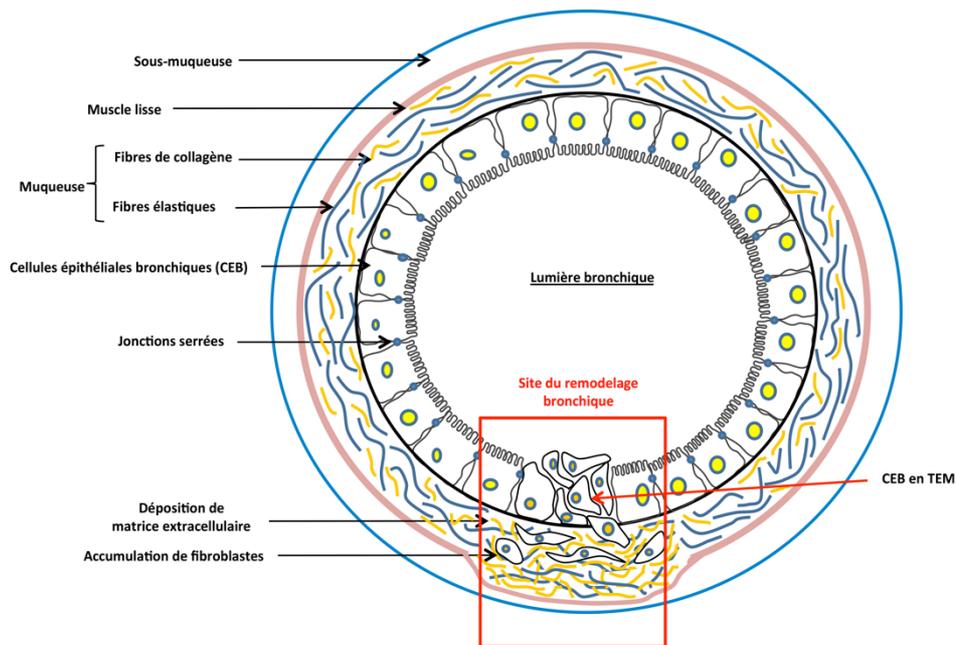


Figure 12: Schéma de la transition épithélio-mésenchymateuse de type 2.

Cette transition intervient lors de processus de cicatrisation, régénération tissulaire. Sous l'influence du contexte inflammatoire, cette transition participe à la fibrose de tissu par l'accumulation de fibroblastes et le dépôt de MEC (Pain et al., 2014)

c) La TEM de type III

La TEM dite de type 3, fait référence à l'acquisition par les cellules épithéliales d'un phénotype migratoire comparable à celui acquis par les cellules cancéreuses (Thiery, 2002) ainsi que d'une résistance aux agents apoptotiques (Maestro et al., 1999; Vega et al., 2004) (Figure 13). Durant le processus métastatique, les cellules épithéliales perdent leur polarité et se détachent de la membrane basale. Ces cellules peuvent ainsi migrer *via* la circulation sanguine et former de nouveaux foyers métastatiques. Plusieurs études ont mis en évidence l'acquisition de marqueurs mésenchymateux par ces cellules métastatiques, comme l' α -SMA, FSP-1 (fibroblast specific protein 1 connue sous le nom S100A4), la vimentine ou encore la desmine (Yang and Weinberg, 2008). Ces marqueurs sont plus particulièrement exprimés par les cellules situées au niveau du front de migration de la tumeur, ce qui

permet aux cellules de se détacher de la MEC et de coloniser d'autres organes (Brabletz et al., 2005; Thiery, 2002).

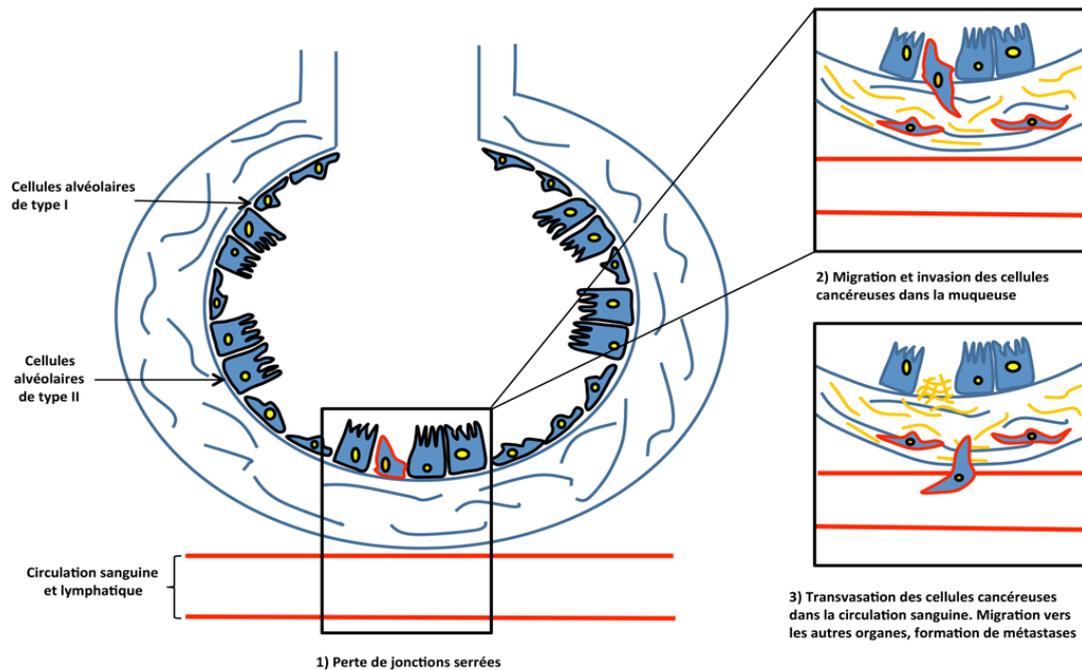


Figure 13 : Schéma de la transition épithélio-mésenchymateuse de type 3.

Cette transition est impliquée dans le développement de cancéreuse. 1) En effet, lorsque la cellule devient cancéreuse, elle perd toutes ses caractéristiques propres à son tissu d'origine. 2) Ces cellules acquièrent des capacités de dégradation de la MEC et de migration. 3) Enfin, les cellules cancéreuses sont capables de migrer vers d'autres organes par la circulation sanguine (Pain et al., 2014).

I.3.2.2 Les voies de signalisations impliquées

I.3.2.2.1 Mécanisme de la TEM

La complexité du mécanisme de la TEM réside principalement dans la diversité des acteurs mis en jeu lors de cette transition, mais aussi sur leurs différents modes d'action. La structure du cytosquelette peut induire directement la TEM, en rompant les interactions cellules-cellules et cellules-MEC (Janda et al., 2002; Ozdamar et al., 2005) mais aussi par l'activation de facteurs de transcription nécessaires pour la synthèse de protéines impliquées dans la TEM (Huber et al., 2004; Peinado et al., 2003). L'environnement dans lequel s'effectue la TEM est très important car des signaux pléiotropiques comme ceux émis par les ROS produits lors de l'exposition aux MMPs

(Radisky, 2005) peuvent agir sur différentes voies de signalisations impliquées dans la TEM (Finkel, 2003; Hussain et al., 2003). De plus, la TEM peut être induite par de multiples facteurs de croissance incluant le TGF- β , le FGF-2 (fibroblast growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le CTGF (connective tissue growth factor), l'IGF 2, IL-1, le HGF (hepatocyte growth factor). Ces facteurs de croissance ont des actions variables selon le contexte dans lequel ils sont sécrétés. Les β -caténines, protéines de liaison du cytosquelette avec les jonctions adhérentes, sont redistribuées de la surface cellulaire vers le noyau, sous l'influence de l'IGF II, facilitant la dissociation de cette protéine de l'E-cadhérine (Morali et al., 2001). Le FGF2 est, quant à lui, considéré comme un inducteur partiel de la TEM dans les cellules rénales, induisant la sécrétion de MMP2 et MMP9 qui participent à la dégradation de la membrane basale (Strutz et al., 2002). Le HGF est un facteur de croissance impliqué dans la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire. Son action est associée à celle du facteur de transcription Snail, qui participe à la répression de l'expression d'E-cadhérine et à la synthèse de protéines mésenchymateuses. L'HGF semble plutôt impliqué dans la TEM de type I, durant la formation des somites et des bourgeons cardiaques (Mizuno et al., 1998). Parmi les facteurs de croissance impliqués dans la TEM, le TGF- β 1 est le facteur de croissance qui reste à ce jour le plus étudié.

a) Rôle central du TGF β

Le TGF- β est une cytokine qui a de multiples rôles physiologiques dans le développement, l'inflammation, la réparation, la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette cytokine a été déjà largement décrite comme inducteur de la TEM de type I, notamment lors de la formation des valves cardiaques et dans la fusion palatine (Nawshad et al., 2005, 2007; Sridurongrit et al., 2008). Dans une condition pathologique telle que le cancer du poumon, le TGF- β joue un double rôle. Dans les stades précoces de la pathologie, il agit comme un suppresseur de tumeur, alors que dans des stades plus avancés, le TGF- β favorise la TEM de type III en contribuant à la dissémination de métastases. Plusieurs études menées *in vitro* sur différents types de cellules épithéliales pulmonaires isolées de sujets sains ont démontré que l'exposition au TGF- β 1 induit l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux (Borthwick et al., 2009; Câmara and Jarai, 2010; Doerner and Zuraw, 2009; Gardner et al., 2012; Hackett et al., 2009; Heijink et al., 2010).

Le TGF- β est une cytokine ubiquitaire qui présente plusieurs isoformes (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3). La liaison du ligand induit la dimérisation des récepteurs de type I et II. Le récepteur de type II, qui possède une activité kinase constitutive, phosphoryle le récepteur de type I permettant l'activation d'une cascade de signalisation qui implique la voie canonique des protéines intracellulaires Smad associée à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles. L'interaction du TGF-

β avec ses récepteurs phosphoryle la partie C terminale de ces derniers et permet l'activation par phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 (Massagué, 2000). Smad4 s'associe en dimère avec Smad2/3 constituant un complexe protéique appelé Smad. Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau participant à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (Derynck and Zhang, 2003; Fuxe et al., 2010). Dans le cadre de la TEM, le TGF- β induit l'expression de HMGA2 (high motility group A2) par l'activation du complexe Smad. Ce dernier réprime l'expression du gène de l'E-cadhérine *via* la transcription des gènes Snail 1 et Snail 2, (respectivement Snail et Slug) (Cano et al., 2000; Thuault et al., 2006). Snail induit l'expression de protéines mésenchymateuses telles que la N-cadhérine, la fibronectine et la vitronectine, alors que Slug intervient dans le contrôle de l'expression de MMP2 et MMP9, participant à la dégradation du collagène de type IV (Xu et al., 2009) (Figure 14). Dans la TEM, les rôles des protéines Smad 2 et Smad 3 sont encore très discutés, mais de récentes études démontrent que la majorité des gènes cibles de la TEM induits par le TGF- β dépendent de Smad 3 (Yang and Weinberg, 2008). Dans un modèle murin knockout de Smad 3, Zavadil et al ont démontré l'impossibilité d'induire la TEM sur des cellules épithéliales rénales traitées au TGF- β (Zavadil et al., 2004).

L'inhibition de la voie du TGF- β apparait donc comme une cible thérapeutique prometteuse afin d'empêcher le déclenchement de la TEM. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation d'inhibiteurs du TGF- β ou de ses récepteurs réduisait le caractère métastatique et/ou affectait les propriétés d'invasion des cellules *in vivo* (Dumont and Arteaga, 2003; Subramanian et al., 2004; Yingling et al., 2004). Par exemple Smad 7 s'associe au récepteur TGF- β activé, empêchant la phosphorylation de Smad 2/3 (Miyazono, 2000). Le BMP-7 (bone morphogenetic protein-7), membre de la super famille du TGF β , se fixe sur ses récepteurs, induisant la formation et la translocation nucléaire du complexe « Smad ». Ce complexe réprime la transcription de Zeb1 et Snail 1, facteurs de transcription réprimant le gène de l'E-cadhérine. La démonstration de l'inhibition de la TEM induite *in vitro* par le TGF- β a déjà été réalisée dans un modèle murin de fibrose rénale (Willis and Borok, 2009; Zeisberg et al., 2003a, 2003b). Cependant, l'utilisation de ces inhibiteurs sur des CEB ne semble pas être capable d'inverser le processus de TEM (Hackett et al., 2009). Ceci suggère que l'induction de la TEM dépend du type cellulaire et tissulaire (Thiery, 2003). Plus récemment, Gardner et al. ont identifié une nouvelle cible thérapeutique, TAK1, qui semblerait impliquée dans l'induction de la TEM dans l'épithélium bronchique *via* le TGF- β 1 et le TNF α (Gardner et al., 2012).

L'induction de la TEM par le TGF- β s'effectue le plus souvent de façon dépendante de Smad mais peut aussi impliquer d'autres voies de signalisation, agissant de façon synergique avec la voie Smad (Zeisberg et al., 2003b). En effet, le TGF- β est capable d'activer les voies p38MAPK, PI3K et la voie ERK, dont l'implication a déjà été démontrée dans la TEM de type 3 (Bates and Mercurio, 2003; Ellenrieder et al., 2001). La voie RhoA peut être inhibée par le TGF- β , aboutissant à une déstabilisation du réseau des jonctions serrées. La voie des MAP Kinases (Ras/Raf) contribue à la

sécrétion autocrine du TGF- β (Xie et al., 2004). Dans certains cas, l'activation de ces protéines est nécessaire, mais pas suffisante pour induire la TEM (Zavadil and Böttinger, 2005).

b) Autres voies de signalisation impliquées dans la TEM

La voie β -caténine, induite par les ligands Wnt, a déjà été clairement identifiée dans les mécanismes de remodelage et de destruction tissulaire (Eger et al., 2004; Pongracz and Stockley, 2006; Shin et al., 2010; Zavadil et al., 2001). Brièvement, le ligand Wnt se lie à son récepteur frizzled (fzd) aboutissant à la phosphorylation et l'inactivation de la kinase GSK-3 β . Ceci contribue à l'accumulation cytosolique de β -caténine et à son transfert dans le noyau induisant la régulation transcriptionnelle de gènes contrôlés par exemple par le facteur lymphoïde LEF-1 et le facteur de transcription TCF1 (Pongracz and Stockley, 2006; Willis and Borok, 2007) (Figure 14). Cette voie a déjà été identifiée comme un médiateur de l'effet du TGF- β sur des cellules alvéolaires ATII (Königshoff and Eickelberg, 2010) et dans la fibrose pulmonaire (Königshoff et al., 2008). Les ligands de la voie notch ou NF κ B ont également été mis en évidence dans la TEM (Timmerman et al., 2004; Zavadil and Böttinger, 2005).

L'importance des protéines de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHh) a déjà été démontrée dans l'induction de la TEM (Karhadkar et al., 2004). La présence de SHh, libère l'inhibition que le récepteur Ptch maintient sur Smoothed (SMO), une protéine G associée au récepteur qui transduit le signal Hedgehog (Hh) dans la cellule. L'activation de la voie SHh résulte de la translocation nucléaire des facteurs de transcriptions Gli, qui régulent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération tels que les cyclines D et E et des gènes de la même voie Hh (Gli et Ptch) (Figure 14). Cette voie de signalisation est impliquée dans le processus de réparation de l'épithélium respiratoire (Watkins et al., 2003). La voie « canonique » Hh se trouve également impliquée dans la migration et invasion cellulaire, par la régulation de l'expression des gènes associés à la TEM (Wang et al., 2010). L'impact de la voie Hh dans la migration cellulaire et la TEM peut avoir des répercussions importantes dans les processus pathologiques comme la fibrose. Dans le poumon, des études sur des tissus humains ont mis en évidence une expression accrue du ligand Shh chez les patients porteurs de fibrose pulmonaire idiopathique (Cigna et al., 2012). Par ailleurs, la voie Hh se trouve également impliquée dans la transition mésenchymateuse des cellules tumorales associées à la formation de métastases (Varnat et al., 2009). L'impact que SHh peut avoir dans la migration cellulaire peut également résulter des interactions de cette voie avec d'autres facteurs ou voies de signalisation, tels que le TGF- β , un des facteurs principaux impliqués dans la TEM. De multiples évidences ont montré une interaction entre la voie Hh et la voie TGF- β /Smad au cours du développement animal mais aussi

dans les tissus adultes humains (Cigna et al., 2012; Denkler et al., 2009; Javelaud et al., 2012; Nolan-Stevaux et al., 2009).

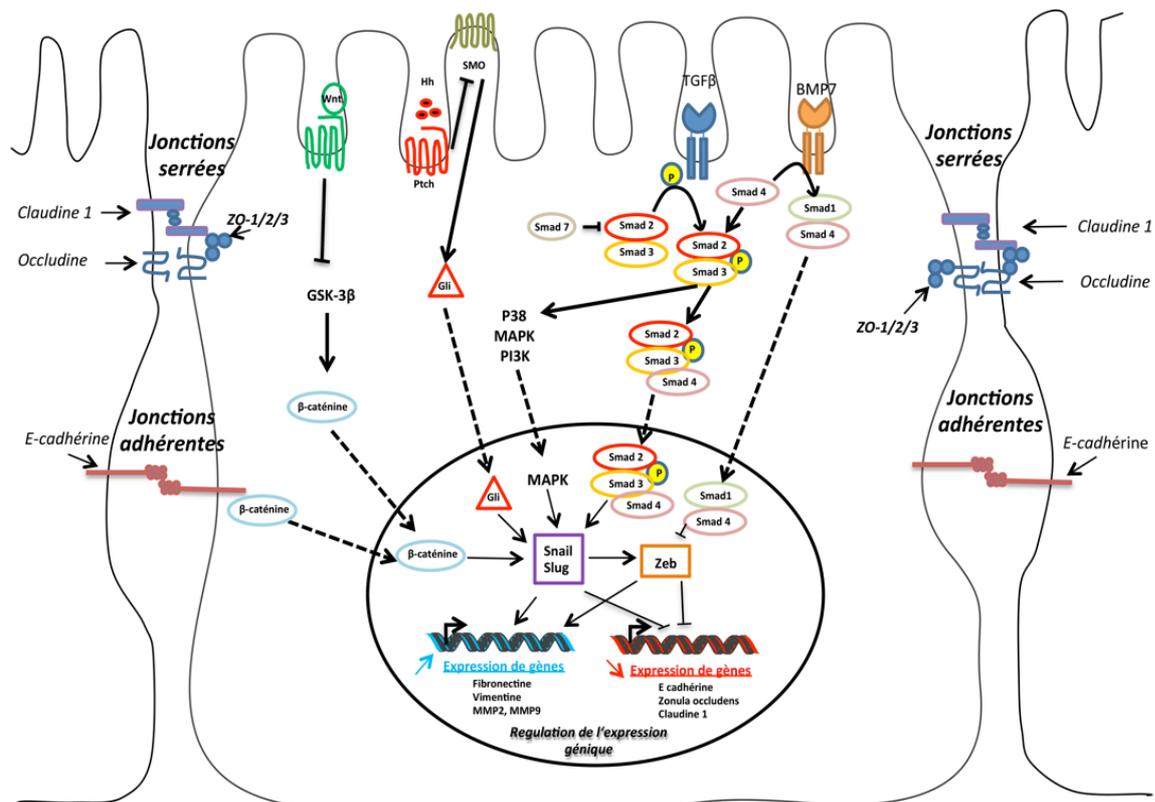


Figure 14: Schéma des voies de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

I.3.3 La transition épithélio-mésenchymateuse dans la BO

De nombreuses investigations ont été menées afin de démontrer l'implication de la TEM dans le remodelage bronchique au cours de pathologies chroniques telles que l'asthme, la BPCO et la BO. En effet, l'épithélium bronchique a été étudié comme une source potentielle de fibroblastes et myofibroblastes lors du remodelage chronique des voies aériennes. Au cours de ces pathologies, l'agression chronique de l'épithélium respiratoire (allergènes, allogénicité, infections répétées, fumée de cigarettes, polluants atmosphériques) aboutit au développement d'un contexte inflammatoire. En

réponse à l'inflammation, la réparation tissulaire se réalise de façon aberrante (ou non contrôlée), conduisant à une réponse fibroblastique excessive qui contribue à la production de MEC, au remodelage, et à terme à l'obstruction bronchique fixée. L'origine des fibroblastes responsables de l'accumulation de MEC est encore indéterminée. Ils pourraient provenir de la prolifération de fibroblastes résidents ou du recrutement de cellules progénitrices circulantes. La TEM enfin, a été identifiée comme une nouvelle source potentielle de fibroblastes dans les maladies bronchiques inflammatoires (Borthwick et al., 2009; Flanders, 2004; Holgate et al., 2000; Ward et al., 2005). Le rôle de la TEM dans ces pathologies est encore mal décrit, mais ce phénomène contribuerait à l'apport de nouvelles cellules mésenchymateuses, permettant l'activation et la prolifération des fibroblastes et myofibroblastes résidents, responsables de l'accumulation de la MEC. Cependant, la mise en évidence de ce processus reste complexe, du fait de la diversité des marqueurs utilisés pour l'identifier, et de la diversité de modèles d'études existant dans chaque pathologie.

1.3.3.1 Les études menées chez l'homme

L'implication de la TEM a été démontrée dans le rejet chronique rénal (Bedi et al., 2008; Hertig, 2008; Rastaldi et al., 2002; Robertson et al., 2004). De récentes études suggèrent l'implication de la TEM également dans le développement de la BO (Borthwick et al., 2009, 2010; Hodge et al., 2009a; Ward et al., 2005). L'agression épithéliale, d'origine allo-immune ou non, aboutirait à un défaut de réparation de l'épithélium et contribuerait au processus fibrotique (Boehler and Estenne, 2003; Estenne et al., 2002; Yousem, 1996). Cependant, les mécanismes cellulaires mis en jeu dans le remodelage bronchique de la BO ne sont pas encore élucidés. L'origine des fibroblastes pulmonaires est diverse, pouvant provenir de la prolifération de fibroblastes *in situ* ou du recrutement d'éventuels précurseurs circulants sur le site de l'inflammation.

A partir de biopsies transbronchiques, Hodge et al. ont étudié le phénotype des CEB par une approche de cytométrie en flux. Ils ont montré une augmentation de l' α -SMA et de ED-fibronectine sur des CEB de patients atteints de BO, comparée à des patients transplantés pulmonaires sans BO. Ces auteurs ont réalisé un suivi longitudinal et ont mis en évidence une augmentation de S100A4, α -SMA et ED-fibronectine sur un patient atteints de BO (Hodge et al., 2009a). Cependant, ces résultats doivent être confirmés sur un nombre plus important de patients permettant de déterminer s'il y a un lien entre les marqueurs myofibroblastiques et la BO. Le recrutement de précurseurs circulants peut également contribuer au remodelage. Des cellules souches mésenchymateuses peuvent être isolées dans les LBA de patients transplantés pulmonaires (Walker N et al, 2011). Ces cellules sont capables de se différencier en fibroblastes/myofibroblastes, sous des conditions inflammatoires, et contribueraient au processus de fibro-oblitération.

Le contexte inflammatoire chez les patients transplantés pulmonaires a été étudié. Plusieurs études ont montré que le taux de TGF- β 1 était plus élevé dans les LBA de patients atteints de BO (Bergmann et al., 1998; El-Gamel et al., 1998; Magnan et al., 1996; Riise et al., 1998; Vanaudenaerde et al., 2008a). D'autres cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-8, le TNF- α et l'IL-1- β sont également retrouvées augmentées chez ces patients (Magnan et al., 1994; Riise et al., 1998; Vanaudenaerde et al., 2008b). Cet environnement inflammatoire pourrait contribuer à la TEM dans la BO. Le HGF est également retrouvé dans le LBA de patients atteints de BO (Hodge et al., 2009a). Ce facteur de croissance joue un rôle dans la réparation de l'épithélium après l'agression et peut également être partiellement inducteur de la TEM (Kalluri and Neilson, 2003; Myerburg et al., 2007). Son rôle double ne permet pas de déterminer dans cette étude s'il intervient dans la TEM physiologique, au cours de la réparation tissulaire, ou dans la TEM pathologique participant à la fibrose du tissu.

Ces investigations menées sur des LBA et des biopsies bronchiques issues de patients transplantés pulmonaires ne permettent pas de déterminer l'origine des fibroblastes contribuant à l'obstruction bronchique. Ceci souligne la difficulté de conclure sur l'influence de la TEM dans le remodelage bronchique à partir de ce type de prélèvement. Cependant, si la TEM est impliquée dans le remodelage, il est nécessaire d'en comprendre les mécanismes afin de développer de nouvelles thérapies qui contribueraient à limiter voir abroger le remodelage (Borthwick et al., 2009; Forrest et al., 2005; Gardner et al., 2012; Hodge et al., 2009).

I.3.3.2 La TEM dans les modèles animaux de bronchiolite oblitérante

Plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'étudier la BO. Ces modèles sont des outils utiles pour détailler les mécanismes impliqués dans la BO et tester les différents traitements potentiels.

I.3.3.2.1 La transplantation trachéale hétérotopique

La transplantation hétérotopique consiste à remplacer un organe à distance de sa position anatomique d'origine. Les premiers modèles furent développés en 1993 et consistaient à transplanter des anneaux trachéaux sous la peau et dans la cavité abdominale de rats (Davreux et al., 1993) ou souris (Hertz et al., 1993). Ces modèles permettaient d'obtenir des lésions histologiques de BO, reproductibles et assez simples techniquement (Hele et al., 2001). L'utilisation de ces modèles a permis de distinguer trois phases dans le développement de la pathologie.

La première phase est ischémique, marquée par une desquamation de l'épithélium respiratoire au niveau de l'allogreffe (Boehler et al., 1997). La même phase est observée chez les isogreffes, mais ces dernières régénèrent au bout de 7 jours. S'en suit une seconde phase caractérisée par une infiltration lymphocytaire et enfin une dernière phase durant laquelle il y a une perte de l'épithélium et une oblitération fibreuse progressive de l'allogreffe (Boehler et al., 1997). Suite à cette perte d'épithélium, il peut être observé un amincissement et une fragmentation de la membrane basale (Rumbley et al., 2001). La perte d'intégrité de la membrane basale permet l'infiltration lymphocytaire dans la muqueuse trachéale, reproduisant histologiquement la bronchite lymphocytaire retrouvée chez l'homme. Cet infiltrat concerne les LT CD4+ et CD8+ (Neuringer et al., 1998), les cellules NK et les macrophages (Belperio et al., 2002a) et plus tardivement les myofibroblastes (Neuringer et al., 1998). Rooponen et al. ont démontré que les cytokines sécrétées par les LT Th17 sont impliquées dans le phénomène inflammatoire, associé à une réponse Th1 (Rooponen et al., 2011). Dans ce modèle d'allogreffe trachéale, l'agression de l'épithélium est principalement d'origine alloimmune. L'utilisation de ces modèles a contribué à détailler l'importance de la réponse immune, plus particulièrement le rôle des molécules de CMH, des LT et LB. Egalement, ces modèles ont été utiles pour décrire le phénomène fibroprolifératif. Des expériences sur des souris knock down pour Smad 3 (Ramirez et al., 2006) ont démontré le rôle du TGF- β dans la différenciation myofibroblastique et la fibrose pulmonaire. La contribution de l'angiogenèse dans la fibroprolifération a pu être mise en évidence par l'utilisation d'un modèle de transplantation trachéale hétérotopique, notamment l'axe CXCL2/CXCR2 impliqué dans le remodelage vasculaire (Belperio et al., 2005). Des mécanismes non alloimmuns comme la production de protéases digestives contribuent au phénomène fibro-oblitératif (Adams et al., 2000). En effet, une fibrose oblitérative comparable à celle des allogreffes est observée lorsque l'épithélium des isogreffes est dénudé par ces protéases (Adams et al., 2000).

Toutefois, ce modèle hétérotopique diffère par rapport à la BO humaine (Sato et al., 2009). Tout d'abord, la vascularisation du greffon dépend de la néo-vascularisation et de ce fait il est sujet à l'ischémie, même si, dans ce modèle, l'ischémie ne contribue pas au phénomène fibro-oblitératif (Boehler et al., 1997). De plus, la BO retrouvée chez l'humain est un processus chronique qui s'effectue plusieurs mois après la transplantation. L'oblitération des voies aériennes est ici observée quelques semaines après la transplantation, et ce dans des conditions idéales de rejets, c'est à dire en absence d'immunosuppression et incompatibilité complète.

I.3.3.2.2 La transplantation pulmonaire orthotopique

La transplantation orthotopique se définit par le remplacement d'un organe à son emplacement anatomique d'origine. Ce modèle permet d'effectuer une intervention analogue à celle réalisée chez l'homme, ce qui requiert une certaine technicité.

Les premiers modèles expérimentaux consistaient à effectuer une transplantation mono-pulmonaire chez le rat qui en l'absence d'immunosuppression développait un rejet aigu aboutissant à la destruction et la nécrose du greffon (Marck KW et al., 1979), (Romaniuk et al., 1987). Ce modèle a également été utile pour la mise en évidence de la réponse allo-immune à l'encontre du collagène V, suggérant l'implication d'un processus auto-immun dans la BO (Burlingham et al., 2007). Ce modèle orthotopique a permis d'étudier l'influence du RGO (Li et al., 2008) ainsi que la mort cérébrale du donneur dans le développement de la BO. Cependant, des études démontrent que les lésions observées avec ce modèle de rat ne sont pas typiques de la BO retrouvée chez l'homme (Matsumura et al., 1995) et remettent en cause la reproductibilité du modèle (Hirschburger et al., 2007).

Un modèle de transplantation pulmonaire orthotopique a été développé chez la souris (Jungraithmayr et al., 2009; Okazaki et al., 2007a). Ce modèle permet l'utilisation de souris transgéniques pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la BO. Des similarités entre ce modèle et le modèle hétérotopique sont retrouvées, plus particulièrement dans l'augmentation de facteurs de croissance critiques dans le développement de la BO, mais aussi dans le dépôt interstitiel de collagène (Okazaki et al., 2007b). Comparé aux modèles hétérotopiques, l'épithélium pulmonaire est intact suggérant que la réponse allogénique n'agit pas seule dans la destruction des cellules épithéliales pulmonaires.

Ce modèle de transplantation orthotopique a été développé sur des plus grands animaux comme le porc (al-Dossari et al., 1994), du fait de ses similitudes avec l'homme, d'un point de vue anatomique et immunologique (Sato et al., 2009). Ce type de modèle permet également de réaliser des biopsies transbronchiques, des LBA et des scanners couramment effectués dans le suivi de patients transplantés pulmonaires. Toutefois, la transplantation orthotopique chez le porc ne permet pas d'observer le phénomène de fibro-oblitération (Schmid et al., 1997). Il semblerait que le modèle réalisé chez le porc stimulerait la réponse immunitaire par l'expression constitutive de molécule de CMH II issue des cellules endothéliales et épithéliales (Kallio et al., 1997; Salminen et al., 2002). Ce modèle est actuellement utilisé pour la phase pré-clinique afin de déterminer l'efficacité et les effets secondaires de nouvelles thérapies.

Ces modèles animaux sont des outils intéressants pour étudier l'implication de la TEM dans la BO. En effet, le recours à des souris transgéniques permettrait de déterminer l'origine des fibroblastes

et ainsi évaluer la participation de la TEM dans le remodelage bronchique. Pour exemple, Jonhson et al ont développé un modèle transgénique murin pour la protéine du surfactant C, exprimée par les cellules épithéliales pulmonaires (Johnson et al., 2011). Après 5 jours d'exposition à un allergène d'acarien, les cellules épithéliales sont capables de subir une TEM en co-exprimant la protéine S100A4 et en s'accumulant dans le muscle lisse. D'autres cellules épithéliales co-exprimant la vimentine sont localisées de façon sous-épithéliale. Ces résultats suggèrent l'implication de la TEM dans le remodelage bronchique associé à l'asthme. Même si le modèle animal comporte des limites dans l'étude des pathologies bronchiques, il reste un outil puissant permettant d'identifier l'origine des cellules participant au remodelage.

Cependant, ces modèles animaux sont parfois éloignés de la pathologie étudiée. Leur utilisation implique des compétences techniques mais aussi génère un coût financier notamment pour le suivi et l'entretien de ces animaux. Enfin sur le plan éthique, des alternatives à l'expérimentation animale doivent systématiquement être recherchées.

I.3.3.3 Etude de la TEM dans les modèles cellulaires

L'utilisation de culture cellulaire est une nouvelle approche qui permet d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la TEM. Ces cultures cellulaires ont contribué à l'identification de facteurs clés de la TEM. Des modèles de co-culture permettent de tester l'influence de facteurs environnementaux, le contexte inflammatoire ou d'autres acteurs cellulaires dans l'induction de la TEM.

I.3.3.3.1 Les lignées cellulaires

De nombreuses études ont été menées sur des lignées cellulaires épithéliales afin de démontrer l'implication de la TEM dans les pathologies bronchiques. L'utilisation de ces lignées permet d'obtenir des cellules de façon régulière et en grand nombre.

La lignée cellulaire beas-2b (B2b) est composée de CEB provenant d'un donneur lors d'une autopsie puis infectées par le virus hybride SV40. Cette lignée a été utilisée pour des études structurales et fonctionnelles de l'épithélium, incluant la régulation de cytokines (Atsuta et al., 1997; Mullol et al., 1996), et la réponse suite à l'exposition au tabac (Sun et al., 1995), à des particules (Steerenberg et al., 1998) et à l'hyperoxie (Pietarinen-Runtti et al., 1998; Wright et al., 1996). Des co-cultures avec des LT ont contribué à démontrer l'implication des LT CD8+ dans l'agression épithéliale (Smith et al., 2000a) et des molécules CMH I du donneur (Nakajima et al., 1999) au cours

de la transplantation pulmonaire. La lignée cellulaire 16HBE14O- est issue d'un isolement de CEB humaines chez un individu sain. Cette lignée cellulaire a été développée pour étudier le gène CFTR. Des modèles polarisés ont été utilisés pour l'étude du transport de molécules (Forbes and Ehrhardt, 2005; Forbes et al., 2003) et le transfert de gènes (Pouton et al., 1998; Stern et al., 1998). Des co-cultures en présence d'un extrait d'acarien combiné au TGF- β 1 démontrent l'action protéolytique de cet allergène sur les contacts intercellulaires en libérant les β -caténines des jonctions adhérentes et en accentuant la diminution d'expression d'E-cadhérine et l'augmentation de la vimentine (Heijink et al., 2010). D'autres cultures à partir de 16HBE14O- ont démontré l'influence de la fumée de cigarette (Schamberger et al., 2013). Enfin, la lignée cellulaire pulmonaire A549 provient des cellules épithéliales basales d'un adénocarcinome alvéolaire humain. Elles sont largement utilisées pour l'étude *in vitro* de la TEM de type III (impliquée dans les cancers). Egalement, cette lignée est utilisée en complément des études réalisées avec des CEB primaires (Borthwick et al., 2010) ou d'autres lignées cellulaires (Reznik et al., 2001; Smith et al., 2000b).

Cependant, ces lignées posent certaines limites. Tout d'abord, même si elles sont issues de tissus pulmonaires humains, ce sont des cellules immortalisées et donc perdent l'inhibition de contact. De plus elles subissent des modifications génétiques qui les éloignent du profil cellulaire retrouvé en contexte physiologique.

I.3.3.3.2 Les cellules bronchiques primaires

De plus en plus d'études sont maintenant réalisées à partir de cultures primaires de CEB, issues de donneur sain. Ces cultures *ex vivo* peuvent se réaliser en interface air-liquide (ALI) permettant de se rapprocher des conditions physiologiques. Même si la différenciation cellulaire s'effectue artificiellement, elle permet d'obtenir un épithélium différencié, organisé avec des jonctions serrées et des cils vibratiles. Les résultats obtenus avec ces cultures peuvent fluctuer, en raison principalement des caractéristiques des différents donneurs. Cependant, ces cultures cellulaires sont intéressantes pour étudier l'effet d'une co-culture avec un autre type cellulaire, des cytokines, un agent pharmacologique ou un antigène.

Certaines études décrivent l'implication des CEB comme la cible majeure de la réponse immune. Ces cellules joueraient un rôle central dans le développement de la BO (Fernández et al., 2004a; Jaramillo et al., 2003; Mauck and Hosenpud, 1996). Mauck et al. ont exploré ce concept *ex vivo* en démontrant que les CEB n'induisent pas uniquement une réponse alloimmune mais expriment différents facteurs de croissance qui peuvent jouer un rôle dans le développement de la BO (Mauck and Hosenpud, 1996). Ces résultats ont été confirmés par Jaramillio et al, qui ont démontré que les

anticorps anti-HLA de classe I sont capables d'activer les CEB, aboutissant à l'apoptose de ces cellules par la production de facteurs fibrotiques (Jaramillo et al., 2003). Une étude menée sur des biopsies et des cultures *ex vivo* de CEB de patients transplantés pulmonaires, démontre que les CEB sont capables d'exprimer la S100A4 (Ward et al., 2005). De la même façon, les auteurs démontrent une augmentation de la sécrétion de pro-MMP9 après stimulation avec du TGF- β 1 et confirment que ces cellules sont capables d'envahir un gel de collagène. Cette étude constitue la première démonstration de l'effet du TGF- β 1 sur des CEB issues de patients transplantés pulmonaires en culture primaire. Il serait intéressant de réaliser une cinétique de ces cultures dans le but de déterminer si la modification du phénotype cellulaire observée correspond à la réparation tissulaire ou à un processus fibrotique pathologique. En ce sens, ces investigations permettraient éventuellement d'identifier des marqueurs prédictifs du remodelage lié à la BO. Toutefois ces expériences ne prouvent pas le lien direct entre la TEM et la BO, mais soulignent plus la plasticité des CEB de patients transplantés pulmonaires que le rôle du TGF- β 1 dans la TEM (Borthwick et al., 2009). Des études menées sur l'environnement inflammatoire de cette pathologie montrent que le TGF β reste un des meilleurs candidats impliqués dans ce processus de fibrogenèse. A partir de biopsies issues de patients atteints de BO stimulées par du TGF- β 1, Borthwick et al. a démontré que les CEB étaient capables de subir une TEM caractérisée par une diminution d'expression d'E-cadhérine et une augmentation de l'expression de vimentine et de α -SMA. Le phénotype mésenchymateux se retrouve accentué en co-traitement par le TGF- β 1 et le TNF α . Borthwick et al ont démontré que le co-traitement par le TGF- β 1 avec soit le TNF α soit l'IL1- β , mais pas l'IL-8, accentuait le processus de TEM (Borthwick et al., 2009). D'autres éléments environnementaux liés à la transplantation pulmonaire ont déjà été testés comme inducteurs potentiels de la TEM. En effet, les infections bactériennes, comme celles dues à *P. Aeruginosa*, ont déjà été associées à une augmentation significative de l'inflammation chez des patients transplantés pulmonaires (Vos et al., 2008). Ainsi, Borthwick et al a testé l'influence de cette infection dans le processus de TEM sur des CEB provenant de patients transplantés pulmonaires. Les résultats montrent que *P. Aeruginosa* seul n'est pas capable d'induire la TEM, mais qu'en présence de TGF- β 1, il accentue la TEM et ce indirectement *via* l'activation de cellules immunitaires (Borthwick et al., 2011). Ces données soulignent la potentielle implication des cellules immunitaires dans la TEM chez le patient transplanté pulmonaire. Par ailleurs, les traitements immunosuppresseurs ont déjà été décrits comme de potentiels acteurs de la TEM dans le rejet chronique de rein (Strutz, 2009), mais actuellement aucune étude n'a été réalisée dans la BO. D'autres investigations sur des cultures *ex vivo* sont nécessaires afin de tester d'autres facteurs de risques comme l'influence de l'infection au CMV sur l'induction de la TEM. Des fibroblastes ont été identifiés dans les LBA de patients atteints de BO (Pollock et al., 2013). Une étude menée sur leur phénotype et leur activité démontre que ces derniers acquièrent un phénotype non prolifératif et sécréteur de MEC (Andersson-Sjöland et al., 2011).

II- RATIONNEL

L'agression épithéliale, d'origine allo-immune ou non allo-immune, aboutit à la dysfonction de réparation de l'épithélium et contribue au processus fibrotique. L'épithélium respiratoire contribue très largement au phénomène fibrotique par la sécrétion de facteurs de croissance et de médiateurs de l'inflammation. Certaines études décrivent l'implication des CEB comme la cible majeure de la réponse immune et ces cellules joueraient un rôle central dans le développement de la BO. Cependant les mécanismes cellulaires lors de ce remodelage restent encore à déterminer. De récentes études suggèrent l'implication de la TEM dans la BO (Borthwick et al., 2009; Flanders, 2004), mais ces travaux n'ont pas permis de prendre en compte le rôle des cellules immunitaires dans un contexte allogénique tel que celui de la transplantation pulmonaire.

II.1 Hypothèse testée

L'hypothèse est de déterminer si le contexte allogénique créé par l'interaction des CEB et des cellules immunitaires au cours de la transplantation pulmonaire contribue au remodelage bronchique *via* un processus de TEM (Figure 15).

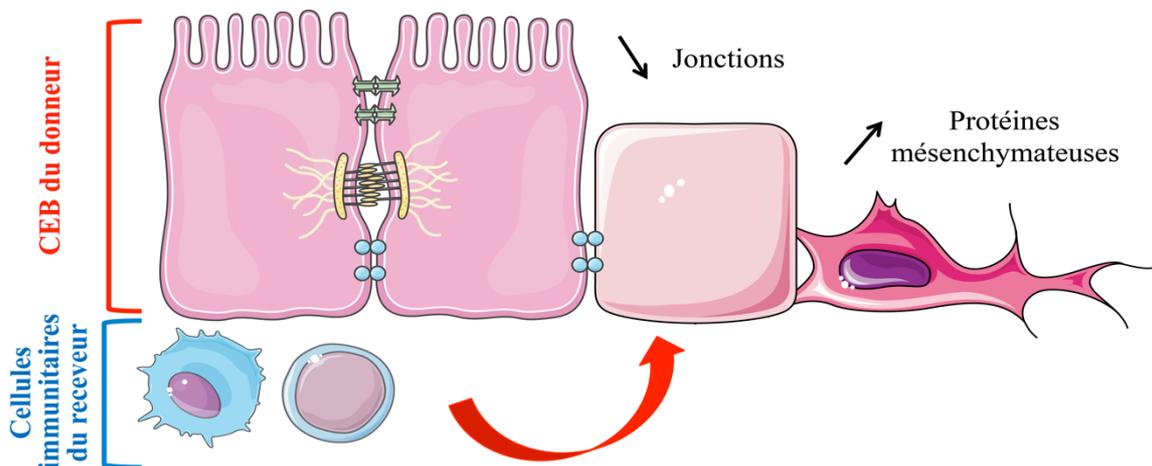


Figure 15: Hypothèse de l'influence du contexte allogénique sur la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la dysfonction chronique du greffon.

II.2 Les objectifs

L'objectif de mon travail de thèse a été de mettre en place un nouveau modèle *in vitro* de co-culture entre les CEB du donneur et les cellules immunitaires allogéniques, dans le but de tester l'influence du système immunitaire du receveur sur la TEM des CEB au cours de la transplantation pulmonaire.

Dans une première partie, l'objectif a été de tester la faisabilité du modèle sur des lignées cellulaires de CEB afin de déterminer les conditions de cultures optimales pour la réalisation de ce modèle et mettre au point les techniques d'investigation nécessaires à l'étude de ce modèle.

Dans une deuxième partie, nous avons appliqué ce modèle sur des CEB en culture primaire issues de donneur sain au cours de la transplantation pulmonaire afin de tester l'influence du contexte allogénique sur la TEM dans le développement du CLAD. Egalement ce modèle a pour but d'identifier et de valider de potentiels biomarqueurs prédictifs du CLAD.

III- RESULTATS

III-1 Partie I : Mise en place d'un modèle de co-culture en contexte allogénique

III.1.1 Introduction

La dysfonction chronique du greffon est la principale complication à long terme de la transplantation pulmonaire (Christie et al., 2010a). Cette dysfonction se manifeste par des lésions de bronchiolite oblitérante (BO). Ces lésions sont caractérisées par une réparation épithéliale excessive et un remodelage bronchique aboutissant à l'obstruction due au dépôt de matrice extracellulaire (MEC). Cependant les mécanismes cellulaires, mis en jeu dans le remodelage bronchique de la BO, ne sont pas encore élucidés. L'origine des cellules responsable de l'accumulation de MEC est encore inconnue. Il pourrait s'agir de la prolifération de fibroblastes résidents ou du recrutement de cellules progénitrices circulantes.

Bien que la réponse alloimmune joue un rôle dans le développement de la BO, l'épithélium respiratoire contribue très largement au phénomène fibrotique par la sécrétion de facteurs de croissance et de médiateurs de l'inflammation. Certains auteurs décrivent les cellules épithéliales bronchiques (CEB) comme la cible majeure de la réponse immune. Elles joueraient un rôle central dans le développement de la BO (Fernández et al., 2004a; Jaramillo et al., 2003; Mauck and Hosenpud, 1996) par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans le processus de remodelage bronchique (Borthwick et al., 2009, 2010; Hodge et al., 2009a; Ward et al., 2005).

La TEM correspond à la perte du phénotype épithélial des CEB, caractérisée par la perte de l'expression des protéines de jonction telles que l'E-cadhérine et la Zonula Occludens (ZO). Au cours de la TEM, ces CEB acquièrent un phénotype mésenchymateux mis en évidence par l'expression de vimentine, de S100A4, et de fibronectine. Ces cellules deviennent alors capables de migrer et de sécréter des molécules de la MEC (MMP et collagènes).

De précédentes études se sont focalisées sur le contexte inflammatoire et plus particulièrement le rôle du TGF- β 1, considéré comme le principal inducteur de la TEM au cours du remodelage bronchique (Borthwick et al., 2010; Hackett et al., 2009; Ward et al., 2005). Cependant, il n'existe

aucunes données démontrant l'influence des cellules immunitaires sur la TEM dans un contexte de remodelage bronchique. Le but de ce travail est de mettre en place un modèle *in vitro* de co-culture entre des CEB et des cellules immunitaires allogéniques. Le modèle cellulaire le plus physiologique est l'utilisation de CEB primaires. Cependant ce type de matériel n'était pas encore disponible au début de ce projet, nous avons donc réalisé ce modèle à partir de deux lignées cellulaires bronchiques : les beas-2b (B-2b) et les 16HBE14O-. Cette étape de mise au point nous a permis de démontrer la faisabilité du modèle et de déterminer les meilleures conditions de culture. Enfin, ce modèle a été testé en utilisant les 16HBE14O- permettant d'étudier l'influence des cellules immunitaires allogéniques sur le profil des CEB.

III.1.2 Matériels et méthodes

III.1.2.1 Modèle de co-culture cellules épithéliales pulmonaires, lymphocytes et monocytes

III.1.2.1.1 Préparation des cellules immunitaires

Les cellules immunitaires proviennent de sang de donneurs sains issus de l'établissement français du sang. Le sang est élué permettant de séparer les monocytes des lymphocytes périphériques (Plateforme DTC, Nantes). Un tri magnétique est effectué séparément sur chaque population cellulaire afin, d'une part d'augmenter la pureté de l'élué des monocytes et, d'autre part, d'isoler spécifiquement les LT. Brièvement, chaque population cellulaire est comptée et incubée avec des billes magnétiques, couplées à des anticorps anti-CD-3 pour les LT et anti-CD14, pour les monocytes (Mylteni biotech) pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées et triées à l'aide de l'automacs (Mylteni biotech). Les cellules sont ensuite comptées en cellule de Malassez après une dilution au 1/2 avec du bleu trypan. Les monocytes sont ensemencés (1×10^6 cellules/mL) en plaque 24 puits dans du milieu RPMI-1640 (Gibco) avec 1% de sodium pyruvate (Gibco), 5% de sérum de veau fœtal (Eurobio) et 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco). Les LT sont repris dans du milieu complet supplémenté avec 100UI/mL d'IL-2 (Immunotools) et stimulés pendant 4 jours dans une plaque 96 puits préalablement coatée avec un anti-CD3 (18h) (OKT3, ebioscience).

Pour l'étude de la cinétique d'activation, les cellules sont mises en présence d'anti-CD3 (stimulées) et comparées par rapport à un contrôle non stimulé. La vérification de l'activation des LT se réalise par cytométrie en flux. Brièvement, les cellules sont centrifugées puis le culot cellulaire est

repris avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire du récepteur à l'IL-2 (CD25-FITC, Beckman) et un marqueur de viabilité (Amcyan, life technologies) tous deux préalablement dilués dans du PBS/SVF 5%. Les cellules sont incubées à 4°C à l'obscurité pendant 20 minutes. Après une étape de lavage et de centrifugation, les culots cellulaires sont resuspendus dans du PBS/SVF 5% puis analysés au cytomètre de flux (LSRII, BD Bioscience – palteforme cytozell SFR François Bonamy). Les analyses sont effectuées sur le logiciel FACS DIVA (BD, bioscience).

III.1.2.1.2 Culture des lignées cellulaires bronchiques

La lignée cellulaire B-2b est issue de cellules bronchiques provenant d'un donneur lors d'une autopsie qui ont été immortalisées par l'infection avec le virus hybride SV40 (ATCC). La lignée 16HBE14O- a été obtenue auprès du Dr Dieter Gruenert (California Pacific Medical Center, San Francisco, CA, USA). Les cellules de cette lignée transformée proviennent d'un isolement de cellules épithéliales bronchiques humaines.

Chacune de ces lignées est cultivée dans des flasques de 75 cm², préalablement revêtues d'une solution à base de collagène de queue de rat I (Gibco), afin de créer un support biologique ayant des caractéristiques proches d'une lame basale. Toutes les lignées sont maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié, en présence de 5% de CO₂. Les cellules sont cultivées dans un milieu MEM α auquel est rajouté du sérum de veau fœtal (SVF 5%), 1% de L-Glutamine et un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine). Lorsqu'elles sont à 90% de confluence, elles sont repiquées à l'aide d'une enzyme la trypsine (Gibco). Son activité est interrompue par l'addition de 5 mL de milieu de culture. Les flasques sont rincées plusieurs fois avec du milieu de culture et les cellules agglomérées sont séparées par des allers-retours successifs avec la pipette. La concentration cellulaire est déterminée après un comptage sur lame de Malassez avec une dilution au 1/2 avec du bleu trypan. Les cellules sont ensuiteensemencées soit dans une nouvelle flasque (pour l'entretien de la lignée cellulaire) soitensemencées sur des transwells (pour expérience). Ces transwells sont des membranes de polyester de porosité 0,4 μ m et permettent de séparer un compartiment basal et un compartiment apical (Transwell clear, Corning). Tous les supports utilisés en culture sont préalablement coatés avec du collagène de queue de rat I pendant 2 heures (Gibco, France) facilitant l'adhérence cellulaire.

III.1.2.1.3 Mise en co-culture

Après 4 jours de stimulation avec un anti-CD3 et de l'IL-2, les LT sont lavés puis comptés. Les monocytes sont récupérés, lavés et comptés. À confluence des CEB, les transwells sont donc inversés et une goutte de cellules immunitaires, contenant 300 000 LT et/ou 150 000 monocytes par puits est déposée sur la face inférieure du filtre. Les transwells coâtés sont placés à 37°C pendant 2 heures. Au terme de l'incubation, les transwells sont remis dans leur sens conventionnel avec du milieu au pôle basolatéral. Les co-cultures sont réalisées pendant 5 jours (Figure 16).

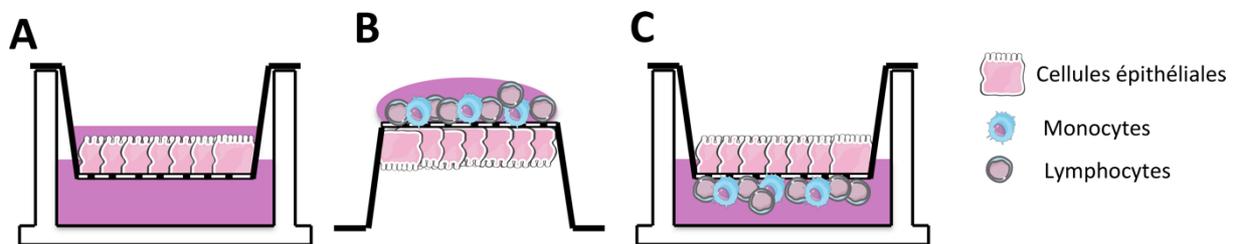


Figure 16 : Schéma de la co-culture cellules épithéliales et cellules immunitaires.

(A) : Les cellules épithéliales sont cultivées sur un transwell en condition liquide-liquide, jusqu'à la confluence cellulaire. (B) : Les cellules immunitaires sont coâtées en face inférieure du transwell dans une goutte de milieu pendant 2 heures à 37°C. (C) A la fin de l'incubation, le transwell est retourné, dans sa position initiale. Le milieu au pôle apical est retiré créant une interface air-liquide (ALI).

III.1.2.2 Investigation sur les cellules épithéliales

III.1.2.2.1 Mesure de la résistance trans-épithéliale

L'intégrité des jonctions étanches est évaluée par la mesure de la résistance trans-épithéliale (RTE) en utilisant un Volt Ohm-mètre (EVOM², World Precision Instruments). Avant toute mesure, la sonde est désinfectée à l'éthanol 70% puis rincée avec de l'eau stérile. La sonde est ensuite étalonnée dans du milieu de culture préalablement conditionné à 37°C. Les mesures sont effectuées en triplicat par puits. Chaque valeur expérimentale obtenue est exprimée en ohms/cm².

III.1.2.2.2 Mesure de la perméabilité

Cette expérience permet de déterminer si le réseau de jonction est fonctionnel en évaluant le transport paracellulaire. Une solution de Dextran-FITC 4kDa (Sigma) à 1 mg/mL est appliquée au pôle apical de la culture. Un prélèvement de milieu est effectué au pôle basolatéral. La fluorescence est mesurée au cours du temps (pendant 8 heures) au spectrophotomètre (VICTOR X Multilabel Plate Reader, Perkin Elmer).

III.1.2.2.3 Extraction de l'ARN et des protéines

L'extraction des protéines et de l'ARN des CEB en culture est réalisée avec le kit NucleoSpin® Macherey Nagel Acid Nucleic and Protein Extraction. Les CEB sur le transwell sont lysées avec un agent chaotrope (RP1). Le lysat est ensuite filtré sur colonne et la partie éluée est reprise avec de l'éthanol 70%. Après centrifugation l'ARN est adsorbé sur une membrane de silice et la fraction protéique se retrouve dans l'éluat. Un traitement à la DNase est effectué afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique. Les ARN sont élués, dosés au nanodrop (Nanodrop 2000, spectrophotometers, Thermo Scientific) et conservés à -80°C. La fraction protéique est précipitée puis purifiée, et reprise dans du PSB-TCEP (agent dénaturant). Les protéines sont dénaturées 3 minutes à 98°C. Après centrifugation, les surnageants sont conservés puis congelés à -20°C.

III.1.2.2.4 Analyse de l'expression protéique

La concentration protéique des échantillons est déterminée par une réaction colorimétrique (Macherey Nagel). 50µg de protéines sont déposés sur un gel à gradient (Biorad) et séparés selon leur poids moléculaire. Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé à l'aide d'un transblot® (Biorad). Après vérification du transfert protéique par une coloration au rouge Ponceau, la membrane est saturée dans du TBS (tris buffer saline) – Tween 0,1% Lait 5%. Les anticorps primaires et les dilutions utilisées sont indiqués dans le tableau 2. Les anticorps primaires sont dilués dans du TBS-Tween 0.1%-Lait 5% et incubés toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite rincée dans du TBS-Tween 0.1%, puis incubée avec les anticorps secondaires (Goat anti mouse IgG-HRP, Goat anti rabbit IgG-HRP, Santa Cruz) couplés à la peroxydase (HRP). 3 lavages avec du TBS-Tween 0.1% sont réalisés. Les membranes sont révélées grâce à un kit de détection de chemiluminescence (Clarity BioRad) et le signal émis est quantifié par caméra (imageLab Biorad). La normalisation du western blot est réalisée par rapport à la GAPDH.

Anticorps	Fournisseur	Dilution
ZO-1 (Rabbit)	Life technologies	1/500
E-cadhérine (Mouse)	Life technologies	1/500
Claudine-1 (Rabbit)	Life technologies	1/500
GAPDH	Santa Cruz	1/7500
Goat anti mouse IgG-HRP	Santa Cruz	1/10 000
Goat anti rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	1/10 000

Tableau 2: Tableau des anticorps utilisés en western blot et en Immunofluorescence

III.1.2.2.5 Immunofluorescence

Après avoir rincé les transwells avec du PBS, l'épithélium est fixé avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. Après 3 rinçages avec du PBS/BSA 1% (Bovine sérum albumine), l'épithélium est perméabilisé avec une solution de PBS/Triton 0,1%. Après 3 rinçages, l'épithélium est incubé avec une solution d'anticorps primaires dilués dans du PBS/BSA 1% (Tableau 3). Après une série de lavages, les cellules sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (Tableau n°X). Les noyaux sont marqués avec un agent intercalant de l'ADN (DAPI). Après 3 lavages, le montage en lame-lamelle est réalisé dans du prolong gold (Lifetec®). Les lames sont observées sous microscope à épifluorescence (Axiovert 200M Carl Zeiss). Les images sont traitées par le logiciel Axiovision 4.5, (Carl Zeiss).

Anticorps	Fournisseur	Dilution
ZO-1 (Rabbit)	Life technologies	1/250
E-cadhérine (Mouse)	Life technologies	1/250
Alexa fluor 488 chicken anti mouse IgG	Life technologies	1/1000
Alexa fluor 568 goat anti rabbit IgG	Life technologies	1/1000
Dapi	Life technologies	1/2000
Prolong-Gold	Life technologies	1/1000

Tableau 3 : Tableau des anticorps utilisés en immunofluorescence.

III.1.2.2.6 Dosage des cytokines par multiplex

Les cytokines présentes dans les surnageants de culture sont dosées par technique multiplex, à l'aide d'un kit 27-plex (Bio-Plex Pro™, BIO-RAD). Cette technique présente l'avantage de quantifier simultanément à l'aide de billes magnétiques, 27 cytokines (IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, basic FGF, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, PDGF-B, RANTES, TNF- α , VEGF) dans un même échantillon.

Lors de l'analyse, le lecteur de plaque (Système BIO-PLEX) identifie chaque bille *via* son code couleur (premier laser 635nm) et y associe une intensité de fluorescence de la phycoérythrine (PE) (deuxième laser 532nm) (Figure 17). Les dosages ont été réalisés sur plaque magnétique où chaque échantillon a été analysé en duplicat.

Succinctement, des billes magnétiques sont déposées à raison de 25 μ L/puits. Après deux lavages automatisés (100 μ L de Wash buffer), les standards et les échantillons (surnageants de culture purs) sont rajoutés (60 μ L/puits) et incubés 30 minutes sous agitation. Les puits sont ensuite lavés 3 fois puis les anticorps de capture, dilués au 10^{ème} dans du PBS-SVF 5%, sont déposés (25 μ L/puits) suivi d'une incubation de 30 minutes sous agitation. Dans chaque puits préalablement lavé, 50 μ L de streptavidine couplée à de la PE diluée au 100^{ème} ont été rajoutés et incubés 10 minutes sous agitation. La plaque est ensuite lavée avec du tampon d'essai pendant 5 minutes sous agitation. La plaque est alors passée au lecteur de plaques (Système BIO-PLEX). La conversion des intensités de fluorescence en concentration s'effectue *via* la gamme étalon. Toutes les concentrations inférieures au seuil de détection se voient assignées la plus basse valeur de la gamme.

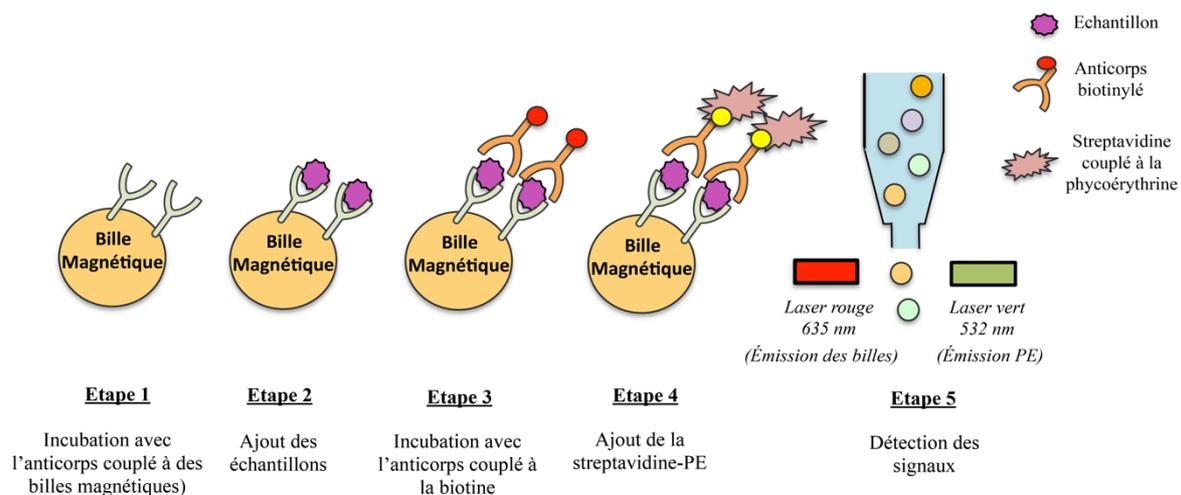


Figure 17: Principe du dosage et de la détection des cytokines par la technologie Luminex®

III.1.2.2.7 Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph Prism®. Un test non paramétrique de Mann-Whitney, adapté aux petits échantillons, a été utilisé pour la comparaison des moyennes d'expression des marqueurs dans les différentes conditions de culture. Par convention, le seuil de significativité α a été fixé à 0,05.

III.1.3 Résultats

III.1.3.1 Analyse moléculaire des deux lignées cellulaires

Dans un premier temps, nous avons réalisé la caractérisation moléculaire et structurale de l'épithélium réalisé à partir des deux lignées cellulaires.

Les investigations en western blot montrent une expression protéique différentielle entre les deux lignées cellulaires. En effet, les expressions de l'E-cadhérine et de la claudine-1 sont plus élevées dans les cultures 16HBE140- que dans les cultures B-2b. L'expression de la jonction serrée ZO-1 n'est pas différente entre les deux lignées cellulaires (Figure 18A et B).

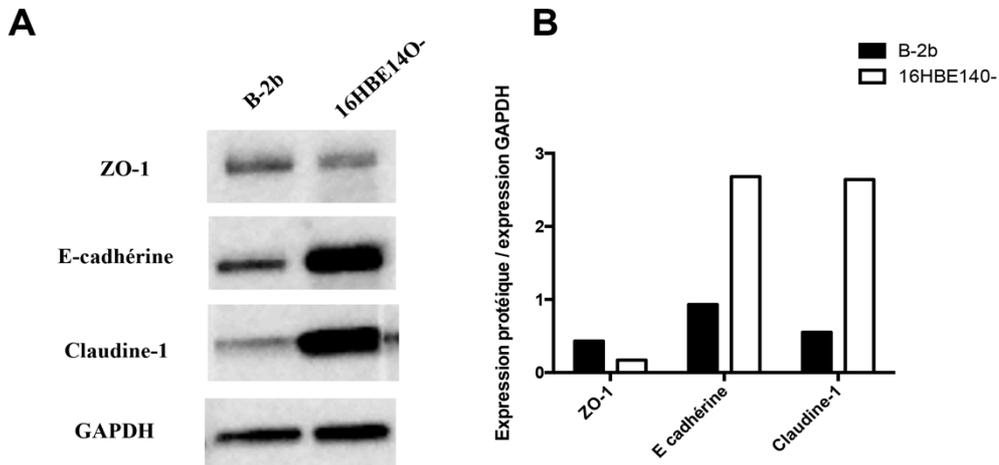


Figure 18: Expression protéique des différentes jonctions épithéliales dans des cultures de lignées cellulaires bronchiques.

(A) Western blot le plus représentatif de l'expression de la Zonula-Occludens (ZO-1), E-cadhérine et claudine-1, dans des cultures B-2b et des cultures 16HBE140-. (B) Ratio de l'expression protéique sur l'expression de la protéine de référence GAPDH.

L'identification de l'E-cadhérine dans les cultures de 16HBE140- met en évidence une monocouche cellulaire organisée en « nid d'abeille » (Figure 19A). Cette jonction est également présente dans les cultures de B-2b. Cependant, ce marquage ne permet pas d'identifier une monocouche cellulaire avec des délimitations caractéristiques d'un épithélium pulmonaire (Figure 19B).

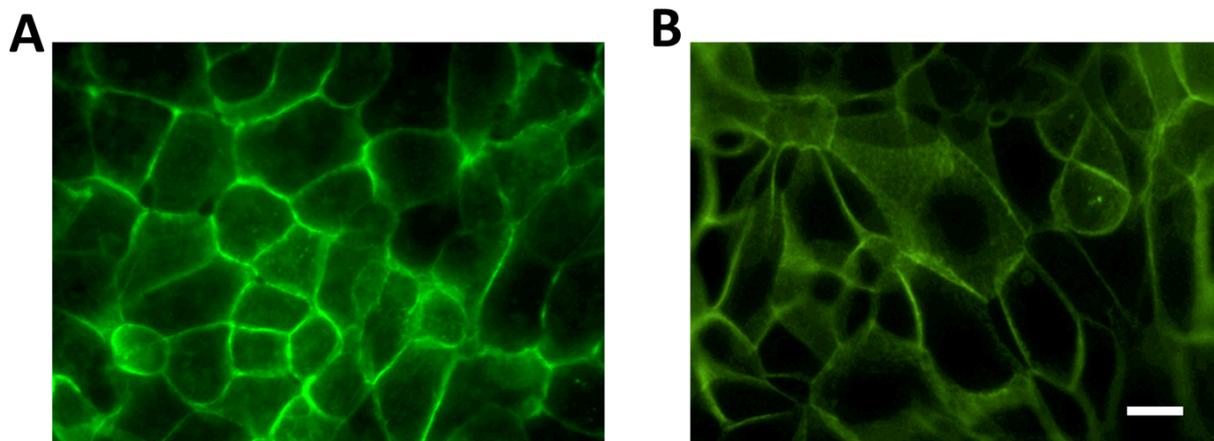


Figure 19 : Immunofluorescence de jonctions cellulaires dans les différentes lignées cellulaires bronchiques.

Immunofluorescence identifiant l'E-cadhérine (vert) dans (A) des cultures de 16HBE14O- (B) des cultures de B-2b, barre blanche =10 μ m.

III.1.3.2 Analyse fonctionnelle des deux lignées cellulaires en interface air-liquide (ALI)

Afin de se rapprocher du contexte physiologique de l'épithélium bronchique, nous avons comparé la culture de deux lignées cellulaires, les B-2b et les 16HBE14O-, en ALI. Dans un premier temps, nous avons étudié les paramètres fonctionnels de l'épithélium.

Le suivi de la mesure de RTE au cours du temps, permet d'étudier la constitution d'un réseau de jonctions épithéliales. Nous remarquons que la RTE est faible une journée (J1) après l'ensemencement des cultures B-2b (170 ohms/cm²). De plus, ce même paramètre augmente faiblement dans les cultures B-2b pour atteindre un plateau à J5 (200 ohms/cm²) (Figure 20A). Ce plateau signifie que les cellules sont à confluence. Nous remarquons que la mise en ALI modifie très peu ce paramètre (240 ohms/cm²). Concernant la culture de 16HBE14O-, la RTE à J1 est plus élevée (500ohms/cm²) et évolue rapidement vers la valeur de 1000 ohms/cm² atteinte à J2. La mise en ALI de ces cultures provoque une forte diminution de la RTE (480 ohms/cm²), puis se stabilise au cours du temps (Figure 20B).

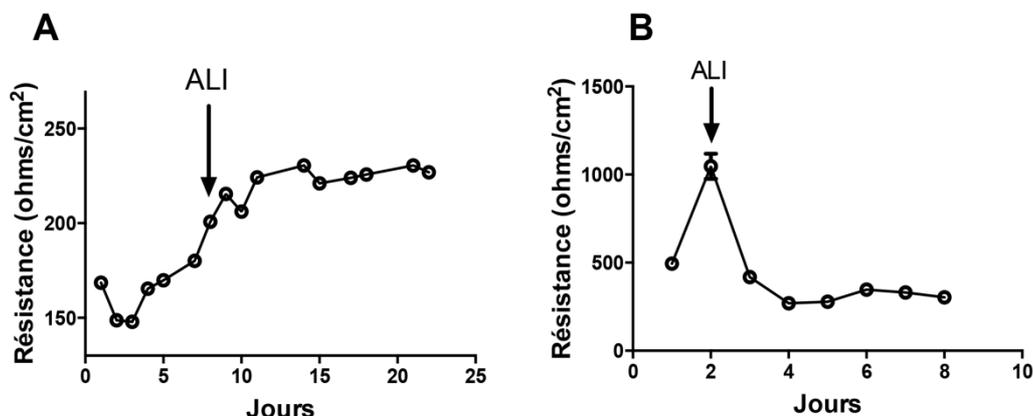


Figure 20 : Suivi de la résistance transépithéliale au cours du temps sur des cultures de lignées cellulaires bronchiques.

(A) : La lignée cellulaire B-2b est cultivée jusqu'à confluence (J8), puis en ALI. (B) Les cellules épithéliales 16HBE140- sont cultivées jusqu'à confluence (J2) puis en ALI. Pour ces deux lignées cellulaires, l'évolution de la RTE au cours du temps est étudiée.

Ces deux cultures présentent une RTE qui se stabilise après la mise en ALI. Ce résultat démontre que l'ALI ne modifie pas la constitution d'un réseau jonctionnel. Cependant, la RTE ne donne pas d'informations sur la fonctionnalité de ce réseau.

La perméabilité est le second paramètre mesuré sur ces cultures. Cette mesure permet d'évaluer la fonctionnalité des jonctions serrées. Ainsi un épithélium avec des jonctions serrées fonctionnelles possédera un passage moindre de molécules et sera considéré comme imperméable. Nous remarquons que la mise en ALI des cultures B-2b diminue ce paramètre (-25%) (Figure 21A). Alors que la perméabilité des 16HBE140- est très peu modifiée par la mise en ALI (-5,5%) (Figure 21B).

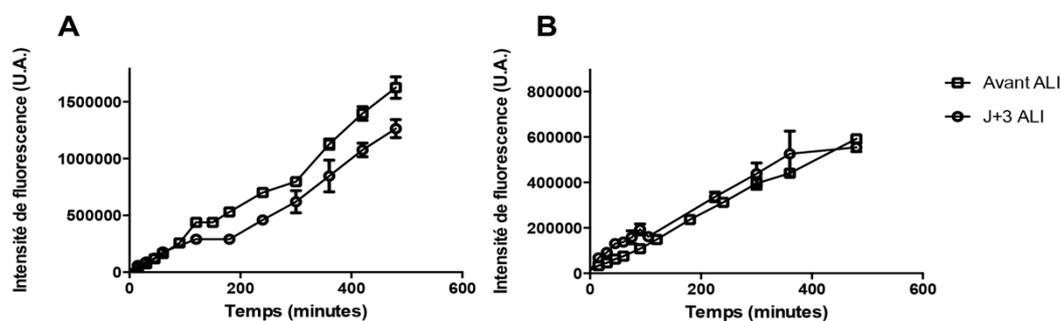


Figure 21: Evaluation de la perméabilité de culture de lignées cellulaires bronchiques.

Mesure de la perméabilité au cours du temps (A) dans des cultures de B-2b et (B) dans des cultures de 16HBE140-.

Cette étude de perméabilité a permis de démontrer que l'ALI semble améliorer la fonctionnalité du réseau jonctionnel dans les cultures B-2b alors aucune modification n'est observée dans les cultures 16HBE14O-.

Ces analyses fonctionnelles et moléculaires permettent de démontrer que les cultures cellulaires réalisées à partir de 16HBE14O- sont plus adaptées pour notre modèle d'étude, liés à l'identification d'une monocouche de cellules et à l'expression des jonctions cellulaires.

III.1.3.3 Validation des conditions de culture pour la réalisation du modèle in vitro d'interaction

III.1.3.3.1 Viabilité des monocytes

Les monocytes sont coâtés en face inférieure du transwell. Les résultats préliminaires obtenus en microscopie de contraste de phase montrent que les monocytes adhèrent bien au filtre et sont viables (colorant Hoescht), même après 5 jours de culture (Figure 22).

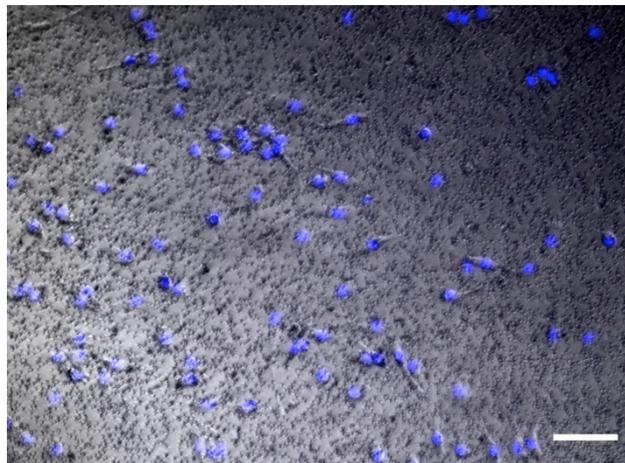


Figure 22: Etude de la viabilité des monocytes après une co-culture avec 16HBE14O-.

Identification des monocytes en bleu (Colorant Hoechst), microscopie à contraste de phase (x20) après 5 jours de co-culture. Barre blanche =20µm.

III.1.3.3.2 Stimulation des LT

L'activation des LT au cours du temps a été étudiée par un marquage du récepteur à l'IL-2 (CD25). Les résultats montrent une augmentation de l'expression du CD25 maximale à J4 (32 %)

comparé au contrôle non stimulé (11 %) (Figure 23). A partir de J7, l'expression du CD25 ne diffère pas du contrôle non stimulé.

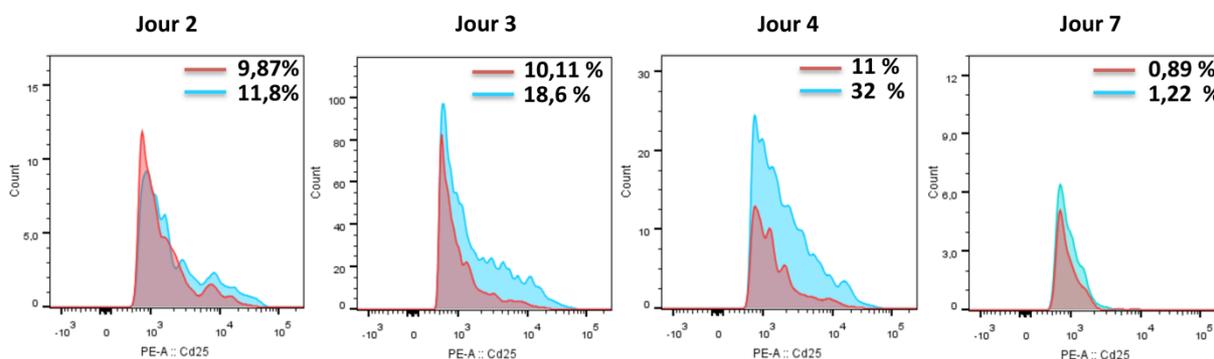


Figure 23: Etude de la stimulation des Lymphocytes T au cours du temps.

Suivi au cours du temps de l'expression du récepteur à l'IL-2 (CD25) par cytométrie en flux, à la surface cellulaire des LT après stimulation avec un anti-CD3. En rouge, les LT non stimulés et en bleu les LT stimulés.

III.1.3.3.3 Suivi de la RTE au cours d'une co-culture

Dans le but de déterminer la durée de co-culture, nous avons réalisé ce modèle avec des 16HBE140- et des monocytes et/ou LT allogéniques. La RTE a été mesurée quotidiennement permettant d'étudier l'influence des monocytes et/ou LT sur les jonctions des CEB. Les résultats de la figure 24, nous montrent que la RTE diminue au cours du temps de la co-culture (% de diminution). Au cours des 7 jours de co-culture, la valeur de la RTE diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur inférieure à 200 ohms/cm². L'évolution de la RTE n'est pas différente selon la co-culture (avec monocytes et/ou LT) comparée à la culture de l'épithélium seul (Figure 24).

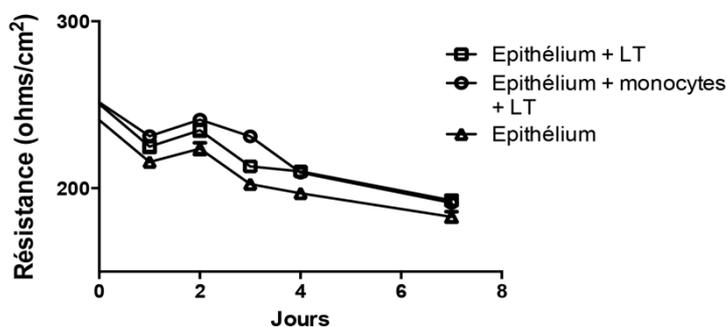


Figure 24: Suivi de la résistance transépithéliale au cours d'une co-culture 16HBE140- et cellules immunitaires.

III.1.3.4 Application du modèle *in vitro* à partir de la lignée de 16HBE140-

III.1.3.4.1 Analyse moléculaire de la co-culture

L'expression relative de l'E-cadhérine ne diffère pas de la condition contrôle toutefois, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la ZO-1 ($p=0,057$; figure 25A). Ces résultats sont confirmés par western blot (Figure 25B). Concernant les gènes mésenchymateux comme l' α -SMA et la fibronectine, leur expression est inchangée par rapport au contrôle (Figure 25A).

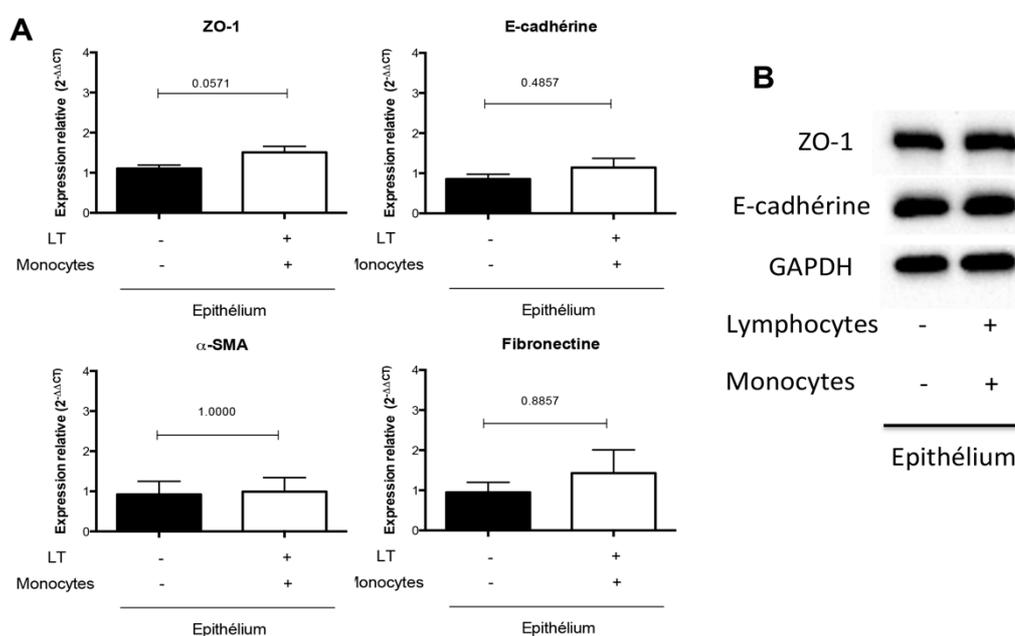


Figure 25: Analyse moléculaire des co-cultures 16HBE140- et cellules immunitaires.

(A) Analyse de l'expression relative des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (n=5). (B) Analyse de l'expression protéique des différentes jonctions cellulaires.

III.1.3.4.2 Etude de l'environnement inflammatoire de la co-culture

L'analyse de l'environnement cytokinique des surnageants de co-culture a été effectuée par la technique de bioplex. Cette dernière permet à partir d'un volume faible d'échantillon d'étudier plus de 20 cytokines. Ainsi, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que les concentrations de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α sont significativement augmentées dans les surnageants des triples co-cultures comparés à la sécrétion de l'épithélium seul (Figure 26). La

sécrétion d'IL-13, molécule pro-Th2, est également significativement augmentée en triple co-culture par rapport à la sécrétion de l'épithélium seul (figure 26). La sécrétion d'IL-17, molécule pro-Th17 est augmentée dans les surnageants d'épithélium en co-culture avec les LT et monocytes. La sécrétion d'IL-4 n'est pas modifiée en triple co-culture (figure 26). Les dosages des autres cytokines n'ont pas pu être exploités car leur concentration était trop faible.

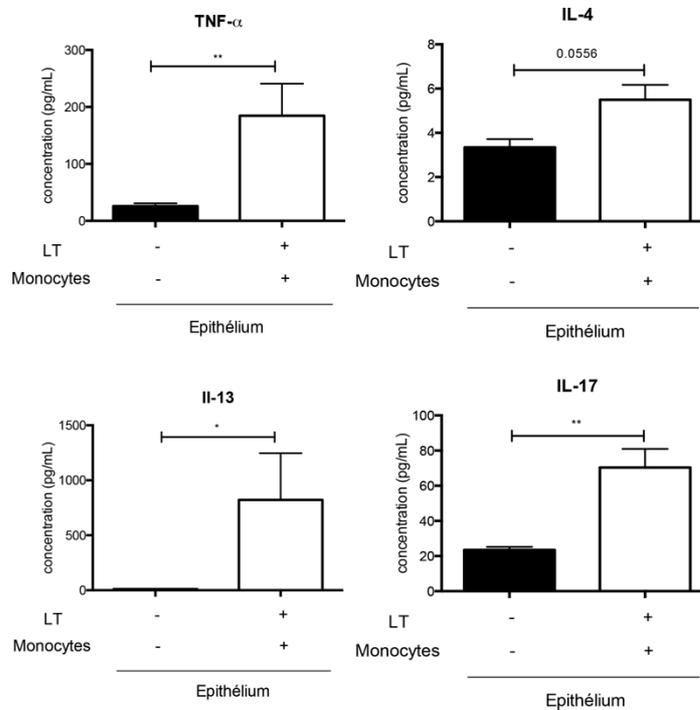


Figure 26: Analyse du contexte inflammatoire au cours de co-culture entre les 16HBE14O- et les cellules immunitaires.

Analyse de la sécrétion de molécules pro-inflammatoire (TNF- α), de molécules pro-Th2 (IL-4, IL-13) et molécule pro-Th17 (IL-17) (n=5 ; p<0,05).

III.1.4 Discussion

Ces investigations menées à partir de lignées cellulaires épithéliales bronchiques ont contribué à la définition des conditions de culture du modèle *in vitro* d'interaction CEB et cellules immunitaires. Ces deux lignées cellulaires, les B-2b et les 16HBE14O-, ont été choisies pour leur origine non cancéreuse. Les expériences menées sur ces deux lignées cellulaires ont permis de mettre en évidence des différences fonctionnelles et moléculaires.

Cette partie discute les critères de choix de la lignée 16HBE14O- pour la mise en place d'un modèle *in vitro* de co-culture. Ces critères ont porté sur l'identification d'un réseau jonctionnel, la quantification de l'expression et la fonctionnalité de ce dernier. Egalement, ces deux lignées cellulaires ont été testées dans le but de réaliser une culture en ALI.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'expression protéique de la ZO-1 dans les cultures de B-2b est faible comparé à celle dans les 16HBE14O-. De plus, l'observation en microscopie à fluorescence de l'E-cadhérine dans ces cultures permet d'identifier un réseau jonctionnel qui se chevauche. Cette observation démontre que la culture des B-2b à confluence provoque la formation d'une multicouche de cellules. À l'inverse, les cultures de 16HBE14O- forme une monocouche cellulaire avec un réseau jonctionnel organisé. Ces résultats démontrent que les cultures avec les B-2b ne sont pas un modèle adapté pour étudier l'évolution de l'expression des jonctions. Dans la littérature, ces cellules sont utilisées pour l'étude de la régulation de cytokines (Atsuta et al., 1997; Mullol et al., 1996), des récepteurs aux glucocorticoïdes (Verheggen et al., 1996) ainsi que l'exposition aux particules et au tabac (Steerenberg et al., 1998; Sun et al., 1995).

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la constitution de ce réseau jonctionnel au cours du temps ainsi que sa fonctionnalité. Les mesures quotidiennes de RTE ont démontré que les B-2b avaient une faible valeur initiale de RTE comparée au 16HBE14O- (Figure 20). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui décrit une valeur de RTE maximale moyenne entre 100 et 200 ohms/cm² (Noah et al., 1995). Ces faibles valeurs de RTE confirment la faible expression protéique des jonctions cellulaires par notre étude en western blot (Figure 18). Les expériences de perméabilité ont démontré que le réseau jonctionnel était fonctionnel dans les deux cultures. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, car ces deux lignées cellulaires sont utilisées pour l'étude du transport de drogues ou de particules (Forbes and Ehrhardt, 2005; Nakamura et al., 2010).

Ces deux lignées cellulaires réagissent différemment au passage en interface ALI. L'exposition du pôle apical à l'air contribue à la différenciation de la culture cellulaire, caractérisée par l'apparition de cellules ciliées et sécrétrices. Dans la littérature, il est décrit que le passage en ALI se réalise lorsque la RTE atteint une valeur seuil de 1000 ohm/cm² qui témoigne de la confluence des cellules et de la constitution d'un réseau jonctionnel. À l'inverse des 16HBE14O-, cette valeur seuil n'est pas atteinte par les cultures avec des B-2b au cours du temps et ce malgré la confluence cellulaire.

Une diminution de la RTE est observée dans les cultures de 16HBE14O- après la mise en ALI et n'évolue plus au cours du temps. Cette observation peut s'expliquer par l'influence du milieu présent au pôle apical avant la mise en ALI (Ehrhardt et al., 2002). En revanche la présence d'une multicouche cellulaire dans les cultures de B-2b peut expliquer cette stabilisation de la RTE après la mise en ALI. Nos investigations sur la perméabilité ont permis de démontrer que le passage en ALI n'affecte que très peu ce paramètre. La tendance à la diminution de la perméabilité retrouvée après la mise en ALI dans les cultures B-2b peut également être expliquée par la présence d'une multicouche de cellules. Ces résultats démontrent que la culture en ALI est possible avec les cultures 16HBE14O-. Toutefois, il serait intéressant de tester la différenciation de ces cultures. Des études démontrent la possibilité de mise en ALI de ces cultures, avec l'identification de cellules ciliées (Cozens et al., 1994) et proposent d'utiliser ce modèle pour l'étude de transports de molécules (Forbes and Ehrhardt, 2005; Forbes et al., 2003). La mise en ALI d'une culture de CEB contribue à la différenciation cellulaire et permet à terme d'obtenir une culture étanche. Les différentes investigations menées montrent que les cultures de 16HBE14O- sont plus adaptées pour l'étude des jonctions. En effet, les valeurs de RTE sont plus élevées dans ces cultures et atteignent la valeur seuil de 1000 ohms/cm². Ce résultat est en accord avec l'expression protéique des jonctions, l'observation microscopique d'une monocouche cellulaire avec un réseau jonctionnel organisé et fonctionnel (figure 19).

Ces mises au point démontrent que les mesures de différents paramètres de l'épithélium telles que la RTE, la perméabilité et l'observation microscopique sont complémentaires et nécessaires dans le choix de la lignée cellulaire pour notre modèle. Dans ces travaux, nous avons étudié l'expression et la fonctionnalité des réseaux jonctionnels de l'épithélium, paramètres nécessaires pour étudier la TEM. En ce sens, Doerner et al, ont démontré la possibilité d'induire la TEM sur ces cellules, sans mise en ALI ni confluence, après une exposition de 72 heures au TGF-β1 (Doerner and Zuraw, 2009). Egalement, Hackett et al, ont réalisé l'induction de la TEM par le TGF-β1 sur des 16HBE14O- dans un système de transwell (Hackett et al., 2009).

Les analyses fonctionnelles et moléculaires sur la lignée cellulaire 16HBE14O- ont contribué à déterminer les conditions de culture de ce modèle *in vitro* de co-culture CEB et cellules immunitaires. De nombreuses études ont testé l'influence des infections virales ou bactériennes (Gregson et al., 2013; Hayes et al., 2012; Magnusson et al., 2013; Weigt et al., 2013b) ou d'autres particules (Heijink et al., 2010; Runswick et al., 2007; Wan et al., 1999) grâce à des modèles de co-culture avec des CEB. Le rôle des macrophages et des DC a également été testé grâce à ces modèles d'interaction (Rothen-Rutishauser et al., 2008, 2005). Concernant l'épithélium respiratoire *in vitro*, aucune étude n'a testé l'influence des cellules immunitaires dans le rejet de transplantation pulmonaire. En effet, les LBA de patients porteurs de BO comportent un infiltrat de cellules inflammatoires parmi lesquelles figurent les monocytes et les LT activés (Greenland et al., 2014). Ces derniers contribuent à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires ainsi qu'au recrutement d'autres populations cellulaires sur le site

inflammatoire (Hodge et al., 2012; Verleden et al., 2011). Ce nouveau modèle *in vitro* permet d'étudier leur rôle sur le profil des CEB dans le contexte allogénique de transplantation. L'analyse moléculaire démontre que la présence de cellules immunitaires au pôle basolatéral ne modifie pas l'expression de jonctions (figure 25). De la même façon, elles n'induisaient pas la production de protéines mésenchymateuses comme la fibronectine, la vimentine ou l' α -SMA. Dans la littérature, des modèles cellulaires ont déjà montré l'implication des lymphocytes comme facteur déclenchant l'apparition de la TEM dans d'autres organes. KA Rygiel et al, (Rygiel et al., 2010) reproduit le potentiel inducteur de TEM des LT en co-culture avec une lignée de cellules épithéliales biliaires. De la même façon, dans le cancer du sein (Santisteban et al., 2009) et dans le rejet chronique rénal (Robertson, 2004), l'implication des LT dans l'induction de la TEM est souligné, en mettant en avant leurs capacités à être activés et à induire la TEM *via* le TGF- β 1. Cependant ces modèles de double culture ne prennent pas en compte le rôle des DC, qui jouent pourtant un rôle central dans le développement des rejets aigus et chroniques (Joffre et al., 2008).

Les dosages effectués sur les surnageants de culture ont mis en évidence un contexte inflammatoire. Outre le TGF- β 1, qui est décrit comme le principal inducteur de la TEM, d'autres cytokines peuvent contribuer à ce processus. Ainsi, le TNF- α , cytokine pro-inflammatoire est sécrétée dans les surnageants de triple co-culture. Cette cytokine a déjà été démontrée comme accentuant la TEM induite sur des CEB primaires par le TGF- β 1 (Willis et al., 2005; Borthwick et al., 2009; 2010b; Câmara and Jarai, 2010; Kamitani et al., 2011). Récemment, le TNF- α a même été identifié comme capable d'induire seul la TEM sur des cellules rénales carcinomateuses (Ho et al., 2012). Dans les surnageants de triple co-culture, nous retrouvons une augmentation significative de la sécrétion d'IL-1 β . Cette cytokine a déjà été démontrée comme inducteur potentiel de la TEM (Borthwick et al., 2010a). Dans cette étude, l'accentuation de la TEM est effectuée lors de la co-culture de macrophages activés et de CEB, préalablement conditionnées avec du TGF- β . L'IL-17, pro-inflammatoire, est également sécrétée en triple co-culture. Burlingham et al. ont aussi démontré l'importance de l'IL 17 dans la BO (Burlingham et al., 2007), suggérant la neutralisation de l'IL-17 comme moyen thérapeutique potentiel du rejet chronique pulmonaire (Fan et al., 2011).

L'analyse des surnageants de culture montre que notre modèle, associant des CEB avec une co-culture de monocytes-LT activés, comporte à la fois des éléments fortement potentialisateurs du phénomène fibrotique de TEM (TNF- α , IL-1 β), et des facteurs pro-inflammatoire (IL-17, IL-13) pouvant altérer l'épithélium bronchique. Les travaux de Borthwick et Fisher (Borthwick et al., 2010a) ont souligné l'importance de l'inflammation dans la TEM sur un modèle de réparation épithéliale. De façon intéressante, notre modèle de triple co-culture reproduit l'environnement inflammatoire impliqué dans la BO. L'importance de l'IL-13 a déjà été démontrée dans un modèle murin de BO (Keane et al., 2007; Smith et al., 2007b) et cette cytokine contribuerait au phénomène de

fibroprolifération (Keane et al., 2007; Lama et al., 2006). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β est augmentée dans les LBA de patients porteurs de BO (Magnan et al., 1994; Riise et al., 1998; Vanaudenaerde et al., 2008b).

La réalisation de ce modèle de co-culture avec une lignée cellulaire 16HBE14O- nous a permis d'une part de démontrer la faisabilité technique du modèle et d'autre part, de tester l'influence du contexte allogénique dans l'induction de la TEM. Cependant, ce modèle comporte certaines limites. Tout d'abord, le temps de contact entre l'épithélium et les LT/monocytes n'est peut être pas suffisant pour induire une modification d'expression des ARNm de marqueurs tardifs de la TEM comme l' α -SMA et la fibronectine. En effet, nous avons prouvé que les monocytes restent adhérents au filtre jusqu'à la fin de la culture (Figure 22). Ce n'est pas le cas des LT qui après quelques jours de culture n'adhèrent plus au filtre. Le temps de co-culture de ce modèle est supérieur à celui utilisé pour la réaction leucocytaire mixte (RML) (de 48 heures à 72 heures) qui est plutôt associée au rejet aigu. Des expériences menées sur la viabilité des lymphocytes montrent un fort taux de mortalité cellulaire après 8 jours de co-culture avec l'épithélium.

D'autre part, l'utilisation d'une lignée cellulaire nous a permis de développer ce modèle avec des CEB, et non des cellules alvéolaires couramment utilisées pour les expériences d'induction de TEM. Cependant le profil d'expression des protéines de jonction ainsi que des protéines de type mésenchymateux peut différer de celui retrouvé dans une culture primaire. L'ensemble de ces résultats sera donc à confirmer, dans un modèle plus proche des conditions allogéniques avec l'utilisation de CEB primaires humaines.

En conclusion, ces résultats préliminaires nous ont permis de démontrer la faisabilité technique de ce modèle et de tester l'influence des cellules immunitaires sur le profil des CEB. Dans le but de réaliser un modèle au plus proche des conditions allogéniques, ce modèle doit être appliqué à la transplantation pulmonaire en mettant en contact les CEB du donneur avec les monocytes et LT du receveur. Ceci nous permettra de déterminer si la TEM observée *in vitro* pourrait être considérée comme un facteur de risque du développement du CLAD.

III.2 Partie II

III.2.1 Hypothèses et objectifs

De récentes études décrivent l'implication de la TEM dans le remodelage bronchique lié au développement de la BO. Nous avons formulé l'hypothèse que le contexte allogénique pourrait participer au remodelage bronchique par l'induction de la TEM des CEB.

Nous nous sommes donc intéressés à l'influence du contexte allogénique dans l'induction de la TEM au cours de la transplantation pulmonaire. Nous avons évalué l'expression des protéines épithéliales (E-cadhérine, Zonula-Occludens 1) et mésenchymateuses (Fibronectine et MMP-9) au cours de cette co-culture en présence ou en absence de TGF- β 1. La production de cytokines (IL-1 β , IL-13, IL-4, TNF α , IFN γ , IL-17A et IL-6) et chemokines (MCP-1, CXCL-10, MIP-1 α and MIP-1 β) a été mesurée dans les surnageants de culture. L'influence du contexte pro-inflammatoire dans l'induction de marqueurs mésenchymateux a été testée, afin d'identifier le mécanisme d'action et de potentielles cibles thérapeutiques. Enfin, la sécrétion de MMP-9 a été étudiée dans les plasmas de patients porteurs de BO et de patients stables, dans le but d'identifier un marqueur prédictif de la BO.

III.2.2 Résumé

La principale complication à long terme de la transplantation pulmonaire est l'apparition d'un rejet chronique, appelé bronchiolite oblitérante (BO), caractérisée par la destruction de l'épithélium suivi d'un phénomène de fibrose, aboutissant à la perte du greffon. Certains facteurs de risques sont suspectés mais les mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de la BO sont encore mal connus. Plusieurs études démontrent l'implication des CEB dans la TEM au cours de la BO. Nous supposons que la réaction allogénique dans un contexte de transplantation participe à la TEM et contribue au remodelage bronchique.

Les CEB de donneurs sains sont cultivées avec les monocytes et/ou les LT activés en l'absence ou en présence de TGF- β 1. Les marqueurs mésenchymateux et épithéliaux sont évalués par qPCR et western blot. Les médiateurs des surnageants de culture sont dosés par Luminex[®]. Une étude longitudinale est réalisée afin d'évaluer la sécrétion de MMP-9 plasmatique de patients porteurs de BO comparée à des patients stables

Le contexte allogénique en synergie du TGF- β 1 accentue la production de fibronectine et de MMP9. Au contraire, l'expression des protéines épithéliales n'est pas modifiée. La sécrétion de chimiokines telles que CCL2 et CXCL-10 est augmentée dans les surnageants de culture. Nous avons démontré que CCL2 induisait la production de MMP-9 mais n'était pas responsable de l'augmentation de la fibronectine. Enfin, nous avons comparé la concentration de MMP-9 dans les plasmas de patients porteurs de BO à ceux de patients stables. Dans les plasmas de patients BO, nous observons une augmentation de sécrétion de MMP-9, 6 à 12 mois avant le développement de la BO.

Ce nouveau modèle *in vitro* démontre l'implication des cellules immunitaires dans le remodelage de l'épithélium respiratoire, ainsi qu'un lien direct entre CCL2 et la production de MMP-9. La concentration de MMP-9 dans le plasma semble être un marqueur prédictif de la BO et l'inhibition de CCR2 une cible thérapeutique. Ce modèle est un outil intéressant pour l'identification de biomarqueurs et la description des mécanismes impliqués dans le rejet de transplantation.

III.2.3 Abstract

Background: Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is the major limitation to long term survival after lung transplantation, expressed as a bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) or as a restrictive allograft syndrome (RAS). Cellular mechanisms leading to BOS remain poorly understood. Alloimmune-mediated reactions are seemingly involved and recent studies suggest the contribution of epithelial to mesenchymal transition (EMT). We hypothesized that immune reaction promotes EMT and contributes to the process of BOS.

Methods: Primary human airway epithelial cells (AEC) were cultured with allogeneic T cells and monocytes. Expression of epithelial and mesenchymal markers was assessed by quantitative PCR, immunoblotting and immunostaining. Secretion of inflammatory cytokines and metalloproteases (MMP) was measured in culture supernatants. Besides, we performed a longitudinal analysis of plasma samples from transplanted patients either stable or displaying BOS or RAS.

Results: We observed an increased expression of fibronectin and MMP9 by AEC exposed to T cells and monocytes. By contrast, E-cadherin and ZO-1 expression were slightly downregulated. CCL2 and CXCL-10 secretion was strongly increased in culture supernatants and we demonstrated that CCL2 controlled MMP9 secretion but had no effect on fibronectin expression. Then, we investigated plasma levels of MMP-9 and we showed an increase in MMP-9 concentration 6 to 12 months before the diagnosis of BOS. In RAS, MMP9 levels did not differ from controls.

Conclusions: Our *in vitro* model demonstrates the ability of immune cells to support the remodelling process in airway epithelium and shows a direct link between CCL2 and MMP-9 production through CCR2. Plasma MMP-9 appears as a predictive biomarker of BOS.

III.2.4 Introduction

Lung transplantation is the only therapeutic option for patients with terminal respiratory failure. Despite the improvement of immunosuppressive treatments and surgical techniques, the apparition of chronic lung allograft dysfunction (CLAD), with a prevalence of 50% at 5 years is a critical limitation for long term survival after lung transplantation (Christie et al., 2010b). Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is the most common phenotype of CLAD and is defined as a progressive and irreversible airway obstruction. BOS is histologically characterized by an early bronchiolar wall infiltration with lymphocytes, monocytes and histiocytes, followed by a fibrosis process leading to small airways obliteration. The cellular processes involved in BOS remain unclear. It is hypothesized that repeated epithelial injuries from both alloimmune and non-alloimmune mechanisms, followed by a failure to repair an epithelium ad integrum, contribute to fibrotic repair and airway obstruction (Boehler and Estenne, 2003; Estenne and Hertz, 2002; Yousem, 1996). Another rare phenotype of CLAD, named restrictive allograft syndrome (RAS) (Sato et al., 2011) has been described recently but its mechanisms remain largely unexplored.

The pathological lesions of BOS are characterized by tissue remodelling and extracellular matrix (ECM) deposition as a result of an excessive fibroblastic response. The origin of the fibroblasts responsible for the deposition of ECM remains unclear: they can derive from in situ fibroblasts or from the recruitment of circulating precursors into the site of inflammation. Recently, the contribution of bronchial epithelial cells in the fibrotic process has also been suggested and could play a central role in the development of BOS (Fernández et al., 2004; Jaramillo et al., 2003; Mauck and Hosenpud, 1996) through epithelial to mesenchymal transition (EMT) (Borthwick et al., 2009, 2010; Hodge et al., 2009; Ward et al., 2005). EMT is a process in which a polarized epithelium with cell-cell contacts and attachment to the basal membrane differentiates into fibroblast-type mesenchymal cells (Hay, 2005). EMT involves the down regulation of epithelial markers including cytokeratin and E-cadherin and the up regulation of mesenchymal markers such as vimentin. Additionally, cells committed to an mesenchymal differentiation gain migratory potential, produce matrix metalloproteinase (MMPs) and deposit ECM proteins including type I collagen and fibronectin in the interstitium (Borthwick et al., 2009; Hodge et al., 2009).

Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) is the foremost inducer of EMT. Previous studies have shown that an increase in TGF- β 1 expression in BOS patients (Elssner et al., 2000b; Magnan et al., 1996). Moreover, in a rat model of airway obliteration, interrupting TGF- β 1 binding to its receptor reduced intraluminal airway matrix deposition (Liu et al., 2002). Others growth factors such as PDGF have been described (Hertz et al., 1992). Moreover, cytokines like TNF α or IL-1 β may promote TGF-

β 1-induced EMT (Borthwick et al., 2009). The ability of TGF- β 1 to drive EMT is therefore largely dependent on the inflammatory microenvironment.

Allogeneic/immune response probably has a great impact of BOS. Acute rejection (AR) is the main risk factor for BOS (Estenne and Hertz, 2002; Heng et al., 1998b; Sharples et al., 2002). Perivascular infiltration and recruitment of lymphocytes and macrophages into the subepithelial layer of the airway appears to be harbinger of BOS (Kelly and Hertz, 1997; Yousem, 1996). Furthermore, animal models demonstrated the implication of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the development of BOS (DeBruyne et al., 1996; Higuchi et al., 2002). In the context of allogeneic stem cells transplantation, BO is closely related of graft versus host disease (Clark et al., 1987; Crawford and Clark, 1993), suggesting that allogeneic context could play a role in the development of BO. Studies have shown AEC as the major target of the immune response (Fernández et al., 2004; Jaramillo et al., 2003; Mauck and Hosenpud, 1996). Yet, although alloimmune reaction plays a major role in airway epithelial damage (Smith et al., 2000b), the mechanisms by which alloimmunity promotes the development of BOS remain unclear.

We hypothesized that alloimmune reaction may promote bronchial epithelial cells to undergo EMT in response to TGF- β 1. We established an in vitro model of allogeneic coculture between primary AEC cells and immune cells. We demonstrated the ability of immune cells to sustain EMT progression and in particular the production of MMP-9 through a CCL2/CCR2 pathway. We showed an increase of plasma MMP-9 in BOS patients 6 to 12 months before diagnosis of rejection. Thus, we suggest MMP-9 as an early biomarker of BOS and CCL2/CCR2 as a therapeutic target.

III.2.5 Methods

The study protocol was approved by the Comité de Protection des Personnes Ouest 1-Tours (reference number: 2009-A00036-51).

Airway Epithelial cell isolation and culture:

Human surface AEC were dissociated from trachea or/and bronchi from transplant donors. Surgical pieces were rinsed with HEPES-buffered (RPMI)-1640 culture medium (Gibco BRL) supplemented with penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (100 ng/mL). Airway tissues were incubated at 4°C overnight with 1mg/mL type XIV collagenase (Pronase E, Sigma-Aldrich) in RPMI 1640-HEPES. AECs were then dissociated by agitation washed and cultured in cnT17 (Cell n'Tec) containing 100U/mL penicillin and 100ug/mL streptomycin (Gibco) on human Collagen IV (Sigma) coated 24-well tissue culture plates.

In some experiments, AEC were cultured at the air-liquid interface (ALI). After isolation, cells were grown at confluence on 0,4 μ m human Collagen IV (Sigma) coated transwell (Costar corning). A

1:1 mix of Dublecco's modified Eagle medium (Gibco) and BEBM supplemented with bullet kit containing hydrocortisone, insulin, transferrin, epinephrine, triiodothyronine epidermal growth factor (Lonza), retinoic acid (0.1 ng/mL) bovine serum albumin (1,5µg/mL) with 100U/mL penicillin and 100ug/mL streptomycin (Gibco) was added to the basal compartment.

Co-culture experiments:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were elutriated (Plateforme DTC). T cells and monocytes were subsequently separated by magnetic beads (Milteny Biotec) following manufacturer's instructions. T cells were stimulated with plastic coated anti-CD3 (Affymetrix ebioscience) during 4 days in complete medium containing RPMI-1640 (Gibco) with 5% SVF (Eurobio), 1% pyruvate (Gibco), 100U/mL penicillin and 100ug/mL streptomycin (Gibco) and 100U/mL IL-2 (Immunotools). T cells and monocytes were cultured with confluent AEC for 5 days. All experiments were performed with or without TGF-β (10ng/mL). At the end of the co-culture, supernatants were collected centrifuged at 13.000 g for 5 minutes to remove cell debris and frozen for subsequent analysis. AECs were rinsed twice with Phosphate buffer saline (PBS), for removing immune cells and debris, before extraction.

In some conditions, AECs were cultured in media alone or media supplemented with recombinant CXCL-10 (20 ng/mL, R&D system), CCL2 (20ng/mL, Immunotools), CCL3 (20ng/mL, Immunotools) or CCL4 (20ng/mL, Immunotools) supplemented with TGF-β1 (10ng/mL). Treatments were performed at J0 and J3. Primary AECs were co-cultured with activated T cells and monocyte supplemented and/or TGF-β1 (10ng/mL) for 5 days. RS504393, an antagonist of CCR2 (ABCAM) was added at J0 and J3 in some co-culture experiments.

QPCR experiment:

Total RNA and proteins were extracted using the RNA nucleospin kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. For reverse transcription, 500ng of RNA used for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications were performed using the Mesa Blue SYBR green fluorescein kit (Eurogentec) and run on CFX 96 real time system (Biorad). Relative quantification of gene expression was determined by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. β-actin was used as endogenous control. The ratios were compared to control experimental conditions.

Immunoblotting

Protein concentrations were determined using the protein quantification kit (Macherey-Nagel). Proteins were separated on 8% bis acrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membrane

(Biorad). Membranes were blocked 1h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS) (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) with 5% non-fat dry milk. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: Fibronectin (Santa cruz), Zonula-occludens-1 (Life technology) and E cadherin (Life technology), β actin. Detection was done with horseradish peroxidase-labelled immunoglobulin G conjugates (Rockland) Antibody complexes and clarity chemiluminescence kit (Biorad). Chemidoc MP imaging (Biorad) was used for analysis. Results were normalized to β actin expression.

Detection of cytokine and MMP9 concentration:

Cytokine and MMP9 concentration in cell supernatants and plasmas were measured by flowcytomix technology (Affymetrix eBioscience) following the manufacturer's instructions. The following proteins were measured: CCL2, CCL3, CCL4, CXCL-10 and MMP-9. Bead fluorescence readings were done by flow cytometry (BD LSR II, Cytocell) and analysis was performed with Flowcytomix software (Affymetrix eBioscience).

Gelatin zymography:

Plasmas were mixed with a non-reducing sample buffer (Tris 200mM pH6,8, 10% glycérol, 4% SDS, 1% blue) and electrophoresed on 10% SDS-Page containing gelatin (Biorad,). Following electrophoresis, gels were washed in 2.5% Triton X-100 for removing SDS and then incubated for 48h at 37°C in developing buffer (Biorad). After incubation, gels were stained in comassie brilliant blue (Biorad,) at room temperature followed by destaining.

Characterisation of patient study group

We performed plasma analyse on patients include in the COLT cohort (reference number: 2009-A00036-51). Pulmonary investigations and plasma samples were obtained from each patient of each group every 6 months until 48 months. Diagnosis of BOS was based on a decline of 20% of force expiratory volume in 1 second (FEV1) according to the ISHLT classification (Estenne and Hertz, 2002) The stable group was defined by stable allograft function between 6 and 48 months post-transplant with a FEV1 higher than 90% of the baseline value. Patient characteristics are summarized in table 4.

Statistical analysis:

Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Mann and Withney test using graph pad Prism 6.0 (GraphPad, software Inc). Differences with a p value of <0.05 were considered statistically significant.

III.2.6 Results

Activated T cells promote EMT in ex vivo AEC cultures

Primary AEC were cultured with allogeneic activated T cells or allogeneic activated T cells plus monocytes in the presence or not of TGF- β 1. After 5 day, AEC were washed to remove immune cells and were investigated for epithelial and mesenchymal gene expression. TGF- β 1 downregulated E-cadherin and ZO-1 expression. The expression of these epithelial markers was further reduced by the presence of T lymphocytes (Figure 27A), but results did not reach statistical significance. TGF- β 1 upregulated expression of fibronectin and MMP-9 (Figure 27A). Interestingly, expression of these two proteins was significantly increased by activated T cells as shown by QPCR (Figure 27A), western blotting (Figure 27B) or culture supernatant assays (Figure 27C). By contrast, the presence of monocytes in the coculture slightly affected fibronectin or MMP-9 expression.

Similar experiments were performed on a differentiated epithelium in ALI conditions. Again we noticed an increase in MMP-9 expression when AEC were cultured with T lymphocytes (Figures 28A and 28B). Fibronectin expression, however, was not altered by the presence of T lymphocytes and expression of epithelial markers remained unchanged whatever the condition (Figures 28A).

Pro-inflammatory environment during primary co-culture of AECs with activated T cells

As inflammatory context play an important role in the regulation of ECM, we assessed the inflammatory environment in culture supernatants. Concentrations of 20 inflammatory molecules were determined using the 20plex flowcytomix inflammation kit. Secretion of TNF α was very low and remained unchanged whatever the culture condition (Figure 29). Also, we found no differences in IL-1 β and IL6 production. Secretion of IL-4, IFN γ or IL-17 was significantly increased in co-cultures with T cells or T cells plus monocytes and was slightly modified by TGF- β 1 (Figure 29). Moreover, the concentration of the chemokines CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL-10 was also increased in co-culture experiments (Figure 3C; p<0,005 n=8). Production of other cytokines such as IL12p70, LAP, IL-10 and IL-1 α was not detected in cell supernatant (Data not shown).

CCL2 secretion is responsible for MMP-9 upregulation in co-cultures with activated T cells.

We made the assumption that chemokines in cell environment may favour TGF- β 1-induced EMT. We focused on CCL2, 3, 4 and CXCL10 because they were specifically produced in coculture with T lymphocytes and were secreted in relatively large quantities. To test this hypothesis, we first performed induction experiments with recombinant chemokines. AEC cultured with recombinant CCL2, 3, 4 or CXCL10 and with or without TGF- β 1 were investigated for fibronectin and MMP9 expression. Recombinant cytokines alone had no effect on neither MMP9 nor fibronectin expression (not shown). TGF- β 1-induced MMP9 expression was significantly increased by CCL2 only (Figure 30A). By contrast, fibronectin expression was not affected by chemokines (Figure 30A). To further confirm the role of CCL2 in MMP9 production, we performed coculture experiments with RS504393, a pharmacologic inhibitor of CCR2. The increase of MMP-9 expression was dramatically reversed in allogenic co-culture by antagonising CCR2 (Figure 30B and 30C).

Plasma MMP9 as a predictor of BOS

Since MMP9 was produced in coculture between AEC and T lymphocytes, this protein could be a hallmark of immune reaction against the graft epithelium. Thus, we sought to determine MMP9 production in transplanted patients. We performed a longitudinal analysis of plasma MMP9 concentration in 13 stable and 13 BOS patients. Patients characteristic are presented in Table 4. Stable and BOS phenotypes were determined upon pulmonary function test, computed tomography and after elimination of confounding factors according to the ISHLT/ERS/AES recommendations (Meyer K et al., 2014). In addition, an adjudication committee composed by surgeons, pulmonologists and researchers validated the diagnosis blindly. Plasma samples obtained every 6 months during 48 months were assessed for MMP9 concentration. We found a higher concentration of plasma MMP9 in BOS patients compared to stable ones all along the period analysed (Figure 31C and 31D). MMP9 concentration then slightly decreased as BOS developed. Interestingly, levels of plasma MMP9 allowed discriminating stable and BOS patients up to 1 year before the diagnosis of the disease (Figure 31C). By contrast, we found no significant differences between stable and RAS patients for plasma MMP-9 (Figure 31E).

Then, we sought to define the specificity and sensitivity of MMP-9 as a predictive biomarker for BOS. We determined the visit when the diagnosis was made, and we defined this visit as VBOS. We then assigned VBOS as the reference of the longitudinal follow up and we investigated MMP-9 level 6 and 12 months before and after BOS onset (Figure 32A). Using a ROC curve we showed that a cut-off value of 312 pg/mL of MMP-9 allowed the prediction of BOS at one year with 80% sensitivity and 76% specificity (Figure 32B).

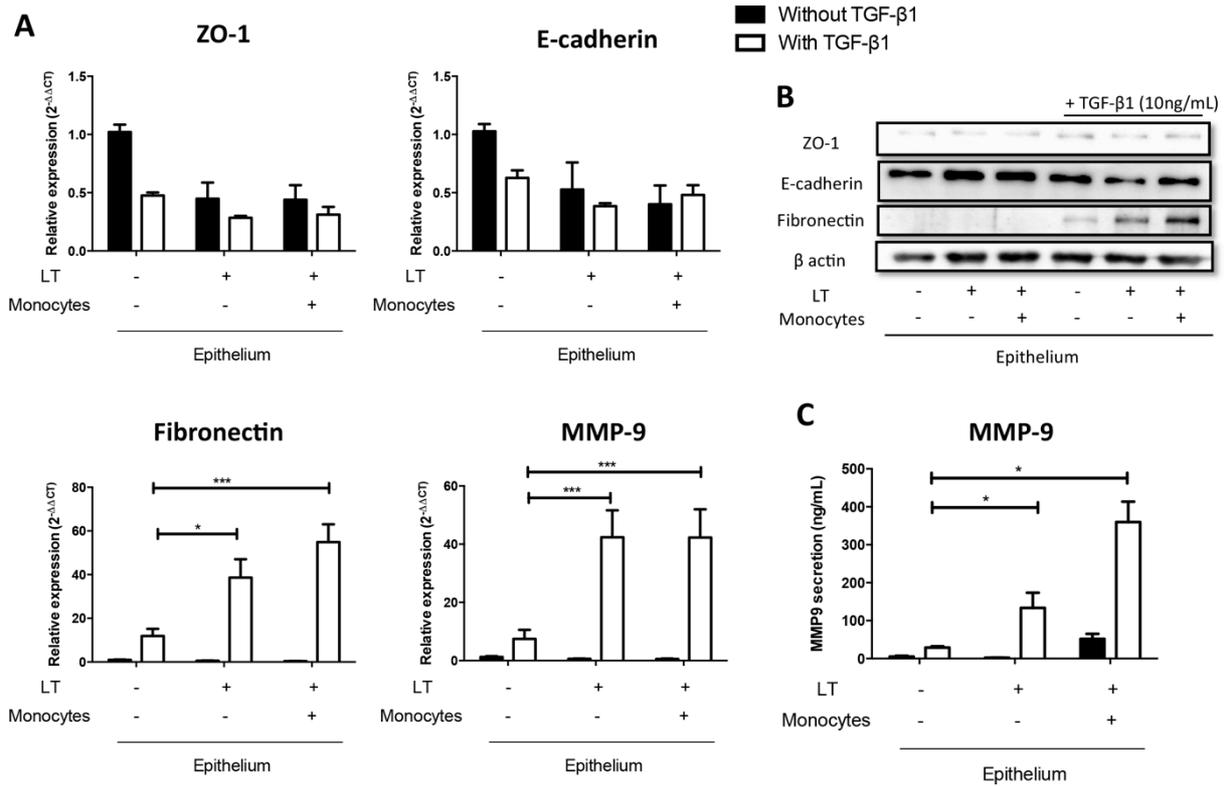


Figure 27 : Activated T cells induce fibronectin and MMP-9 production in synergy with TGF-β1 in primary human airway epithelial cells (AEC).

(A) Human AECs treated with TGF-β1 (10ng/mL) only, or with activated T cells and monocytes for 5 days. Using quantitative polymerase chain reaction arrays expression of epithelial, mesenchymal and ECM markers were evaluated. Values given are the mean +/- SEM of pooled samples. All values were normalized to β-actin. *p<0,05 compared with TGF-β1 treated control. (B) Representative immunoblot demonstrate increased fibronectin expression, and (C) MMP-9 secretion in supernatants confirmed overexpression in co-culture activated T cells, in synergy with TGF-β1, without epithelial markers changes.

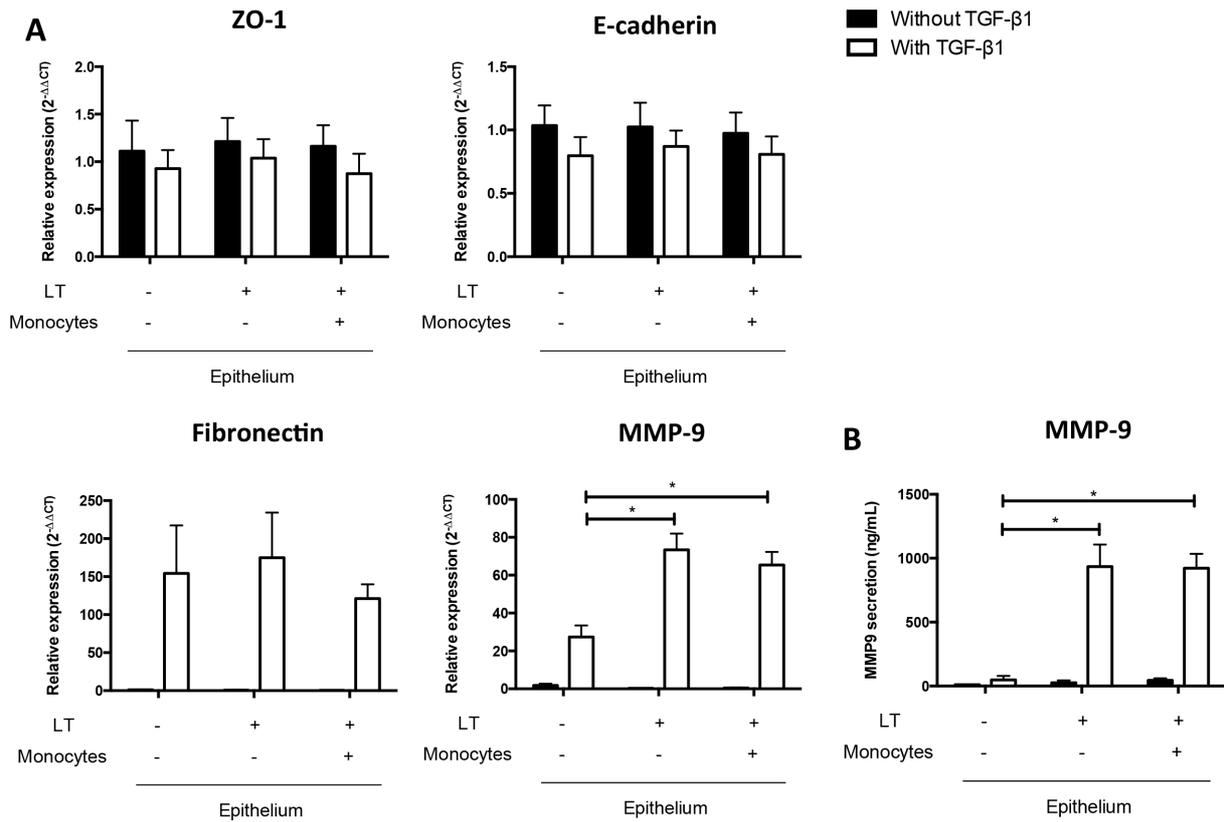


Figure 28 : Activated T cells induce MMP-9 production in synergy with TGF-β1 in air-liquid interface (ALI) model of primary human airway epithelial cells (AECs).

(A) Human AECs treated with TGF-β1 (10ng/mL) only, or with activated T cells and monocytes for 5 days. Using quantitative polymerase chain reaction arrays expression of epithelial, mesechymal and ECM markers were evaluated. Values given are the mean +/- SEM of pooled samples. All values were normalized to β-actin. *p<0,05 compared with TGF-β1 treated control. (B) MMP-9 secretion in supernatants confirmed overexpression in co-culture activated T cells, in synergy with TGF-β1, without epithelial markers changes.

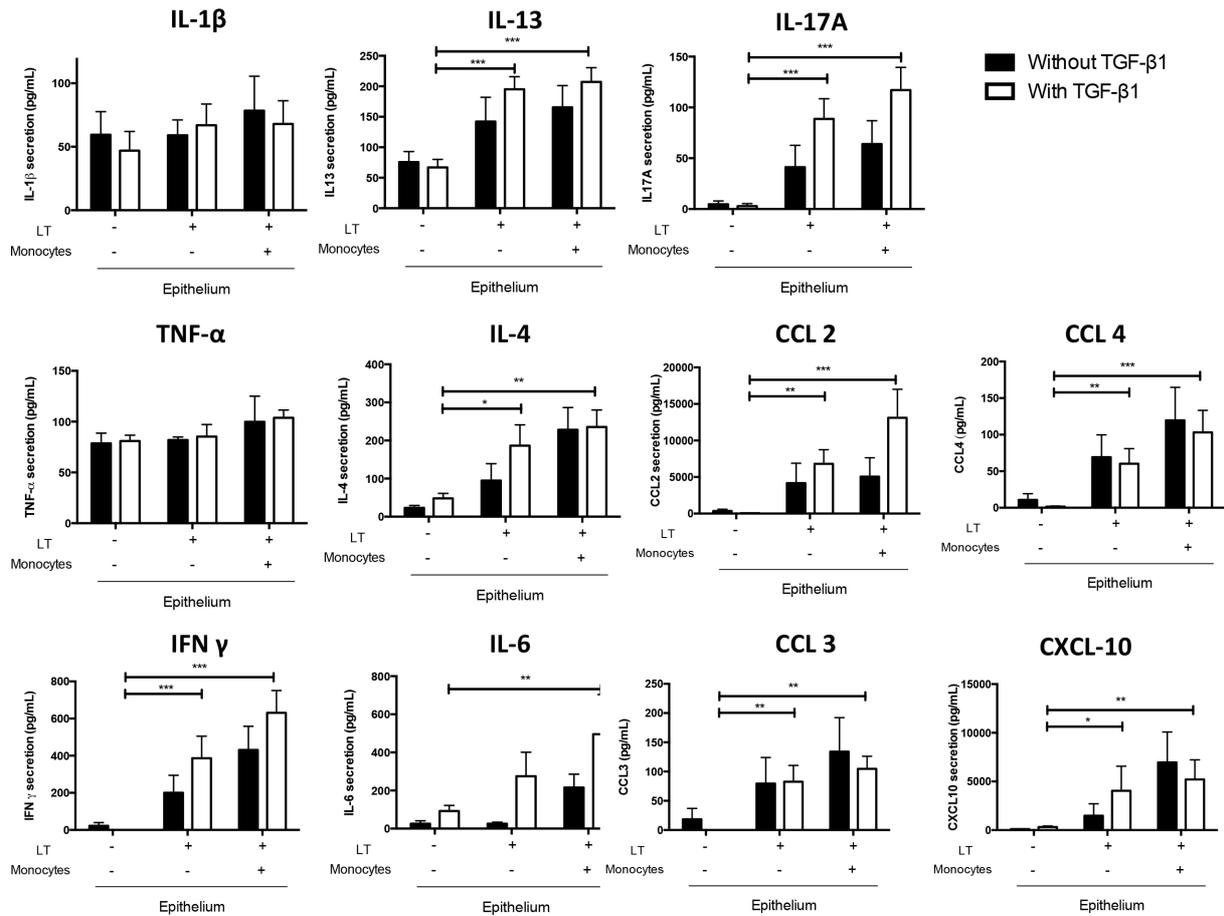


Figure 29 : Pro-inflammatory cytokines are secreted during co-culture primary AECs with activated T cells in synergy with TGF-β1.

Dosage in supernants of each experimental conditions show an increased of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β, IL-13, IL-4, TNFα, IFNγ, IL-17A and IL-6 in co-culture with activated T cells and in synergy with TGF-β1 (10ng/mL). Values given arte the mean +/- SEM. n=8; *p<0,05 compared with TGF-β1 treated control.

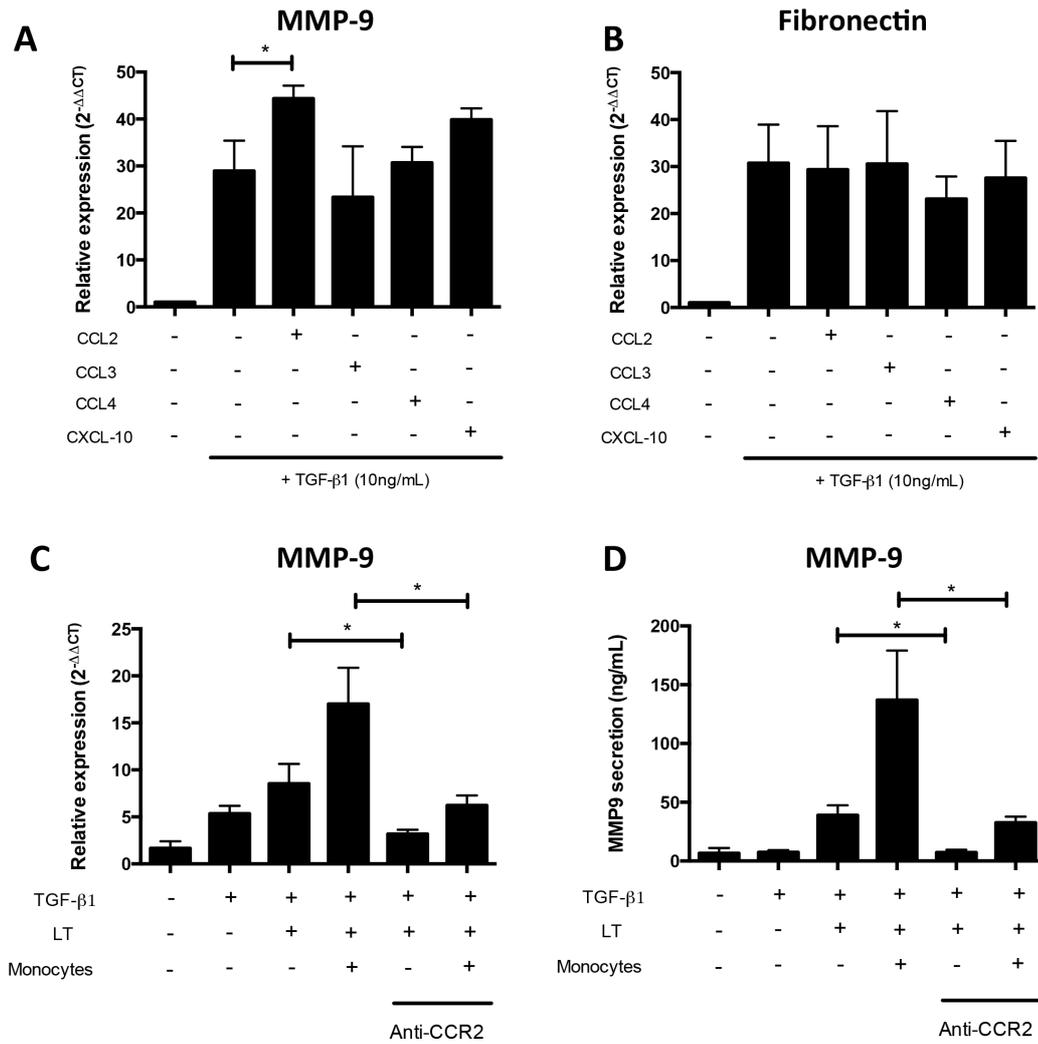


Figure 30 : Pro-inflammatory CCL2 secretion increased MMP-9 expression in synergy with TGF-β1 in primary human airway epithelial cells (AEC).

(A) Human airway epithelial cells are treated with CCL2 (20ng/mL), CXCL-10 (20 ng/mL), CCL3 (20ng/m), CCL4 (20ng/mL) alone or with TGF-β1 (10ng/mL). Quantitative polymerase chain reaction arrays demonstrated increased MMP-9 expression in co-culture with MCP-1 and TGF-β1 (n=5 p<0,05). (B) These treatment had no effect on fibronectin expression (n=5). (C) Human AECs are co-culture with activated T cells and monocytes in presence of CCR2 antagonist (receptor of MCP-1) for 5 days. Quantitative polymerase chain reaction arrays demonstrated decreased MMP-9 expression in co-culture with CCR2 antagonist (n=4 p<0,05). (B) MMP-9 expression and (C) secretion is decreased in co-culture with CCR2 antagonist (n=4 p<0,05). Values given arte the mean +/- SEM. *p<0,05 compared with TGF-β1 treated control.

		Stable	BOS	RAS
	number	13	13	4
	age range	39,2+/- 4,7 years	38,6+/- 4 years	38,6+/- 4 years
	sex distribution	9F/4M	5F/12M	3F/1M
pathologie	Cystic fibrosis	8	6	2
	Pulmonary hypertension	1	2	-
	Other disease	2	2	1
	Emphysema	2	2	-
	BPCO	-	-	1
transplantation	Heart-lung	1	1	-
	Double lung	11	9	3
	Single lung	1	3	1

Table 4 : Patient characteristics.

Plasma samples were collected longitudinally from lung transplant recipients (n = 13) who developed BOS and a control group of lung transplant recipients (n = 13) who did not develop BOS.

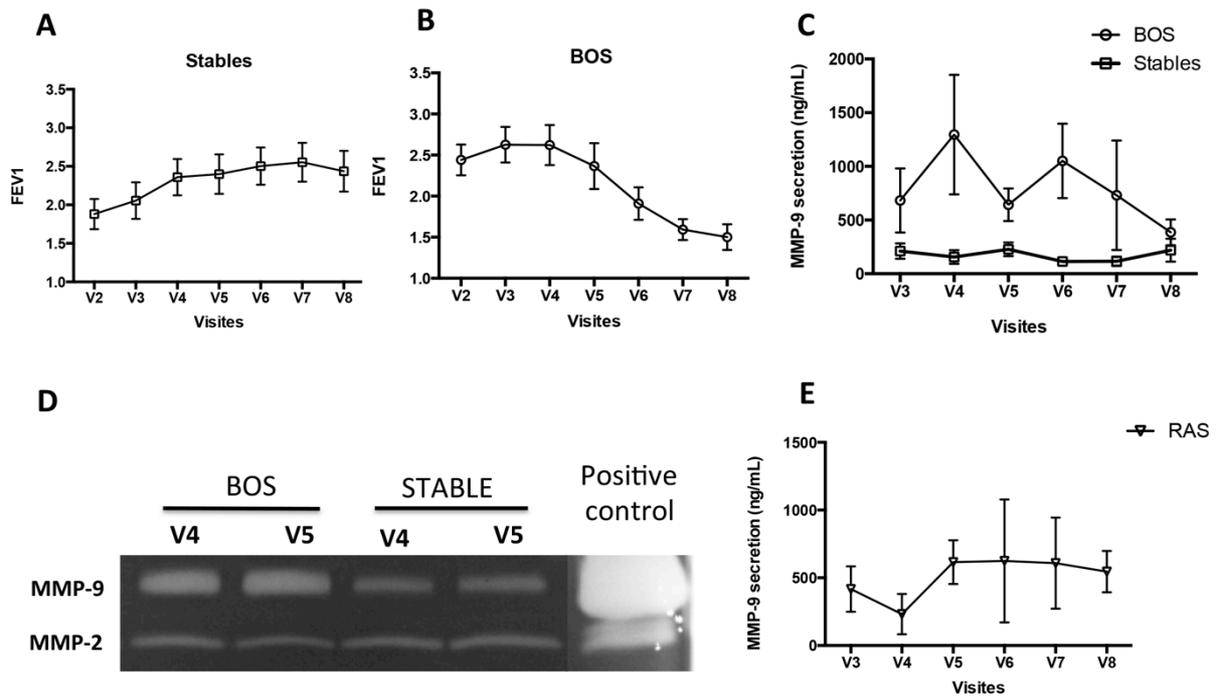


Figure 31 : FEV1 and MMP-9 secretion in lung transplant.

(A) Evolution of Volume exhaled during the first second of a forced expiratory maneuver (FEV1) of stable patients (n=13) and (B) BOS patients (n=13). (C) MMP-9 secretion in plasma of these two groups of patients. (D) Zymogram of MMP-9 and MMP-2 in plasma of BOS and stable patients and in (E) MMP-9 secretion in plasma of RAS patients (n=4).

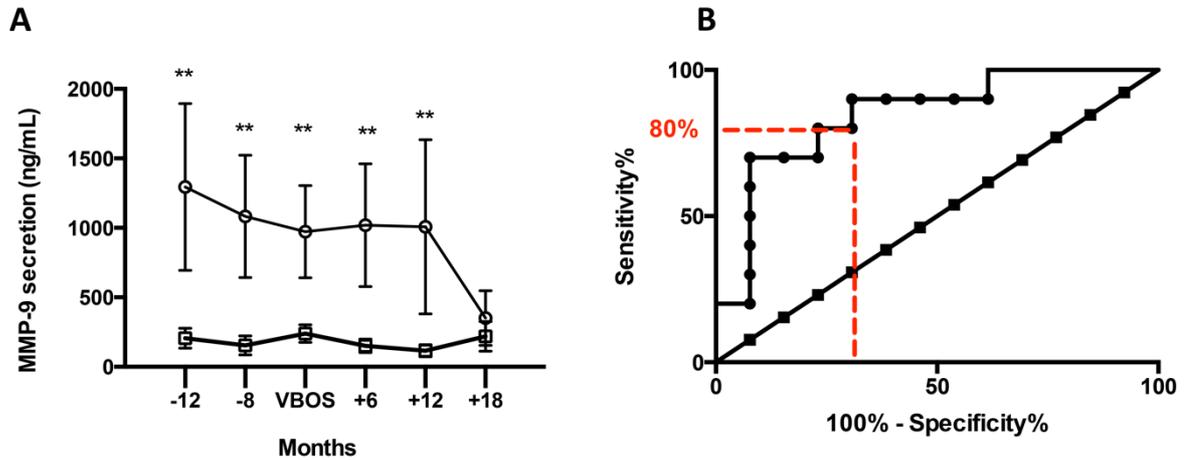


Figure 32 : MMP-9 secretion in lung transplant : a new biomarker for CLAD.

(A) Evolution of MMP-9 secretion in plasma of stable and BOS patients with an homogenisation at VBO. (B) ROC curve at 12 years before CLAD, area 0,8462 ; p value 0,005278 n=13 stable and n=10 BOS.

III.2.7 Discussion

BOS is the main long term complication of lung transplantation (Christie et al., 2010b). It results from a chronic immunologic/inflammatory insult, which contributes to a persistent leukocyte infiltration, followed by aberrant repair and fibro-obliteration within the small airways. In this study, we develop a new ex vivo model for investigating the impact of immune reaction on AEC. We provide the first evidence that immune cells promote remodeling in synergy with TGF- β 1, assessed by the increase of ECM markers such as fibronectin and MMP-9.

Bronchial remodeling is characterized by accumulation of myofibroblasts and fibroblasts, which leads to uncontrolled production and accumulation of ECM (Thannickal and Horowitz, 2006). However, the origin of these cells remains unknown, although the recruitment of bone marrow-derived fibrocytes and/or the expansion of resident fibroblasts likely play an important role. More recently, epithelial cells undergoing mesenchymal differentiation through EMT, have been shown to play a prominent role in bronchial remodeling (Borthwick et al., 2009; Hackett et al., 2009; Ward et

al., 2005). Here, we demonstrate that immune cells strengthen remodelling through the production of fibronectin and MMP-9. These mesenchymal markers were showed to be upregulated during EMT in bronchial remodeling (Borthwick et al., 2009; Hackett et al., 2009; Ward et al., 2005). MMP-9 is a gelatinase involved in the turnover of extracellular matrix (ECM) and in the migration of inflammatory cells through the ECM, basement membrane and endothelial layer in several lung diseases (Boulay et al., 2004; Cataldo et al., 2003; Delacourt et al., 1995; Hartog et al., 2003; Suga et al., 2000; Torii et al., 1997). Yet the EMT process was not fully observed, since we did not observed decrease of epithelial junction proteins, and the increase of fibronectin production was not found in the ALI conditions of culture. These results could be explained by the duration of 5 days of of co-culture. Which can miss a transitory early reduction of epithelial protein expression, according with previous studies (Hackett et al., 2009).

Several chemokines involved in the recruitment of immune cells were increased in supernatants. These chemokines can also be found in BAL from patients with bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia (Capelli et al., 1999) which shares characteristics of BOS. CXCL-10 for example which was largely produced in our experiment can cause bronchiolitis-like inflammation in a long-term expression model in mice (Jiang et al., 2012a). Moreover CXCR3, the receptor of CXCL-10, has been suggested as playing a critical role in the pathogenesis of BO (Agostini et al., 2001; Belperio et al., 2002b, 2003b; Medoff et al., 2006). However, in our model, CXCL-10 blockade didn't change MMP-9 production. Yet, we showed by that CCL2, a potent mononuclear phagocyte chemoattractant regulated MMP-9 expression. In agreement with these observations, Belperio et al, have suggested a critical role for CCL2 and its receptor CCR2 in a mouse model of BO (Belperio et al., 2001). This study demonstrated that CCL2, through its interaction with CCR2, played a pivotal role in mediating the persistent peribronchiolar mononuclear cell infiltration leading to fibro-obliteration. The association between CCL2 and a mononuclear phagocyte-predominant leukocyte infiltration is supported by other studies of solid organ chronic allograft rejection (Boehler et al., 1999; Russell et al., 1995). CCL2 was also described as increased in acute and chronic allograft rejection in animal models of both heart and kidney transplantation (Nadeau et al., 1995; Russell et al., 1995). In addition CCL2 has been found to be secreted in BAL from patients with BO (Belperio et al., 2001; Capelli et al., 1999). The link between CCL2 and MMP-9 was also made in atherosclerosis (Ma et al., 2014a; Tan et al., 2014). Tan and al. determined that plasma CCL2 levels were significantly associated with intima-media thickness, suggesting that this chemokine had other roles than regulation of macrophage recruitment (Tan et al., 2014). In addition to MMP-9, CCL2 is also a biomarker for acute myocardial infarction due to its critical role in monocyte recruitment (Gonzalez-Quesada and Frangogiannis, 2009; Kervinen et al., 2004; de Lemos et al., 2003). Blocking CCR2, the receptor of CCL2 inhibited the production of MMP-9, suggesting CCR2 as a potential therapeutic target. Okuma et al, demonstrated in a murine model of pulmonary fibrosis that CCR2 deficiency decreased

macrophage infiltration and MMP-2 and MMP-9 production (Okuma et al., 2004), thus improving the outcome of this disease.

The importance of the CCL2– CCR2 – MMP9 axis prompted us to assay MMP9 in plasma from BO patients and found this protein elevated compared to stable lung transplant recipients. The origin of MMP-9 is controversial (Atkinson and Senior, 2003). This chemokine can be produced by a range of cells in the respiratory tract, where they mediate wound healing, airway remodeling, and cell trafficking (Chakrabarti and Patel, 2005). As such, MMPs play an important role in immunity, and their proteolytic activity can also directly dampen the inflammatory potential by downregulating cytokine and chemokine functions (Perrone et al., 2008). Hübner et al. revealed PMN as the main source of MMP-9 in patients after lung transplantation (Hübner et al., 2005). We showed by QPCR that MMP9 expression was upregulated by epithelial cells under immune cells stimulation. However we cannot exclude the production of MMP9 by another cell type of the coculture. Nevertheless, in the ALI-model, which makes a physical separation between AEC and immune cells we could demonstrate that MMP-9 comes from epithelial cells.

Previous studies in human lung transplantation with BOS and animal models with obliterative airway disease have shown an increase in MMP levels prior to development of chronic rejection (Campbell et al., 2005; Smith et al., 2007a), and MMP9-deficient animals do not develop OAD (Fernández et al., 2005). Level of plasmatic of MMP-9 was studied in atherosclerosis (Ma et al., 2014a; Tan et al., 2014), and proposed as a useful biomarker to distinguish stable and unstable plaques and predict future cardiovascular events. Moreover MMP9 has been suggested as a biomarker of BO. Hübner demonstrated an impaired balance between MMP-9 and TIMP-1 in BAL associated with the development of BO (Hübner et al., 2005). In an another study Beeh et al, found similar results in induced sputum (Beeh et al., 2001) and correlated the secretion of MMP-9 with the severity of obstruction (Beeh et al., 2001). Yet, these results were obtained at the time of BOS diagnosis and had no predictive values. Moreover BAL samples are difficult to obtain and are not suitable for routine analysis. Here we propose plasma MMP-9 as an early biomarker of BO. Indeed we found an increase of MMP9 concentration in plasma from BOs patients up to one year before diagnosis of BOS. ROC analysis showed that plasma MMP9 level allowed detecting patients at risk of developing BOS with 76% specificity and 80% sensitivity one year before the diagnosis of the disease.

In summary co-culture of AEC with alloreactive immune cells allowed reproducing molecular events relying to CLAD pathophysiology such as EMT. Notbly we demonstrated that T cells and monocytes can contribute to remodeling in synergy with TGF- β 1 by inducing an increase of MMP-9 expression. We identified MMP-9 as an early biomarker of BOS. Plasma levels of MMP-9 can identify patients at risk of developing BOS up to one year before diagnosis. Prediction of BOS will allow a personalised care of lung transplant recipients and anticipating and impeding lung function degradation.

III.2.7 Cohorte COLT et sélection des patients

De nombreux acteurs cellulaires et facteurs semblent impliqués dans le mécanisme physiopathologique du développement du CLAD. Cependant, ces derniers n'ont jamais été étudiés de façon longitudinale et prospective. L'objectif de la cohorte COLT (COhort in Lung Transplantation) est la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques et prédictifs du développement de BO. Cette cohorte rassemble les patients nouvellement transplantés provenant des **11 centres français de transplantation pulmonaire et le centre de Bruxelles**. Les patients inclus avant la transplantation pulmonaire, sont suivis pendant 5 ans avec réalisation de prélèvements sanguins et des prélèvements *in situ* (Figure 33). La bio-collection est composée d'échantillons d'ARN, d'ADN, de sérums, de plasmas, de cellules, de biopsies, de LBA et d'expectorations induites. Une base de données clinico-biologique est associée à cette bio-collection et au suivi des patients de chaque centre.

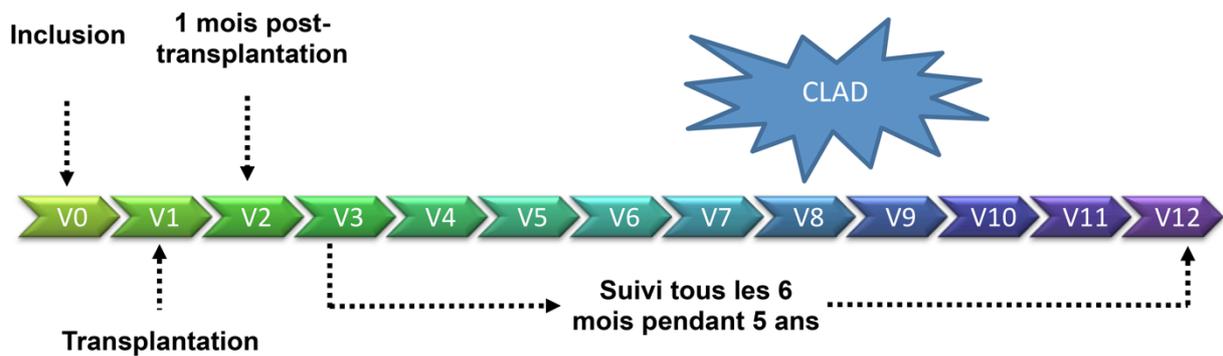


Figure 33 : Déroulement du protocole COLT.

Les patients sont inclus avant la transplantation pulmonaire. Ils sont suivis à 1 mois après transplantation puis tous les 6 mois avec des prélèvements biologiques (biocollection) et des données cliniques répertoriés dans une base de données.

Le projet COLT permettra l'identification de marqueurs prédictifs du développement précoce du CLAD et des patients à risque de développer cette pathologie. Enfin, COLT permettra l'identification de cibles potentielles pour de futurs traitements du CLAD.

Le protocole COLT a débuté le 01/09/2009 et compte au 17/01/2014, 1256 patients inclus. Parmi eux 893 patients ont bénéficié d'une transplantation et pour 209 patients nous avons un suivi de plus de 3 ans (Figure 34).

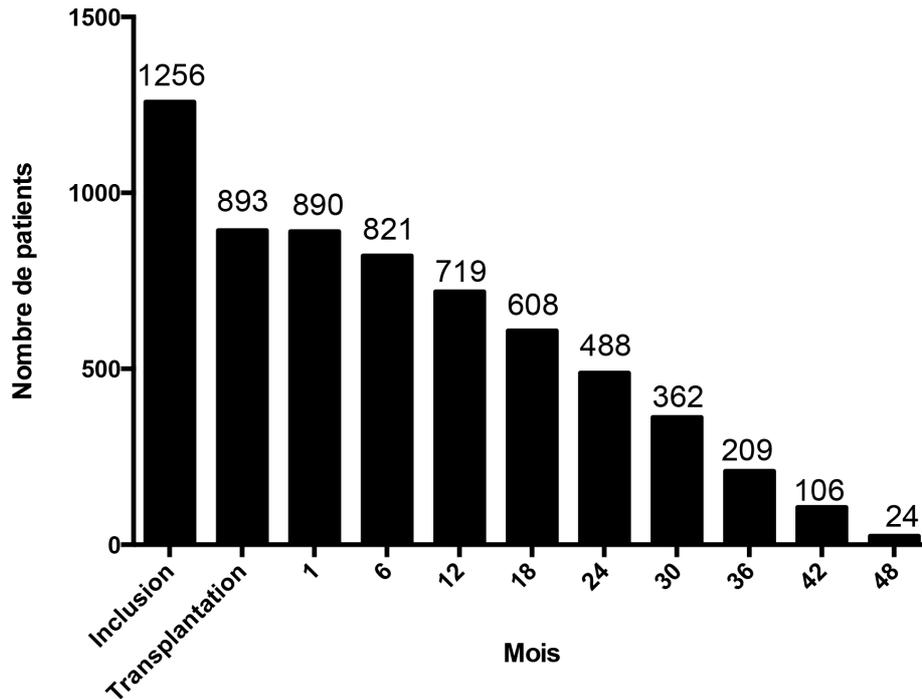


Figure 34 : Inclusions et suivi des patients de la cohorte COLT.

Nombre de patients inclus et suivis dans le cadre du protocole COLT

Un comité d’adjudication, composé de cliniciens et chirurgiens externes, d’investigateurs membres de COLT, et de chercheurs a permis de déterminer le phénotype des patients. Cette classification est effectuée selon les critères de l’ISHLT/ATS/ERS (Meyer K et al., 2014), et est réalisée après analyses des fonctions respiratoires ainsi qu’à l’étude des scanners (Figure 35). Les fonctions respiratoires permettent de distinguer les patients stables, qui présentent une fonction pulmonaire stable des patients ayant un CLAD caractérisé par une diminution de 20% du VEMS. L’analyse des valeurs de spirométrie et des scanners thoraciques permet de distinguer les deux phénotypes du CLAD. Comparés aux patients porteurs de BO, les patients atteints de RAS présentent des lésions parenchymateuses (Figure 35B). Ce phénotypage exclu les patients ayant des facteurs confondants tels que la présence de cancers ou d’infections sans lien avec la transplantation pulmonaire.

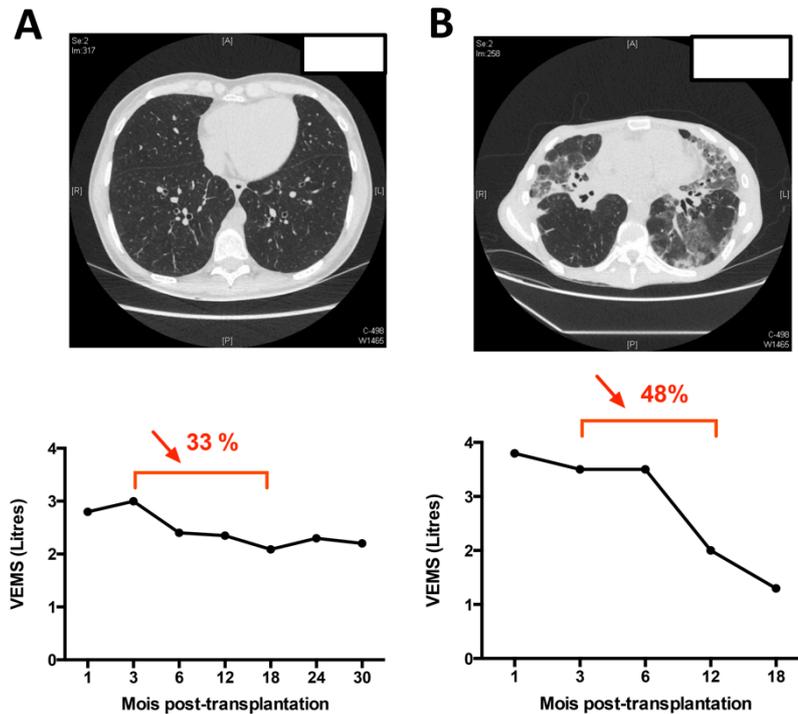


Figure 35 : Exemple de phénotypage des patients transplantés pulmonaires issus de la cohorte COLT.

(A) : Scanner et mesures du VEMS de patients porteurs de BO. Le patient atteint de BO présente une diminution de 33% du VEMS, 18 mois après la transplantation. (B) : Scanner et mesures du VEMS de patients porteurs de RAS. Le patient atteint de RAS présente une diminution de 48% du VEMS, 12 mois après transplantation. L'analyse du scanner permet d'identifier des lésions parenchymateuses.

Issu de cette classification, nous avons retenu les patients vivants qui ont développé un CLAD durant les 3 ans suivant la transplantation (Figure 36). Parmi 166 patients, 29 patients ont développé une BO, 10 patients ont développé un RAS et 49 patients sont définis comme stables. Au moment de ce comité, 78 patients ne présentent pas de phénotype clair.

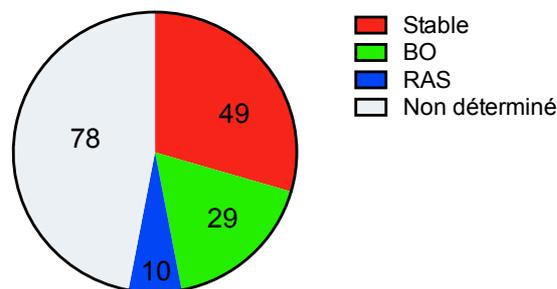


Figure 36 : Classification des patients après 3 ans de suivis.

Le comité d'adjudication a permis la classification de patients porteurs de BO (n=29), de RAS (n=10) ou considérés comme stables (n=49).

À l'aide de cette classification et de la biocollection, nous avons pu réaliser des dosages dans les plasmas de patients transplantés pulmonaires atteints de BO et de patients stables. Sur les 29 patients définis BO, nous avons pu réaliser ce dosage sur 13 patients. Nous avons exclu 4 patients pour qui le diagnostic de la BO est établi à la V3 (soit 6 mois après la transplantation). En effet, il n'aurait pas été possible d'avoir des dosages 6 mois ou 12 mois avant le diagnostic de la BO. De la même façon, nous avons exclu les patients pour lesquels le diagnostic de la BO était tardif (V7 ou V8) et pour lesquels, il n'y avait pas de prélèvement disponible à $V_{CLAD} + 6$ mois ($n=7$). Enfin, 5 patients présentaient un défaut de prélèvement. Les stables ont été choisis en fonction de leur pathologie initiale (Figure 37). Les patients RAS n'ont pas été étudiés car seulement 4 patients présentaient un suivi longitudinal avec des prélèvements disponibles.

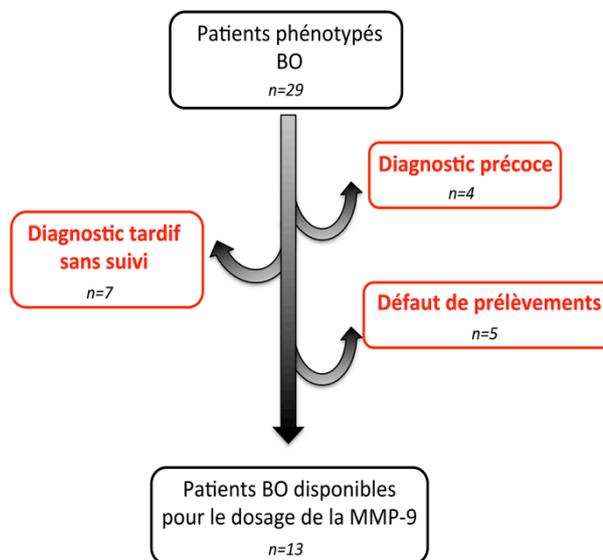


Figure 37 : Stratégie de sélection des patients BO pour le dosage plasmatique de MMP-9.

IV Conclusion et discussion

Les mécanismes impliqués dans le développement du CLAD sont encore mal déterminés. Certains facteurs de risques sont identifiés tandis que d'autres sont encore suspectés. La physiopathologie du CLAD est multifactorielle. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai mis en place un nouveau modèle de co-culture *in vitro* qui permet d'identifier l'influence de l'un de ces facteurs, la réaction immune, sur le profil des CEB.

Le développement de différents modèles animaux a pu parfois contribuer à une meilleure compréhension de la pathologie. Cependant, la manifestation du CLAD dans ces modèles est éloignée par rapport à celle retrouvée chez l'homme. Egalement, ils requièrent des compétences techniques chirurgicales de précision et se confrontent actuellement à une législation de plus en plus contraignante concernant l'expérimentation animale. L'utilisation d'un modèle *in vitro* de cultures épithéliales bronchiques constitue donc une alternative intéressante. Plusieurs lignées bronchiques (cancéreuses ou transformées) permettent ainsi l'étude des mécanismes impliqués dans diverses pathologies pulmonaires. L'utilisation de ces cellules permet d'obtenir un nombre important de cellules à moindre coût. Cependant le choix de la lignée cellulaire bronchique doit être en accord avec la pathologie bronchique étudiée et les investigations envisagées. En effet, si l'on souhaite étudier des cancers primitifs, on utilisera plutôt la lignée A549 (Lieber et al., 1976; Smith, 1977), alors que pour étudier l'asthme, on choisira plutôt des lignées bronchiques telles que les B-2b et les 16HBE14O- (Hackett et al., 2013). Comme discuté précédemment, il faut prendre en compte le niveau basal d'expression protéique des jonctions cellulaires et les méthodes de culture qui peuvent varier d'une lignée à une autre. Cependant, l'utilisation de ces lignées se confronte à certaines limites. En effet, même si ces cellules sont issues de tissus pulmonaires humains, elles ont subi une transformation pour permettre leur culture, modifiant leurs propriétés cellulaires et les éloignant du profil cellulaire retrouvé dans un contexte physiologique.

Pour s'affranchir de ces obstacles, il est possible d'utiliser des CEB primaires, qui ont pour principal avantage de ne pas être transformées ni cancéreuses, et de conserver les caractéristiques cellulaires au plus proche de celles retrouvées dans un contexte physiologique. Selon le site de prélèvement, la composition cellulaire varie. En effet, l'épithélium trachéo-bronchique est composé de cellules ciliées, de cellules caliciformes, de cellules intermédiaires et basales. Sa composition cellulaire est proche de celle des petites voies aériennes atteintes dans le CLAD. Toutefois, ces cellules primaires ne peuvent se cultiver indéfiniment sans modification de leurs caractéristiques telles que le niveau d'expression de certaines protéines, la forme cellulaire, leur faculté d'adhérence ou leur

capacité à d'établir un épithélium différencié et fonctionnel. Ces cellules primaires présentent l'avantage de pouvoir être cultivées en interface air-liquide, permettant d'être au plus proche du contexte retrouvé dans les voies respiratoires. Effectivement, ce modèle ALI fonctionnel permet d'obtenir une culture différenciée (cellules sécrétrices et ciliées) en fonction de la concentration de facteurs de croissance et d'acide rétinoïque présent dans le milieu de culture. Le développement d'un modèle de co-culture *in vitro* de CEB en interface ALI a contribué à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'exposition à des allergènes (Heijink et al., 2010). Les CEB de donneur sain lors de la transplantation pulmonaire sont des prélèvements rares et difficiles à obtenir. L'accès à ce type de prélèvement requiert une certaine logistique, pour le transport et la conservation de ces échantillons, ainsi que des autorisations sanitaires relatives aux échantillons d'origine humaine. De plus, ces prélèvements restent fragiles et sensibles aux infections. Ils nécessitent des précautions de manipulation pour éviter toutes sources de contamination. Afin de s'affranchir d'une partie de ces problèmes, il est maintenant possible d'acheter ces types de cellules. L'avantage est d'être certain du type cellulaire étudié et d'avoir des garanties sur leur qualité et sur les procédures d'utilisation. Cependant leur utilisation comporte certaines limites. En effet, il n'y a aucune donnée sur les caractéristiques du donneur (éventuelles pathologies, traitements). De plus, il serait impossible de réaliser une culture autologue, c'est à dire une interaction entre les CEB du donneur en présence de ses propres cellules immunitaires.

Au cours de ces travaux de thèse, j'ai réalisé une banque de CEB de donneur sain avec actuellement plus de 80 échantillons recueillis. Nous avons choisi de développer un nouveau modèle de co-culture *in vitro*, permettant de tester l'influence des cellules immunitaires sur les CEB. L'avantage de ce modèle de co-culture est d'être au plus proche du contexte retrouvé chez le patient transplanté pulmonaire.

Pour la réalisation de ce modèle, nous avons utilisés des LT activés et des monocytes car ces cellules sont présentes dans les infiltrats bronchiques et les LBA de patients porteurs de BO (Greenland et al., 2014). Ces cellules sont présentes en grand nombre et leur isolation à partir de prélèvements sanguins est une technique simple et effectuée quotidiennement pour les prélèvements de la cohorte COLT. De plus, les monocytes sont capables de se différencier en macrophages et en DC, impliqués dans le développement de la BO (Borthwick et al., 2013; Magnan et al., 1996). Le nombre de LT CD25+ est également augmenté dans les LBA de patients porteurs de BO (Slebos et al., 2004). Leur nombre reste inchangé entre des patients transplantés pulmonaires stables et des patients sains (Snell et al., 1997). L'implication des LT dans le développement de la TEM a déjà été mise en évidence dans d'autres modèles. Rygiel et al. ont démontré le potentiel inducteur des LT sur la TEM dans un modèle de co-culture avec une lignée de cellules épithéliales biliaires. Ce potentiel est lié à leur activation et leur capacité d'induction de la voie du TGF- β 1. Il a été mis en évidence dans le cancer du sein (Santisteban et al., 2009) et le rejet chronique rénal (Robertson, 2004). Cependant ces

modèles de co-culture ne prennent pas en compte le rôle d'autres CPA comme les DC, qui jouent pourtant un rôle central dans le développement des rejets aigus et chroniques (Joffre et al., 2008). Les monocytes sont également impliqués dans l'induction de la TEM sur des cellules rénales (Li et al., 2011)(Zhang et al., 2005). Li et al ont démontré que cette induction s'effectuait par un contact direct entre ces cellules (Li et al., 2011).

Ce modèle a permis de démontrer que les LT activés et/ou monocytes n'ont pas d'influence sur les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux en l'absence de TGF- β 1, et ce malgré l'induction d'un environnement inflammatoire avec la sécrétion de cytokines (IFN γ , IL-13, IL-4 et IL-17) et de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10). Ceci démontre que le contexte inflammatoire seul n'est pas suffisant pour induire la production de marqueurs mésenchymateux. Certaines études démontrent que le TNF- α , ou encore l'IL-1 β (Borthwick et al., 2010) seuls ne sont pas capables d'induire la TEM. Récemment, il a été démontré que la sécrétion d'IL-4 (Ji et al., 2013), d'IL-6 (Rokavec et al., 2014) et d'IL-17 (Ji et al., 2013; Vittal et al., 2013) sans TGF- β 1 n'était pas suffisante pour induire la TEM.

Au cours de ces travaux, nous avons remarqué que l'induction de la TEM par le TGF- β 1 seul diffère selon le modèle d'étude. En effet, la diminution d'expression de protéines de jonctions cellulaires est retrouvée uniquement dans le modèle en phase liquide. L'absence de cette diminution dans le modèle ALI peut s'expliquer par la différence d'action du TGF- β 1 sur des CEB à différents stades de différenciation. De plus, la TEM est un phénomène réversible, ainsi un temps de traitement long au TGF- β 1 ne permet pas d'identifier la cinétique d'induction par le TGF- β 1 (précoce, complète ou en cours de réversion). Pour une même concentration de TGF- β 1, Hackett et al, a observé la diminution d'E-cadhérine sur des CEB primaires en ALI (Hackett et al., 2009). Cette induction était réalisée sur des CEB pendant 48 heures et 72 heures. Actuellement il n'existe aucune étude ayant testé une induction au TGF- β 1 supérieure à 72 heures sur des CEB différenciées.

Au cours de nos travaux, nous avons démontré que les cellules immunitaires accentuent la production de marqueurs mésenchymateux en synergie avec le TGF- β 1 sans pour autant accentuer la diminution de l'expression des protéines de jonction. Cette observation suggère que l'activation de la voie du TGF- β est responsable de la diminution de l'expression des protéines épithéliales. Toutefois, l'induction de fibronectine et de la MMP-9 implique d'autres voies de signalisation. Nos travaux se sont par ailleurs intéressés à l'étude de protéines impliquées dans le remodelage bronchiques, telles que la fibronectine et la MMP-9. Pour rappel, la fibronectine est une glycoprotéine présente dans la MEC, qui joue un rôle dans son organisation ainsi que dans l'adhérence cellulaire. La MMP-9 est une endonucléase de la sous famille des gélatinases, capable de cliver les composants de MEC tels que les collagènes natifs de type IV, V, VII et X ainsi que la fibronectine, l'élastine insoluble et les protéoglycanes. Son activité est contrôlée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques des MMP, appelés TIMP (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) qui se fixent sur le site actif de l'enzyme.

L'équilibre entre MMP et TIMP est essentiel à une régulation physiologique de la composition de la MEC. Nous avons démontré que la production de fibronectine était accentuée en présence de TGF- β 1 de LT et/ou monocytes. Ce résultat n'est pas confirmé dans le modèle ALI. Ce modèle établit une séparation physique par le transwell, entre les CEB et les cellules immunitaires et nos résultats suggèrent donc que l'induction de la fibronectine serait due à un contact direct entre les différentes cellules. Au contraire, la production de MMP-9 est retrouvée dans les deux modèles. Ceci démontre que le mécanisme d'induction de la MMP-9 proviendrait d'une action indirecte par l'intermédiaire de facteurs solubles. L'expression de la MMP-9 et de la fibronectine sont modifiées lors de l'induction de la TEM au cours du remodelage bronchique par le TGF- β 1 (Borthwick et al., 2009; Hackett et al., 2009). D'autres marqueurs de la TEM, comme la vimentine et l' α -SMA spécifiques des fibroblastes ont été étudiés dans ce modèle. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'expression entre les différentes conditions de culture en présence de TGF- β 1. L'absence de modification de l'expression de la vimentine montre que la structure du cytosquelette des CEB est conservée. De la même manière, l' α -SMA n'est pas modifiée au cours de ces co-cultures, probablement en raison de l'apparition tardive de ce marqueur de différenciation des myofibroblastes.

Nous n'avons pas observé de différence sur l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux entre les co-cultures de CEB avec des LT et celles en présence de LT et monocytes. Cette observation suggère que le rôle des monocytes dans cette co-culture est négligeable.

Nous avons mis en évidence dans nos surnageants de culture la présence de cytokines (telles que l'IL-4, IL-6 et l'IL-17) qui potentialisent l'effet du TGF- β 1. Le rôle du TGF- β 1 a déjà été largement étudié dans la TEM, et reste une molécule clé dans l'induction de ce processus au cours du remodelage bronchique (Borthwick et al., 2009; Hackett et al., 2009; Ward et al., 2005). De plus, le TGF- β 1 possède un rôle central dans le CLAD. Ce facteur pro-fibrotique est retrouvé augmenté chez les patients porteurs de BO (El-Gamel et al., 1999; Elssner et al., 2000a; Magnan et al., 1996). Il serait impliqué dans l'activation des fibroblastes et la différenciation des myofibroblastes (Jonosono et al., 1999; Tomasek et al., 2002), qui sont retrouvés dans les lésions de BO. L'analyse des surnageants de culture nous a permis de démontrer l'induction d'un contexte inflammatoire avec une augmentation de la sécrétion d'IFN γ (molécule pro-Th1), d'IL-6 et d'IL-13 (molécules pro-Th2) et d'IL-17 (molécule pro-Th17). Ce contexte inflammatoire est peu modifié en présence de TGF- β 1. Ces cytokines sont produites par différentes populations lymphocytaires impliquées dans la BO (Bharat and Mohanakumar, 2007; Boehler et al., 1999; Burlingham et al., 2007; Neuringer et al., 2000; Shirwan, 1999; Vittal et al., 2013). En effet, l'activation des LT Th1 et Th2 est augmentée chez les patients porteurs de BO (Mamessier et al., 2006). La population LT Th-17 a récemment été impliquée dans le développement du CLAD (Vittal et al., 2013). La neutralisation de cette cytokine a été proposée comme potentielle piste thérapeutique (Fan et al., 2011). La sécrétion de TNF α et d'IL-1 β est inchangée dans nos différentes conditions de culture. D'autres cytokines potentiellement impliquées

dans le CLAD, telles que l'IL-10 et l'IL-12 ne sont pas détectables dans nos surnageants de culture (Fan et al., 2011; Meloni et al., 2004). L'origine du TGF- β 1 sur le site de l'inflammation pourrait provenir de plusieurs sources : les CEB, les LT, les macrophages activés (Magnan et al., 1996). Dans notre modèle, le dosage de LAP, précurseur du TGF- β 1 n'est pas détectable indiquant que ni les CEB, ni les cellules immunitaires ne sécrètent de TGF- β 1.

Ce modèle *in vitro* a permis d'identifier une augmentation de sécrétion de chimiokines telles que CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10 impliquées dans le CLAD. CCL3 et CCL4 sont impliquées dans l'attraction des macrophages et leur sécrétion est augmentée dans les LBA de patients porteurs de BO (Capelli et al., 1999). La sécrétion de CCL2, impliquée dans l'attraction des monocytes, est également augmentée dans nos surnageants de co-culture. De la même façon, Reynaud-Gaubert et al. ont démontré que son taux était élevé dans les LBA avant le diagnostic de la BO (Reynaud-Gaubert et al., 2002b). CXCL10 joue un rôle dans la défense contre l'hôte et est sécrétée par les cellules inflammatoires infiltrant le greffon participant au recrutement des LT sur le site du rejet (Cliffe et al., 2005). Jiang et al. ont démontré dans un modèle murin, que l'exposition prolongée de CXCL10 dans les poumons provoquaient des lésions de BO (Jiang et al., 2012). Nous avons testé le potentiel d'induction de ces chimiokines sur la production de MMP-9. Nous avons démontré que sa production est induite par CCL2. Cette dernière est une chimiokine qui attire les cellules mononucléées, plus particulièrement les cellules à capacité de phagocytose, les LT CD45RO+ (mémoires), les LB et les cellules NK (Carr et al., 1994; Taub et al., 1995) sur le site de l'inflammation. CCL2 est produite par plusieurs types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes et les CEB (Cushing et al., 1990; Lundien et al., 2002; Standiford et al., 1991). Nos résultats démontrent que l'épithélium seul en présence ou non de TGF- β 1 n'induit pas la sécrétion de CCL2. Sa sécrétion est augmentée en co-culture avec des cellules immunitaires. Nos surnageants de co-culture contiennent certaines cytokines telles que l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-1 β , qui ont été impliquées dans l'induction de la sécrétion de CCL2 (Ip et al., 2006)(Lim et al., 2009). Lundien et al, ont démontré que les CEB produisaient CCL2 en réponse à l'IL-2 et au LPS (Lundien et al., 2002). Cette chimiokine est impliquée dans des pathologies avec une inflammation chronique et un processus de fibroprolifération telles que la polyarthrite rhumatoïde, les fibroses idiopathiques et les adhérences abdominales (Antoniades et al., 1992; Gong et al., 1997; Zeyneloglu et al., 1998). Dans plusieurs pathologies inflammatoires pulmonaires telles que la pneumonie, les fibroses pulmonaires et les infections virales, il a été démontré que l'interaction de CCL2 avec CCR2 contribue au développement de l'agression de l'épithélium (Hildebrandt et al., 2004; Lin et al., 2008; Okuma et al., 2004). Le lien entre CCL2 et MMP-9 a déjà été proposé dans le phénomène d'athérosclérose (Tan et al., 2014). D'autres études sur les patients porteurs de BO ainsi que sur des modèles animaux de transplantation ont démontré un lien entre l'augmentation de la MMP-9 et l'apparition du rejet (Fernández et al., 2005; Hübner et al., 2005; Riise et al., 1998; Smith et al., 2007b; Taghavi et al., 2005). Fernandez et al.

ont montré que la souris knock-down pour MMP-9 ne développait pas de lésions d'oblitération (Fernández et al., 2005). Dans cette étude, ils ont démontré que la MMP-2 n'était pas impliquée dans le processus d'oblitération et que la MMP-9 avait un rôle double. En effet, la MMP-9 affecte l'infiltration de cellules mononuclées mais aussi influence l'alloréactivité des LT (Fernández et al., 2005).

Les résultats obtenus avec notre modèle proposent CCR2 comme une éventuelle cible thérapeutique. En effet, le traitement de co-culture en présence d'un antagoniste de ce récepteur diminue la production et la sécrétion de MMP-9. Belperio a souligné l'importance de cet axe CCL2/CCR2 dans le phénomène de fibroprolifération. À partir d'un modèle murin de transplantation pulmonaire, il a démontré que la neutralisation de CCL2 réduisait le phénomène de fibroprolifération (Belperio et al., 2001). Une autre étude réalisée sur un modèle orthotopique murin a démontré que CCR2 était impliqué dans le recrutement des monocytes sur le site de l'inflammation et que son blocage atténuait la réponse alloimmune (Gelman et al., 2010). Ce récepteur est localisé à la surface de cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages, les DC immatures, les LT mémoires ainsi que les cellules épithéliales (Christensen et al., 2004). Des études cliniques sont actuellement en cours pour tester l'effet d'un antagoniste de CCR2 dans le diabète de type II (Clinical trial, 2014).

Enfin, ce modèle *in vitro* a contribué à l'identification de potentiels biomarqueurs et cibles thérapeutiques du CLAD. L'importance d'identifier un biomarqueur prédictif du CLAD est un challenge puisqu'actuellement le diagnostic de CLAD s'effectue tardivement sur la dégradation de la fonction respiratoire. L'obstruction est alors fixée et le phénomène est irréversible. De nombreuses études ont proposé de potentiels biomarqueurs à partir de méthodes invasives telles que l'examen de biopsies bronchiques ou trans-bronchiques et de lavages bronchoalvéolaires (Greenland et al., 2014; Hübner et al., 2005; Meloni et al., 2004; Neurohr et al., 2009; Reynaud-Gaubert et al., 2002b). L'identification d'un biomarqueur prédictif permettrait d'identifier les patients à risques de développer un CLAD et ainsi mettre en place une thérapeutique, soit par un changement de classe d'immunosuppresseur soit par le recours à de nouvelles thérapeutiques. Ce modèle a contribué à l'identification de la MMP-9 comme potentiel biomarqueur. A l'inverse un marqueur prédictif négatif aurait l'avantage de pouvoir rassurer et alléger la surveillance des patients qui l'exprimeraient.

La validation du caractère prédictif de la MMP-9 a été permise grâce à l'accès à des prélèvements humains issus de la cohorte de transplantations pulmonaires COLT. Cette étude se propose de suivre des patients transplantés pulmonaires de façon longitudinale pendant 5 ans avec des visites espacées de 6 mois. Les données biologiques et fonctionnelles (y compris fonction respiratoire, éventuels rejets et infections, traitements) et les prélèvements prévus au protocole (prélèvements sanguins, biopsies et LBA) sont collectés au cours de ces visites. Le but est d'identifier des biomarqueurs et de proposer de potentielles cibles thérapeutiques du CLAD. C'est grâce à cette

cohorte que nous avons eu accès à des CEB primaires, issues du donneur. La MMP-9 a déjà été proposée comme marqueur du CLAD (Banerjee et al., 2011; Hübner et al., 2005; Smith et al., 2007b; Taghavi et al., 2005). Dans une étude de 20 patients transplantés pulmonaires, Hübner a démontré que le développement de la BO est associé à un défaut de la balance MMP-9/TIMP-1 dans les LBA (Hübner et al., 2005). Auparavant, Trello et al ont démontré la présence de MMP9 et MMP-2 dans les LBA de patients transplantés pulmonaires. Cependant, les patients porteurs de BO étaient exclus de cette étude (Trello et al., 1997). Dans une étude sur les expectorations induites de 30 patients transplantés pulmonaires, Beeh et al a souligné le défaut de la balance MMP-9/TIMP-1 (Beeh et al., 2001). Ils observent une augmentation de la sécrétion de MMP-9 chez les patients porteurs de BO, fortement corrélée avec la sévérité de l'obstruction bronchique (Beeh et al., 2001).

Ces études ont été réalisées de façon rétrospective, ne prenant pas en compte l'évolution de ces marqueurs au cours du temps et à terme ne permettaient de considérer la MMP-9 comme marqueur prédictif de la pathologie. De plus, ces marqueurs ont été étudiés dans des LBA et des expectorations induites qui sont des techniques de prélèvement invasives lors du suivi de patients transplantés pulmonaires. Nous avons pu démontrer que la concentration de la MMP-9 était plus élevée dans les plasmas de patients porteurs de BO que chez les patients stables. Cette concentration diminue au cours du temps et se stabilise toujours avec un niveau de sécrétion élevée par rapport aux sujets stables. Cette évolution montre bien que le processus de remodelage s'initie bien avant le diagnostic du CLAD. Dans notre étude, le suivi longitudinal de chaque patient démontre que la sécrétion élevée de MMP-9 est prédictive du développement du CLAD. Les prélèvements plasmatiques sont les moins invasifs notamment comparés aux autres types de prélèvements couramment réalisés au cours de suivi de patients transplantés pulmonaires. De récentes études ont proposé la concentration plasmatique ou sérique de MMP-9 comme biomarqueur pour distinguer les patients stables et ceux à risques de rupture de plaques dans l'athérosclérose (Ma et al., 2014b; Tan et al., 2014). La MMP-9 a également été proposée comme biomarqueur de coronaropathie (Chiao et al., 2011).

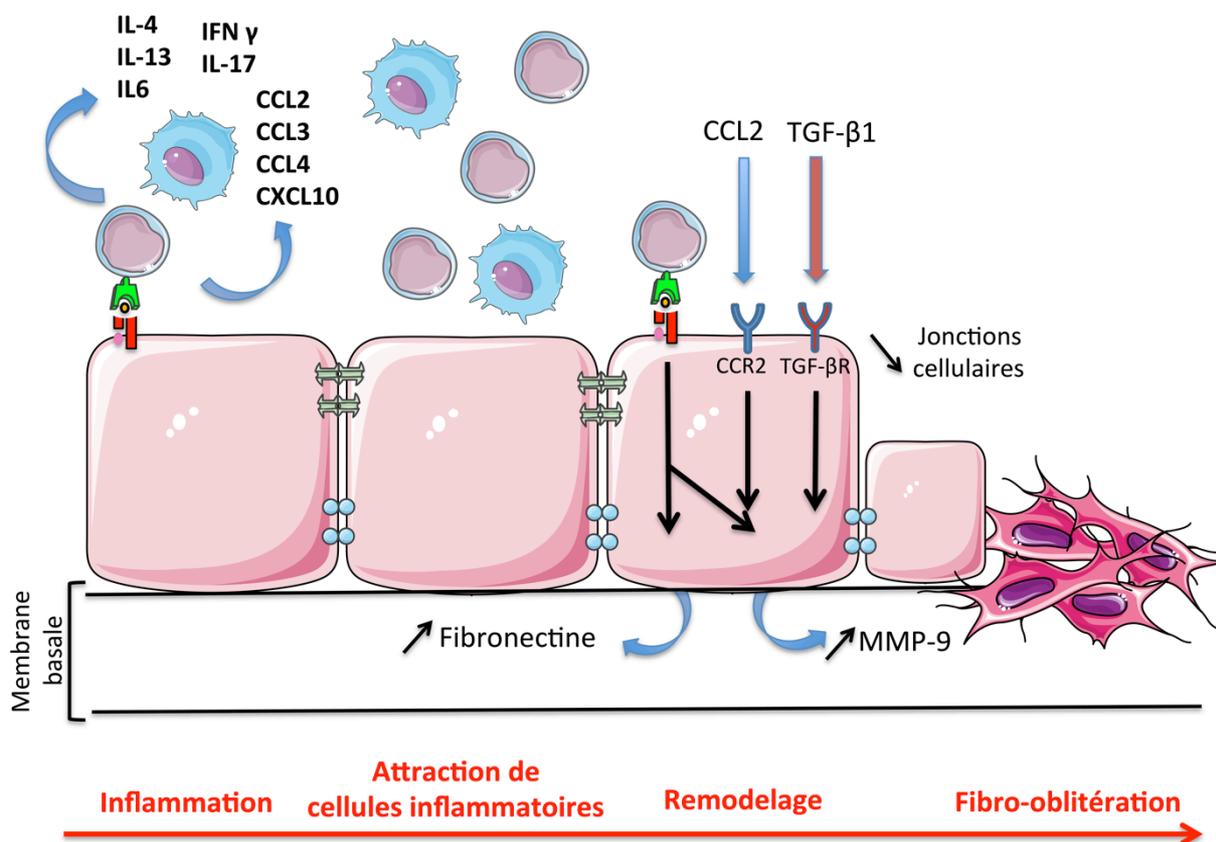


Figure 38 : Schéma bilan du mécanisme impliqué dans le remodelage bronchique au cours du CLAD.

En conclusion de cette étude fondamentale sur l'effet du contexte allogénique sur le profil des CEB, ce modèle a permis de démontrer que la présence de cellules immunitaires en synergie avec le TGF- β 1 induisait la sécrétion de cytokines et chimiokines impliquées dans le développement du CLAD. Nous avons également démontré que le contexte allogénique accentuait la production de molécules impliquées dans le remodelage bronchique. Cette étude a permis la mise en évidence et la validation de la MMP-9 comme marqueur prédictif du CLAD. Enfin, ce modèle *in vitro* propose CCR2 comme nouvelle cible thérapeutique (Figure 38).

Nous avons réalisé ce modèle de co-culture avec des LT et des monocytes. Cependant ces cellules ne sont pas les seules présentes sur le site de l'inflammation au cours du CLAD. Plusieurs travaux ont étudié l'interaction entre l'épithélium et les macrophages ou les DC (Rothen-Rutishauser et al., 2008, 2005). Il serait pertinent d'étudier l'influence des autres ces populations cellulaires. Ce type d'investigation serait d'autant plus intéressant qu'il permettrait d'étudier d'autres CPA, avec une affinité pour la présentation antigénique différente de celles des monocytes, et des sécrétions de chimiokines différentes. Il pourrait être envisagé d'étudier dans notre modèle le rôle spécifique de sous-populations T, comme les Th1, Th2 et Th17, dont les différentes cytokines sécrétées ont été

décrites dans le développement du CLAD (Bharat and Mohanakumar, 2007; Boehler et al., 1999; Burlingham et al., 2007; Neuringer et al., 2000; Shirwan, 1999; Vittal et al., 2013).

Ce modèle permettrait d'étudier l'influence des CEB sur le profil d'activation des LT. En effet, les cellules épithéliales sont capables d'interagir directement avec les cellules immunitaires, par l'expression de molécules du CMH (Iacono et al., 1997; Jaramillo et al., 2003; Rabinowich et al., 1990; Räisänen-Sokolowski et al., 1998) mais aussi par l'expression de molécules de co-stimulation de la famille B7 (Heinecke et al., 2008; Kim et al., 2005). Elles peuvent réguler la réponse immune et plus particulièrement l'activité des DC (Upham and Stick, 2006) et des LT. Egalement, elles agissent sur la différenciation des LT en Th2 (Huston and Liu, 2006). Ce modèle étudie l'influence du contexte allogénique sans traitement immunosuppresseur, pourtant retrouvés chez tous les patients transplantés pulmonaires. Cette observation implique d'étudier tout d'abord l'effet des immunosuppresseurs sur le profil des CEB. En effet, il a été démontré dans d'autres transplantations d'organes solides le potentiel inducteur de la TEM de ces traitements immunosuppresseurs. Par exemple, la ciclosporine A induit la TEM et contribue à la fibrose rénale lors de la transplantation rénale (Galichon et al., 2011; Hazzan et al., 2011; Slattery et al., 2005). Ce type d'investigation est d'autant plus pertinent puisque certains immunosuppresseurs tels que la ciclosporine et le tacrolimus ont été récemment développés en aérosol ou en nébulisation (Corcoran et al., 2013; Hayes et al., 2010), exposant les CEB directement aux immunosuppresseurs.

Ce modèle *in vitro* a permis d'étudier l'influence du contexte allogénique sur le profil des CEB. Pour de futures investigations ce modèle pourrait être utilisé pour étudier d'autres facteurs de risque du CLAD, comme les infections virales et/ou bactériennes (Gregson et al., 2013; Hayes et al., 2012; Magnusson et al., 2013; Weigt et al., 2013b). À la différence des autres transplantations d'organes solides, le poumon est exposé à l'air. De ce fait, il est également sensible aux polluants tels que les particules de diesel ou les molécules allergisantes. Dans ce sens, Verleden et al., ont démontré l'influence de la pollution atmosphérique sur l'apparition du rejet (Verleden et al., 2012). Plusieurs études soulignent l'influence de ces stimulations sur les CEB (Heijink et al., 2010; Runswick et al., 2007; Wan et al., 1999). L'étude des mécanismes impliqués par chaque facteur de risque contribuerait à l'identification de voies de signalisation ainsi qu'à la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. L'influence d'autres types d'agressions épithéliales comme les lésions liées à la chirurgie ou encore le RGO, retrouvées chez les patients transplantés pulmonaires, peut également être testée.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de CCL2 dans l'induction de la MMP-9. Il serait d'intéressant d'utiliser des modèles murins Knock-out inductibles pour la MMP-9 dans le but de mieux décrire son rôle dans le développement du CLAD. Egalement, d'autres voies thérapeutiques pourraient être testées comme la neutralisation de CCL2. De la même façon, nous avons démontré que

l'inhibition du récepteur CCR2 serait une cible thérapeutique intéressante. Dans un premier temps, nous pourrions tester des antagonistes. De futures investigations sont nécessaires pour étudier les voies de signalisation lors de l'interaction de CCL2/CCR2 en présence et en absence de TGF- β 1, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Les résultats de ces perspectives pourront être validés dans les échantillons de patients issus de la cohorte. L'inhibiteur naturel de MMP-9, TIMP-1 pourrait être également dosé dans les plasmas de patients transplantés pulmonaires afin de mieux comprendre le rôle de MMP-9 et de déterminer si un défaut de la balance MMP-9/TIMP-1 pourrait être prédictive du CLAD de façon plus pertinente encore que le dosage de MMP9 seul (Hübner et al., 2005).

Ces différentes études contribueraient à identifier de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce modèle *in vitro* constitue un nouvel outil pour étudier les mécanismes cellulaires mis en jeu lors du remodelage bronchique et pourrait être transposé pour l'étude d'autres pathologie bronchiques telles l'asthme ou encore la BPCO.

Publications et communications

Publications originales dans des revues à comité de lecture

Immune cells in synergy with TGF- β 1 increase airway remodeling through MCP-1/MMP-9 axis

M. Pain, P.J. Royer, J. Ioy, M. Fieux, A. Girardeau, P. Lacoste, K. Botturi, A. Magnan
(AJRCCM 2014, en cours de soumission)

Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype.

Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, Brouard S, Eickelberg O, Magnan A.
Eur Respir Rev. 2014 Mar 1;23(131):118-30.

Preventing asthma exacerbations: what are the targets?

Botturi K, Langelot M, Lair D, Pipet A, **Pain M**, Chesne J, Hassoun D, Lacoeyille Y, Cavailles A, Magnan A.
Pharmacol Ther. 2011 Jul;131(1):114-29.

Communications orales dans le cadre de congrès

Retraite scientifique CPC/INSERM, Tours, Septembre 2013

“Allogeneic context on bronchial epithelium remodeling”

Lungstorming, Paris, Juin 2012

“Modèle de triple co-culture: Cellules épithéliales - lymphocytes T - monocytes afin d'étudier le rejet chronique en transplantation pulmonaire”

Retraite scientifique CPC/INSERM, Munich, Février 2012

“Using an *in vitro* model of bronchial epithelium model to investigate the impact of allogeneic context”

Rencontre des Jeunes Chercheurs Vaincre la mucoviscidose, Paris, Février 2011

« Evolution du profil d'activation des lymphocytes T, des cellules dendritiques et de l'influence des cellules épithéliales bronchiques chez des patients transplantés pulmonaires »

Congrès « Lung transplantation », Paris, Septembre 2010

« The COLT Study : French COhort in Lung Transplantation »

Communications affichées dans le cadre de congrès

Journée de Recherche respiratoire, Montpellier, 2013

Influence des lymphocytes T activés sur le profil des cellules épithéliales bronchiques dans un modèle *in vitro* de rejet de transplantation pulmonaire.

Pain M., Royer P., Fieux M. , Girardeau A., Botturi K., Magnan A.

Journée de Recherche respiratoire, Toulouse, 2011

Mise en place d'un modèle de triple co-culture *in vitro*: Cellules épithéliales bronchiques et cellules immunitaires afin d'étudier le rejet chronique pulmonaire

Pain M., Aubert P., Reboulleau D, Botturi K., Magnan A.

Rencontre des Jeunes Chercheurs Vaincre la mucoviscidose, Paris, 2012

Mise en place d'un modèle de triple co-culture *in vitro* : cellules épithéliales bronchiques-cellules immunitaires afin d'étudier le rejet chronique pulmonaire.

Pain M, Aubert P, Reboulleau D, Botturi K, Magnan A.

Journée de Recherche respiratoire, Nantes, 2010

Evolution du profil d'activation des lymphocytes T et des cellules dendritiques chez les patients transplantés pulmonaires.

Pain M., Lacoeuille Y., Parès S., Botturi K., Magnan A.

Projet en collaboration

SENSIBILITÉ DU MÉSOTHÉLIOME PLEURAL MALIN (MPM) À LA VIROTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE BASÉE SUR LE VIRUS ATTÉNUÉ DE LA ROUGEOLE (MV)

Carole Achard, doctorante 2^{ème} année – INSERM UMR892/CNRS UMR6299/Université de Nantes
Sous la direction de Jean-François Fonteneau, travail effectué au sein de l'équipe 4 dirigée par Marc Grégoire

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer agressif de la plèvre survenant principalement suite à une exposition à l'amiante. Le diagnostic est souvent très tardif et la médiane de survie est comprise entre 6 et 12 mois seulement. Ce cancer reste réfractaire aux différents traitements existant actuellement, d'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Depuis quelques années, des recherches se sont développées sur la virothérapie anti-tumorale. Cette approche consiste à utiliser des virus répliquatifs en tant qu'agents thérapeutiques anti-tumoraux, exploitant des aberrations cellulaires apparaissant lors du processus de tumorigénèse. Parmi ces virus, le virus atténué de la rougeole (MV) est un bon candidat, des résultats prometteurs ayant été observés dans deux essais cliniques de phase I visant différents cancers. Ce virus infecte préférentiellement les cellules tumorales surexprimant son récepteur d'entrée et induit leur mort par apoptose.

Nous souhaitons développer la virothérapie anti-tumorale basée sur le MV pour le traitement du MPM. Dans ce but, nous avons réalisé une étude pré-clinique *in vitro* sur 22 lignées de MPM afin de montrer la faisabilité de cette approche. Il était également nécessaire de vérifier que le MV préserve les cellules saines, susceptibles d'être au contact du virus lors d'une injection chez le patient, même si son utilisation à faible dose pour vacciner des millions d'enfants dans le monde a déjà permis de démontrer son innocuité. Nos résultats montrent que 70% des lignées testées sont sensibles à l'infection et à la mort induite par le MV, tandis que les différentes cellules saines testées (cellules épithéliales bronchiques fournies par Mallory Pain de l'équipe d'Antoine Magnan, fibroblastes pulmonaires, cellules endothéliales pulmonaires et cellules mésothéliales saines) sont peu ou pas sensibles. Nous avons ensuite analysé l'expression, par les cellules tumorales de MPM et les cellules saines, des récepteurs d'entrée du virus et de certains gènes impliqués dans la réponse anti-virale afin d'expliquer les différences de sensibilité à l'infection entre les cellules.

Nos résultats confirment ainsi le potentiel thérapeutique prometteur du MV, ciblant de façon spécifique la majorité des cellules tumorales de MPM et présentant une moindre toxicité envers les cellules saines.

Ce travail fera l'objet d'une publication dans l'European Respiratory Journal.

V Bibliographie

Aboyoun, C.L., Tamm, M., Chhajed, P.N., Hopkins, P., Malouf, M.A., Rainer, S., and Glanville, A.R. (2001). Diagnostic value of follow-up transbronchial lung biopsy after lung rejection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 460–463.

Adams, B.F., Brazelton, T., Berry, G.J., and Morris, R.E. (2000). The role of respiratory epithelium in a rat model of obliterative airway disease. *Transplantation* *69*, 661–664.

Agence de biomédecine (2014). *Greffe cardio-pulmonaire et pulmonaire*. En ligne : <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2012/donnees/organes/04-coeur-poumon/synthese.htm>. Consulté le 24 Avril 2014.

Agostini, C., Calabrese, F., Rea, F., Facco, M., Tosoni, A., Loy, M., Binotto, G., Valente, M., Trentin, L., and Semenzato, G. (2001). Cxcr3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am. J. Pathol.* *158*, 1703–1711.

Andersson-Sjöland, A., Thiman, L., Nihlberg, K., Hallgren, O., Rolandsson, S., Skog, I., Mared, L., Hansson, L., Eriksson, L., Bjermer, L., et al. (2011). Fibroblast phenotypes and their activity are changed in the wound healing process after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *30*, 945–954.

Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., and Bandeira, A. (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 3008–3018.

Antoniades, H.N., Neville-Golden, J., Galanopoulos, T., Kradin, R.L., Valente, A.J., and Graves, D.T. (1992). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5371–5375.

Atkinson, J.J., and Senior, R.M. (2003). Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *28*, 12–24.

Atsuta, J., Sterbinsky, S.A., Plitt, J., Schwiebert, L.M., Bochner, B.S., and Schleimer, R.P. (1997). Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *17*, 571–582.

Bando, K., Paradis, I.L., Similo, S., Konishi, H., Komatsu, K., Zullo, T.G., Yousem, S.A., Close, J.M., Zeevi, A., and Duquesnoy, R.J. (1995). Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *110*, 4–13; discussion 13–14.

Banerjee, B., Ling, K.-M., Sutanto, E.N., Musk, M., Yerkovich, S.T., Hopkins, P.M.A., Stick, S.M.,

- Kicic, A., and Chambers, D.C. (2011). The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *30*, 1175–1185.
- Bates, R.C., and Mercurio, A.M. (2003). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1790–1800.
- Bedi, S., Vidyasagar, A., and Djamali, A. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplant. Rev. Orlando Fla* *22*, 1–5.
- Beeh, K.M., Kornmann, O., Lill, J., and Buhl, R. (2001). Induced sputum cell profiles in lung transplant recipients with or without chronic rejection: correlation with lung function. *Thorax* *56*, 557–560.
- Behr, J., Maier, K., Braun, B., Schwaiblmair, M., and Vogelmeier, C. (2000). Evidence for oxidative stress in bronchiolitis obliterans syndrome after lung and heart-lung transplantation. The Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* *69*, 1856–1860.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Lynch, J.P., Xue, Y.Y., Berlin, A., Ross, D.J., Kunkel, S.L., Charo, I.F., and Strieter, R.M. (2001). Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Clin. Invest.* *108*, 547–556.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Lynch, J.P., 3rd, Xue, Y.Y., Li, K., Ross, D.J., and Strieter, R.M. (2002a). Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 1037–1049.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Lynch, J.P., Xue, Y.Y., Li, K., Ross, D.J., and Strieter, R.M. (2002b). Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 1037–1049.
- Belperio, J.A., Lake, K., Tazelaar, H., Keane, M.P., Strieter, R.M., and Lynch, J.P., 3rd (2003a). Bronchiolitis obliterans syndrome complicating lung or heart-lung transplantation. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *24*, 499–530.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Lynch, J.P., 3rd, Zisman, D.A., Xue, Y.Y., Li, K., Ardehali, A., Ross, D.J., and Strieter, R.M. (2003b). Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 4844–4852.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Gomperts, B., Xue, Y.Y., Hong, K., Mestas, J., Ardehali, A., Mehrad, B., Saggari, R., et al. (2005). Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Clin. Invest.* *115*, 1150–1162.
- Bergmann, M., Tiroke, A., Schäfer, H., Barth, J., and Haverich, A. (1998). Gene expression of profibrotic mediators in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Scand. Cardiovasc. J. SCJ* *32*, 97–103.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and

regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.

Bevan MJ. High determinant density explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* ; 5 : 128-30.

Bharat, A., and Mohanakumar, T. (2007). Allopeptides and the alloimmune response. *Cell. Immunol.* 248, 31–43.

Bianchi, M.E., and Manfredi, A.A. (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 220, 35–46.

Bickerstaff, A.A., VanBuskirk, A.M., Wakely, E., and Orosz, C.G. (2000). Transforming growth factor-beta and interleukin-10 subvert alloreactive delayed type hypersensitivity in cardiac allograft acceptor mice. *Transplantation* 69, 1517–1520.

Billings, J.L., Hertz, M.I., and Wendt, C.H. (2001). Community respiratory virus infections following lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 3, 138–148.

Billings, J.L., Hertz, M.I., Savik, K., and Wendt, C.H. (2002). Respiratory viruses and chronic rejection in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 21, 559–566.

Blondeau, K., Mertens, V., Vanaudenaerde, B.A., Verleden, G.M., Van Raemdonck, D.E., Sifrim, D., and Dupont, L.J. (2008). Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur. Respir. J.* 31, 707–713.

Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 253–257.

Boehler, A., and Estenne, M. (2003). Post-transplant bronchiolitis obliterans. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 22, 1007–1018.

Boehler, A., Chamberlain, D., Kesten, S., Slutsky, A.S., Liu, M., and Keshavjee, S. (1997). Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation* 64, 311–317.

Boehler, A., Kesten, S., Weder, W., and Speich, R. (1998). Bronchiolitis obliterans after lung transplantation: a review. *Chest* 114, 1411–1426.

Boehler, A., Bai, X.H., Liu, M., Cassivi, S., Chamberlain, D., Slutsky, A.S., and Keshavjee, S. (1999). Upregulation of T-helper 1 cytokines and chemokine expression in post-transplant airway obliteration. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1910–1917.

Boers, J.E., Ambergen, A.W., and Thunnissen, F.B. (1998). Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 2000–2006.

Borchers, A.T., Perez, R., Kaysen, G., Ansari, A.A., and Gershwin, M.E. (1999). Role of

cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms. *Transpl. Immunol.* *7*, 75–82.

Borthwick, L.A., Parker, S.M., Brougham, K.A., Johnson, G.E., Gorowiec, M.R., Ward, C., Lordan, J.L., Corris, P.A., Kirby, J.A., and Fisher, A.J. (2009). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax* *64*, 770–777.

Borthwick, L.A., McIlroy, E.I., Gorowiec, M.R., Brodlie, M., Johnson, G.E., Ward, C., Lordan, J.L., Corris, P.A., Kirby, J.A., and Fisher, A.J. (2010). Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *10*, 498–509.

Borthwick, L.A., Sunny, S.S., Oliphant, V., Perry, J., Brodlie, M., Johnson, G.E., Ward, C., Gould, K., Corris, P.A., De Soya, A., et al. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* accentuates epithelial-to-mesenchymal transition in the airway. *Eur. Respir. J.* *37*, 1237–1247.

Borthwick, L.A., Corris, P.A., Mahida, R., Walker, A., Gardner, A., Suwara, M., Johnson, G.E., Moisey, E.J., Brodlie, M., Ward, C., et al. (2013). TNF α from classically activated macrophages accentuates epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 621–633.

Botha, P., Archer, L., Anderson, R.L., Lordan, J., Dark, J.H., Corris, P.A., Gould, K., and Fisher, A.J. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* *85*, 771–774.

Botturi, K., Lacoeyille, Y., Thomas, P., Boniface, S., Reynaud-Gaubert, M., and Magnan, A. (2008). CTLA-4-mediated regulatory phenotype of T-cells in tolerant lung recipients. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *31*, 1167–1176.

Boulay, M.-E., Prince, P., Deschesnes, F., Chakir, J., and Boulet, L.-P. (2004). Metalloproteinase-9 in induced sputum correlates with the severity of the late allergen-induced asthmatic response. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* *71*, 216–224.

Bourdin, A., Mifsud, N.A., Chanez, B., McLean, C., Chanez, P., Snell, G., and Kotsimbos, T.C. (2012). Donor clara cell secretory protein polymorphism is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* *94*, 652–658.

Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., and Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* *179*, 56–65.

Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* *169*, 1042–1049.

Bröcker, V., Länger, F., Fellous, T.G., Mengel, M., Brittan, M., Brecht, M., Milde, S., Welte, T., Eder, M., Haverich, A., et al. (2006). Fibroblasts of recipient origin contribute to bronchiolitis obliterans in human lung transplants. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 1276–1282.

Burke, C.M., Theodore, J., Dawkins, K.D., Yousem, S.A., Blank, N., Billingham, M.E., Van Kessel,

- A., Jamieson, S.W., Oyer, P.E., and Baldwin, J.C. (1984). Post-transplant obliterative bronchiolitis and other late lung sequelae in human heart-lung transplantation. *Chest* 86, 824–829.
- Burlingham, W.J., Love, R.B., Jankowska-Gan, E., Haynes, L.D., Xu, Q., Bobadilla, J.L., Meyer, K.C., Hayney, M.S., Braun, R.K., Greenspan, D.S., et al. (2007). IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J. Clin. Invest.* 117, 3498–3506.
- Câmara, J., and Jarai, G. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF- α . *Fibrogenesis Tissue Repair* 3, 2.
- Campbell, L.G., Ramachandran, S., Liu, W., Shipley, J.M., Itoharu, S., Rogers, J.G., Moazami, N., Senior, R.M., and Jaramillo, A. (2005). Different roles for matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the pathogenesis of cardiac allograft rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 517–528.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83.
- Cantu, E., 3rd, Appel, J.Z., 3rd, Hartwig, M.G., Woreta, H., Green, C., Messier, R., Palmer, S.M., and Davis, R.D., Jr (2004). J. Maxwell Chamberlain Memorial Paper. Early fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Ann. Thorac. Surg.* 78, 1142–1151; discussion 1142–1151.
- Capelli, A., Di Stefano, A., Gnemmi, I., Balbo, P., Cerutti, C.G., Balbi, B., Lusuardi, M., and Donner, C.F. (1999). Increased MCP-1 and MIP-1 β in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur. Respir. J.* 14, 160–165.
- Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 171, 377–387.
- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., and Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3652–3656.
- Cataldo, D.D., Gueders, M.M., Rocks, N., Sounni, N.E., Evrard, B., Bartsch, P., Louis, R., Noel, A., and Foidart, J.M. (2003). Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 49, 875–884.
- Chakinala, M.M., Ritter, J., Gage, B.F., Lynch, J.P., Aloush, A., Patterson, G.A., and Trulock, E.P. (2004). Yield of surveillance bronchoscopy for acute rejection and lymphocytic bronchitis/bronchiolitis after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 23, 1396–1404.
- Chakinala, M.M., Ritter, J., Gage, B.F., Aloush, A.A., Hachem, R.H., Lynch, J.P., Patterson, G.A., and Trulock, E.P. (2005). Reliability for grading acute rejection and airway inflammation after lung

transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24, 652–657.

Chakrabarti, S., and Patel, K.D. (2005). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp. Lung Res.* 31, 599–621.

Charpin, J.M., Stern, M., Lebrun, G., Aubin, P., Grenet, D., and Israël-Biet, D. (2001). Increased endothelin-1 associated with bacterial infection in lung transplant recipients. *Transplantation* 71, 1840–1847.

Chiao, Y.A., Dai, Q., Zhang, J., Lin, J., Lopez, E.F., Ahuja, S.S., Chou, Y.-M., Lindsey, M.L., and Jin, Y.-F. (2011). Multi-analyte profiling reveals matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemotactic protein-1 as plasma biomarkers of cardiac aging. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4, 455–462.

Chopek, M.W., Simmons, R.L., and Platt, J.L. (1987). ABO-incompatible kidney transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transplant. Proc.* 19, 4553–4557.

Christensen, T.G., and Hayes, J.A. (1982). Endogenous peroxidase in the conducting airways of hamsters: morphologic evidence of synthesis and secretion. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125, 341–346.

Christensen, P.J., Du, M., Moore, B., Morris, S., Toews, G.B., and Paine, R., 3rd (2004). Expression and functional implications of CCR2 expression on murine alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286, L68–72.

Christensen, T.G., Blanchard, G.C., Nolley, G., and Hayes, J.A. (1981). Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in the lower respiratory tract of the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 214, 407–415.

Christie, J.D., Carby, M., Bag, R., Corris, P., Hertz, M., Weill, D., and ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction (2005). Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24, 1454–1459.

Christie, J.D., Edwards, L.B., Aurora, P., Dobbels, F., Kirk, R., Rahmel, A.O., Stehlik, J., Taylor, D.O., Kucheryavaya, A.Y., and Hertz, M.I. (2009). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 28, 1031–1049.

Christie, J.D., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Aurora, P., Dobbels, F., Kirk, R., Rahmel, A.O., Stehlik, J., and Hertz, M.I. (2010a). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report--2010. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 29, 1104–1118.

Christie, J.D., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Aurora, P., Dobbels, F., Kirk, R., Rahmel, A.O., Stehlik, J., and Hertz, M.I. (2010b). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report--2010. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 29, 1104–1118.

Cigna, N., Farrokhi Moshai, E., Brayer, S., Marchal-Somme, J., Wémeau-Stervinou, L., Fabre, A., Mal, H., Lesèche, G., Dehoux, M., Soler, P., et al. (2012). The hedgehog system machinery controls

transforming growth factor- β -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* *181*, 2126–2137.

Clark, J.G., Schwartz, D.A., Flournoy, N., Sullivan, K.M., Crawford, S.W., and Thomas, E.D. (1987). Risk factors for airflow obstruction in recipients of bone marrow transplants. *Ann. Intern. Med.* *107*, 648–656.

Cliffe, L.J., Humphreys, N.E., Lane, T.E., Potten, C.S., Booth, C., and Grecis, R.K. (2005). Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science* *308*, 1463–1465.

Clinical trial (2014). En ligne :

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=CCR2+antagonist&Search=Search>. Consulté le 24 Avril 2014

Colombat, M., Groussard, O., Lautrette, A., Thabut, G., Marrash-Chahla, R., Brugière, O., Mal, H., Lesèche, G., Fournier, M., and Degott, C. (2005). Analysis of the different histologic lesions observed in transbronchial biopsy for the diagnosis of acute rejection. Clinicopathologic correlations during the first 6 months after lung transplantation. *Hum. Pathol.* *36*, 387–394.

Cooper, J.D., Pearson, F.G., Patterson, G.A., Todd, T.R., Ginsberg, R.J., Goldberg, M., and DeMajo, W.A. (1987). Technique of successful lung transplantation in humans. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *93*, 173–181.

Corcoran, T.E., Niven, R., Verret, W., Dilly, S., and Johnson, B.A. (2013). Lung Deposition and Pharmacokinetics of Nebulized Cyclosporine in Lung Transplant Patients. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*

Corris, P.A. (2003). Lung transplantation. Bronchiolitis obliterans syndrome. *Chest Surg. Clin. N. Am.* *13*, 543–557.

Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., and Gruenert, D.C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *10*, 38–47.

Crawford, S.W., and Clark, J.G. (1993). Bronchiolitis associated with bone marrow transplantation. *Clin. Chest Med.* *14*, 741–749.

Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 5134–5138.

D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P., and Sinigaglia, F. (2003). Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Immunol. Methods* *273*, 3–13.

- D'Ovidio, F., Mura, M., Tsang, M., Waddell, T.K., Hutcheon, M.A., Singer, L.G., Hadjiliadis, D., Chaparro, C., Gutierrez, C., Pierre, A., et al. (2005). Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *129*, 1144–1152.
- Dai, J., Xie, C., and Churg, A. (2002). Iron loading makes a nonfibrogenic model air pollutant particle fibrogenic in rat tracheal explants. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *26*, 685–693.
- Daud, S.A., Yusen, R.D., Meyers, B.F., Chakinala, M.M., Walter, M.J., Aloush, A.A., Patterson, G.A., Trulock, E.P., and Hachem, R.R. (2007). Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 507–513.
- Davis, R.D., Jr, Lau, C.L., Eubanks, S., Messier, R.H., Hadjiliadis, D., Steele, M.P., and Palmer, S.M. (2003). Improved lung allograft function after fundoplication in patients with gastroesophageal reflux disease undergoing lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *125*, 533–542.
- Davreux, C.J., Chu, N.H., Waddell, T.K., Mayer, E., and Patterson, G.A. (1993). Improved tracheal allograft viability in immunosuppressed rats. *Ann. Thorac. Surg.* *55*, 131–134.
- DeBruyne, L.A., Lynch, J.P., 3rd, Baker, L.A., Florn, R., Deeb, G.M., Whyte, R.I., and Bishop, D.K. (1996). Restricted V beta usage by T cells infiltrating rejecting human lung allografts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 3493–3500.
- Delacourt, C., Le Bourgeois, M., D'Ortho, M.P., Doit, C., Scheinmann, P., Navarro, J., Harf, A., Hartmann, D.J., and Lafuma, C. (1995). Imbalance between 95 kDa type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *152*, 765–774.
- Dennler, S., André, J., Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2009). Cloning of the human GLI2 Promoter: transcriptional activation by transforming growth factor-beta via SMAD3/beta-catenin cooperation. *J. Biol. Chem.* *284*, 31523–31531.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 577–584.
- Devouassoux, G., Pison, C., Drouet, C., Pin, I., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2001). Early lung leukocyte infiltration, HLA and adhesion molecule expression predict chronic rejection. *Transpl. Immunol.* *8*, 229–236.
- DiGiovine, B., Lynch, J.P., 3rd, Martinez, F.J., Flint, A., Whyte, R.I., Iannettoni, M.D., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Glass, M.C., Wilke, C.A., et al. (1996). Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation: role of IL-8. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 4194–4202.
- Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., McCormick, M., Woods, J., May, R., Sleeman, M.A., et al. (2010). Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest* *138*, 1140–1147.
- Doerner, A.M., and Zuraw, B.L. (2009). TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition

(EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir. Res.* *10*, 100.

Donnelly, G.M., Haack, D.G., and Heird, C.S. (1982). Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. *Cell Tissue Kinet.* *15*, 119–130.

al-Dossari, G.A., Kshetry, V.R., Jessurun, J., and Bolman, R.M., 3rd (1994). Experimental large-animal model of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* *58*, 34–39; discussion 39–40.

Dumont, N., and Arteaga, C.L. (2003). Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell* *3*, 531–536.

Eagar, T.N., Karandikar, N.J., Bluestone, J.A., and Miller, S.D. (2002). The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* *32*, 972–981.

Eger, A., Stockinger, A., Park, J., Langkopf, E., Mikula, M., Gotzmann, J., Mikulits, W., Beug, H., and Foisner, R. (2004). beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* *23*, 2672–2680.

Ehrhardt, C., Kneuer, C., Fiegel, J., Hanes, J., Schaefer, U.F., Kim, K.-J., and Lehr, C.-M. (2002). Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies. *Cell Tissue Res.* *308*, 391–400.

El-Gamel, A., Awad, M., Sim, E., Hasleton, P., Yonan, N., Egan, J., Deiraniya, A., and Hutchinson, I.V. (1998). Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* *13*, 424–430.

El-Gamel, A., Sim, E., Hasleton, P., Hutchinson, J., Yonan, N., Egan, J., Campbell, C., Rahman, A., Sheldon, S., Deiraniya, A., et al. (1999). Transforming growth factor beta (TGF-beta) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *18*, 828–837.

Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Boeck, W., Seufferlein, T., Menke, A., Ruhland, C., Adler, G., and Gress, T.M. (2001). Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res.* *61*, 4222–4228.

Ellsner, A., and Vogelmeier, C. (2001). The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* *3*, 168–176.

Ellsner, A., Jaumann, F., Dobmann, S., Behr, J., Schwaiblmair, M., Reichenspurner, H., Fürst, H., Briegel, J., and Vogelmeier, C. (2000a). Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* *70*, 362–367.

Elssner, A., Jaumann, F., Dobmann, S., Behr, J., Schwaiblmair, M., Reichenspurner, H., Fürst, H., Briegel, J., and Vogelmeier, C. (2000b). Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* 70, 362–367.

Elssner, A., Jaumann, F., Wolf, W.P., Schwaiblmair, M., Behr, J., Fürst, H., Reichenspurner, H., Briegel, J., Niedermeyer, J., and Vogelmeier, C. (2002). Bronchial epithelial cell B7-1 and B7-2 mRNA expression after lung transplantation: a role in allograft rejection? *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 20, 165–169.

Estenne, M., and Hertz, M.I. (2002). Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 440–444.

Estenne, M., Maurer, J.R., Boehler, A., Egan, J.J., Frost, A., Hertz, M., Mallory, G.B., Snell, G.I., and Yousem, S. (2002). Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 21, 297–310.

Fan, L., Benson, H.L., Vittal, R., Mickler, E.A., Presson, R., Fisher, A.J., Cummings, O.W., Heidler, K.M., Keller, M.R., Burlingham, W.J., et al. (2011). Neutralizing IL-17 prevents obliterative bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 911–922.

Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 571–611.

Federica, M., Nadia, S., Monica, M., Alessandro, C., Tiberio, O., Francesco, B., Mario, V., and Maria, F.A. (2011). Clinical and immunological evaluation of 12-month azithromycin therapy in chronic lung allograft rejection. *Clin. Transplant.* 25, E381–389.

Fernández, F.G., Jaramillo, A., Chen, C., Liu, D.Z., Tung, T., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2004). Airway epithelium is the primary target of allograft rejection in murine obliterative airway disease. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 319–325.

Fernández, F.G., Campbell, L.G., Liu, W., Shipley, J.M., Itohara, S., Patterson, G.A., Senior, R.M., Mohanakumar, T., and Jaramillo, A. (2005). Inhibition of obliterative airway disease development in murine tracheal allografts by matrix metalloproteinase-9 deficiency. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 671–683.

Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 247–254.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 146, 3444–3451.

Flanders, K.C. (2004). Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int. J. Exp. Pathol.* 85, 47–64.

Forbes, B., and Ehrhardt, C. (2005). Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery

applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV 60*, 193–205.

Forbes, B., Shah, A., Martin, G.P., and Lansley, A.B. (2003). The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. *Int. J. Pharm.* 257, 161–167.

Forrest, I.A., Murphy, D.M., Ward, C., Jones, D., Johnson, G.E., Archer, L., Gould, F.K., Cawston, T.E., Lordan, J.L., and Corris, P.A. (2005). Primary airway epithelial cell culture from lung transplant recipients. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 26, 1080–1085.

Fuxe, J., Vincent, T., and Garcia de Herreros, A. (2010). Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 2363–2374.

Galichon, P., Vittoz, N., Xu-Dubois, Y.-C., Cornaire, E., Vandermeersch, S., Mesnard, L., Hertig, A., and Rondeau, E. (2011). Epithelial phenotypic changes detect cyclosporine in vivo nephrotoxicity at a reversible stage. *Transplantation* 92, 993–998.

Game, D.S., and Lechler, R.I. (2002). Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl. Immunol.* 10, 101–108.

Gardner, A., Fisher, A.J., Richter, C., Johnson, G.E., Moisey, E.J., Brodlie, M., Ward, C., Krippner-Heidenreich, A., Mann, D.A., and Borthwick, L.A. (2012). The critical role of TAK1 in accentuated epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am. J. Pathol.* 180, 2293–2308.

Gelman, A.E., Okazaki, M., Sugimoto, S., Li, W., Kornfeld, C.G., Lai, J., Richardson, S.B., Kreisel, F.H., Huang, H.J., Tietjens, J.R., et al. (2010). CCR2 regulates monocyte recruitment as well as CD4 T1 allorecognition after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 10, 1189–1199.

Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287–299.

Girgis, R.E., Tu, I., Berry, G.J., Reichenspurner, H., Valentine, V.G., Conte, J.V., Ting, A., Johnstone, I., Miller, J., Robbins, R.C., et al. (1996). Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 15, 1200–1208.

Girnita, A.L., McCurry, K.R., Iacono, A.T., Duquesnoy, R., Corcoran, T.E., Awad, M., Spichty, K.J., Yousem, S.A., Burckart, G., Dauber, J.H., et al. (2004). HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 23, 1135–1141.

Girnita, A.L., Duquesnoy, R., Yousem, S.A., Iacono, A.T., Corcoran, T.E., Buzoianu, M., Johnson, B., Spichty, K.J., Dauber, J.H., Burckart, G., et al. (2005). HLA-specific antibodies are risk factors for lymphocytic bronchiolitis and chronic lung allograft dysfunction. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 131–138.

- Glanville, A.R., Aboyoun, C.L., Havryk, A., Plit, M., Rainer, S., and Malouf, M.A. (2008). Severity of lymphocytic bronchiolitis predicts long-term outcome after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *177*, 1033–1040.
- Godfrey, R.W., Severs, N.J., and Jeffery, P.K. (1992). Freeze-fracture morphology and quantification of human bronchial epithelial tight junctions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *6*, 453–458.
- Goers, T.A., Ramachandran, S., Aloush, A., Trulock, E., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2008). De novo production of K-alpha1 tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 4487–4494.
- Gong, J.H., Ratkay, L.G., Waterfield, J.D., and Clark-Lewis, I. (1997). An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J. Exp. Med.* *186*, 131–137.
- Gonzalez-Quesada, C., and Frangogiannis, N.G. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes. *Curr. Atheroscler. Rep.* *11*, 131–138.
- Goodman, M.R., Link, D.W., Brown, W.R., and Nakane, P.K. (1981). Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* *123*, 115–119.
- Greenland, J.R., Jewell, N.P., Gottschall, M., Trivedi, N.N., Kukreja, J., Hays, S.R., Singer, J.P., Golden, J.A., and Caughey, G.H. (2014). Bronchoalveolar lavage cell immunophenotyping facilitates diagnosis of lung allograft rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *14*, 831–840.
- Gregson, A.L., Wang, X., Weigt, S.S., Palchevskiy, V., Lynch, J.P., 3rd, Ross, D.J., Kubak, B.M., Sagar, R., Fishbein, M.C., Ardehali, A., et al. (2013). Interaction between *Pseudomonas* and CXC chemokines increases risk of bronchiolitis obliterans syndrome and death in lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *187*, 518–526.
- Groetzner, J., Wittwer, T., Kaczmarek, I., Ueberfuhr, P., Strauch, J., Nagib, R., Meiser, B., Franke, U., Reichart, B., and Wahlers, T. (2006). Conversion to sirolimus and mycophenolate can attenuate the progression of bronchiolitis obliterans syndrome and improves renal function after lung transplantation. *Transplantation* *81*, 355–360.
- Guarino, M., Tosoni, A., and Nebuloni, M. (2009). Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum. Pathol.* *40*, 1365–1376.
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3460–3464.
- Hackett, T.-L., Warner, S.M., Stefanowicz, D., Shaheen, F., Pechkovsky, D.V., Murray, L.A., Argentieri, R., Kicic, A., Stick, S.M., Bai, T.R., et al. (2009). Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *180*, 122–133.

- Hackett, T.-L., de Bruin, H.G., Shaheen, F., van den Berge, M., van Oosterhout, A.J., Postma, D.S., and Heijink, I.H. (2013). Caveolin-1 controls airway epithelial barrier function. Implications for asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *49*, 662–671.
- Hajj, R., Baranek, T., Le Naour, R., Lesimple, P., Puchelle, E., and Coraux, C. (2007). Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 139–148.
- Hara, M., Kingsley, C.I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S.E., Bushell, A.R., Morris, P.J., Powrie, F., and Wood, K.J. (2001). IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 3789–3796.
- HARDY, J.D., WEBB, W.R., DALTON, M.L., Jr, and WALKER, G.R., Jr (1963). LUNG HOMOTRANSPLANTATION IN MAN. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *186*, 1065–1074.
- Hartog, C.M., Wermelt, J.A., Sommerfeld, C.O., Eichler, W., Dalhoff, K., and Braun, J. (2003). Pulmonary matrix metalloproteinase excess in hospital-acquired pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *167*, 593–598.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., and Stevenson, B.R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* *141*, 199–208.
- Hay, E.D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *233*, 706–720.
- Hayes, D., Jr, Zwischenberger, J.B., and Mansour, H.M. (2010). Aerosolized tacrolimus: a case report in a lung transplant recipient. *Transplant. Proc.* *42*, 3876–3879.
- Hayes, D., Jr, Mansour, H.M., Kirkby, S., and Phillips, A.B. (2012). Rapid acute onset of bronchiolitis obliterans syndrome in a lung transplant recipient after respiratory syncytial virus infection. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* *14*, 548–550.
- Hazzan, M., Hertig, A., Buob, D., Copin, M.-C., Noël, C., Rondeau, E., and Dubois-Xu, Y.-C. (2011). Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *22*, 1375–1381.
- Heijink, I.H., Postma, D.S., Noordhoek, J.A., Broekema, M., and Kapus, A. (2010). House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *42*, 69–79.
- Heinecke, L., Proud, D., Sanders, S., Schleimer, R.P., and Kim, J. (2008). Induction of B7-H1 and B7-DC expression on airway epithelial cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA and human rhinovirus infection: In vivo and in vitro studies. *J. Allergy Clin. Immunol.* *121*, 1155–1160.
- Heit, A., Huster, K.M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D.H., and Wagner, H. (2004). CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 1501–1507.

- Hele, D.J., Yacoub, M.H., and Belvisi, M.G. (2001). The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir. Res.* 2, 169–183.
- Heng, D., Sharples, L.D., McNeil, K., Stewart, S., Wreghitt, T., and Wallwork, J. (1998a). Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 17, 1255–1263.
- Heng, D., Sharples, L.D., McNeil, K., Stewart, S., Wreghitt, T., and Wallwork, J. (1998b). Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 17, 1255–1263.
- Hernandez-Fuentes, M.P., Baker, R.J., and Lechler, R.I. (1999). The alloresponse. *Rev. Immunogenet.* 1, 282–296.
- Herrera, O.B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M.J., Marelli-Berg, F.M., and Lechler, R.I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 4828–4837.
- Hertig, A. (2008). [Epithelial-mesenchymal transition of the renal graft]. *Néphrologie Thérapeutique* 4 *Suppl 1*, S25–S28.
- Hertz, M.I., Henke, C.A., Nakhleh, R.E., Harmon, K.R., Marinelli, W.A., Fox, J.M., Kubo, S.H., Shumway, S.J., Bolman, R.M., 3rd, and Bitterman, P.B. (1992). Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10385–10389.
- Hertz, M.I., Jessurun, J., King, M.B., Savik, S.K., and Murray, J.J. (1993). Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am. J. Pathol.* 142, 1945–1951.
- Higuchi, T., Jaramillo, A., Kaleem, Z., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2002). Different kinetics of obliterative airway disease development in heterotopic murine tracheal allografts induced by CD4+ and CD8+ T cells. *Transplantation* 74, 646–651.
- Hildebrandt, G.C., Duffner, U.A., Olkiewicz, K.M., Corrion, L.A., Willmarth, N.E., Williams, D.L., Clouthier, S.G., Hogaboam, C.M., Reddy, P.R., Moore, B.B., et al. (2004). A critical role for CCR2/MCP-1 interactions in the development of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 103, 2417–2426.
- Hirsch, J., Elssner, A., Mazur, G., Maier, K.L., Bittmann, I., Behr, J., Schwaiblmair, M., Reichenspurner, H., Fürst, H., Briegel, J., et al. (1999). Bronchiolitis obliterans syndrome after (heart-)lung transplantation. Impaired antiprotease defense and increased oxidant activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1640–1646.
- Hirschburger, M., Greschus, S., Kuchenbuch, T., Plötz, C., Obert, M., Traupe, H., Padberg, W., and Grau, V. (2007). Lung transplantation in the Fischer 344-->Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study bronchiolitis obliterans. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26, 390–398.

- Hodge, G., Hodge, S., Reynolds, P., and Holmes, M. (2005). Intracellular cytokines in blood T cells in lung transplant patients--a more relevant indicator of immunosuppression than drug levels. *Clin. Exp. Immunol.* *139*, 159–164.
- Hodge, G., Hodge, S., Holmes-Liew, C.-L., Reynolds, P.N., and Holmes, M. (2012). Bronchiolitis obliterans syndrome is associated with increased peripheral blood natural killer and natural killer T-like granzymes, perforin, and T-helper-type 1 pro-inflammatory cytokines. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *31*, 888–895.
- Hodge, S., Holmes, M., Banerjee, B., Musk, M., Kicic, A., Waterer, G., Reynolds, P.N., Hodge, G., and Chambers, D.C. (2009). Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 727–733.
- Holgate, S.T., Davies, D.E., Lackie, P.M., Wilson, S.J., Puddicombe, S.M., and Lordan, J.L. (2000). Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 193–204.
- Hopkins, P.M., Aboyou, C.L., Chhajed, P.N., Malouf, M.A., Plit, M.L., Rainer, S.P., and Glanville, A.R. (2002). Prospective analysis of 1,235 transbronchial lung biopsies in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *21*, 1062–1067.
- Huber, M.A., Beug, H., and Wirth, T. (2004). Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage. *Cell Cycle Georget. Tex* *3*, 1477–1480.
- Hübner, R.H., Meffert, S., Mundt, U., Böttcher, H., Freitag, S., El Mokhtari, N.E., Pufe, T., Hirt, S., Fölsch, U.R., and Bewig, B. (2005). Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur. Respir. J.* *25*, 494–501.
- Husain, A.N., Siddiqui, M.T., Holmes, E.W., Chandrasekhar, A.J., McCabe, M., Radvany, R., and Garrity, E.R. (1999). Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *159*, 829–833.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 276–285.
- Huston, D.P., and Liu, Y.J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin: a potential therapeutic target for allergy and asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *6*, 372–376.
- Hwu, P., Du, M.X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M.W., and Young, H.A. (2000). Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 3596–3599.
- Iacono, A., Dauber, J., Keenan, R., Spichty, K., Cai, J., Grgurich, W., Burckart, G., Smaldone, G., Pham, S., Otori, N.P., et al. (1997). Interleukin 6 and interferon-gamma gene expression in lung transplant recipients with refractory acute cellular rejection: implications for monitoring and inhibition by treatment with aerosolized cyclosporine. *Transplantation* *64*, 263–269.

- Ibrahim, S., Dawson, D.V., and Sanfilippo, F. (1995). Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation* *59*, 724–728.
- Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* *116*, 1959–1967.
- Ip, W.K., Wong, C.K., and Lam, C.W.K. (2006). Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. *Clin. Exp. Immunol.* *145*, 162–172.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* *110*, 341–350.
- Jackson, C.H., Sharples, L.D., McNeil, K., Stewart, S., and Wallwork, J. (2002). Acute and chronic onset of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS): are they different entities? *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *21*, 658–666.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grünert, S. (2002). Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* *156*, 299–313.
- Janeway, C.A., Jr (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 1*, 1–13.
- Jaramillo, A., Smith, M.A., Phelan, D., Sundaresan, S., Trulock, E.P., Lynch, J.P., Cooper, J.D., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (1999). Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation. *Transplantation* *67*, 1155–1161.
- Jaramillo, A., Naziruddin, B., Zhang, L., Reznik, S.I., Smith, M.A., Aloush, A.A., Trulock, E.P., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2001). Activation of human airway epithelial cells by non-HLA antibodies developed after lung transplantation: a potential etiological factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* *71*, 966–976.
- Jaramillo, A., Smith, C.R., Maruyama, T., Zhang, L., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2003). Anti-HLA class I antibody binding to airway epithelial cells induces production of fibrogenic growth factors and apoptotic cell death: a possible mechanism for bronchiolitis obliterans syndrome. *Hum. Immunol.* *64*, 521–529.
- Javelaud, D., Pierrat, M.-J., and Mauviel, A. (2012). Crosstalk between TGF- β and hedgehog signaling in cancer. *FEBS Lett.* *586*, 2016–2025.
- Jesaitis, L.A., and Goodenough, D.A. (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J. Cell Biol.* *124*, 949–961.

- Ji, X., Li, J., Xu, L., Wang, W., Luo, M., Luo, S., Ma, L., Li, K., Gong, S., He, L., et al. (2013). IL4 and IL-17A provide a Th2/Th17-polarized inflammatory milieu in favor of TGF- β 1 to induce bronchial epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 1481–1492.
- Jiang, D., Liang, J., Guo, R., Xie, T., Kelly, F.L., Martinu, T., Yang, T., Lovgren, A.K., Chia, J., Liu, N., et al. (2012). Long-term exposure of chemokine CXCL10 causes bronchiolitis-like inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *46*, 592–598.
- Jiang, S., Herrera, O., and Lechler, R.I. (2004). New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 550–557.
- Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* *14*, 88–92.
- Johansson, K.A., and Grapin-Botton, A. (2002). Development and diseases of the pancreas. *Clin. Genet.* *62*, 14–23.
- Johnson, J.R., Roos, A., Berg, T., Nord, M., and Fuxe, J. (2011). Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways. *PLoS ONE* *6*, e16175.
- Jonosono, M., Fang, K.C., Keith, F.M., Turck, C.W., Blanc, P.D., Hall, T.S., Fukano, A.K., Rifkin, C.J., Gold, W.M., Webb, W.R., et al. (1999). Measurement of fibroblast proliferative activity in bronchoalveolar lavage fluid in the analysis of obliterative bronchiolitis among lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *18*, 972–985.
- Johnston SL. Impact of viruses on airway diseases. *Eur Resp Rev.* 2005;14:57–61
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211–220.
- Jungraithmayr, W.M., Korom, S., Hillinger, S., and Weder, W. (2009). A mouse model of orthotopic, single-lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *137*, 486–491.
- Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* *111*, 837–851.
- Kallio, E.A., Koskinen, P.K., Aavik, E., Vaali, K., and Lemstöm, K.B. (1997). Role of nitric oxide in experimental obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. *J. Clin. Invest.* *100*, 2984–2994.
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* *119*, 1417–1419.
- Kalluri, R., and Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for

fibrosis. *J. Clin. Invest.* *112*, 1776–1784.

Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., and Beachy, P.A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* *431*, 707–712.

Keane, M.P., Gomperts, B.N., Weigt, S., Xue, Y.Y., Burdick, M.D., Nakamura, H., Zisman, D.A., Ardehali, A., Saggari, R., Lynch, J.P., 3rd, et al. (2007). IL-13 is pivotal in the fibro-obliterative process of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 511–519.

Kelly, K., and Hertz, M.I. (1997). Obliterative bronchiolitis. *Clin. Chest Med.* *18*, 319–338.

Kervinen, H., Mänttari, M., Kaartinen, M., Mäkynen, H., Palosuo, T., Pulkki, K., and Kovanen, P.T. (2004). Prognostic usefulness of plasma monocyte/macrophage and T-lymphocyte activation markers in patients with acute coronary syndromes. *Am. J. Cardiol.* *94*, 993–996.

Kim, J., Myers, A.C., Chen, L., Pardoll, D.M., Truong-Tran, Q.-A., Lane, A.P., McDyer, J.F., Fortuno, L., and Schleimer, R.P. (2005). Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *33*, 280–289.

Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., and Chapman, H.A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 13180–13185.

Kingsley, C.I., Karim, M., Bushnell, A.R., and Wood, K.J. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 1080–1086.

Kitani, A., Fuss, I., Nakamura, K., Kumaki, F., Usui, T., and Strober, W. (2003). Transforming growth factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. *J. Exp. Med.* *198*, 1179–1188.

Knoop, C., and Estenne, M. (2006). Acute and chronic rejection after lung transplantation. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *27*, 521–533.

Kolls, J.K., and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* *21*, 467–476.

Königshoff, M., and Eickelberg, O. (2010). WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *42*, 21–31.

Königshoff, M., Balsara, N., Pfaff, E.-M., Kramer, M., Chrobak, I., Seeger, W., and Eickelberg, O. (2008). Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* *3*, e2142.

Kotsimbos, T.C., Snell, G.I., Levvey, B., Spelman, D.W., Fuller, A.J., Wesselingh, S.L., Williams, T.J., and Ostergaard, L. (2005). Chlamydia pneumoniae serology in donors and recipients and the risk

of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 79, 269–275.

Kottke, M.D., Delva, E., and Kowalczyk, A.P. (2006). The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J. Cell Sci.* 119, 797–806.

Kreisel, D., Krupnick, A.S., Gelman, A.E., Engels, F.H., Popma, S.H., Krasinskas, A.M., Balsara, K.R., Szeto, W.Y., Turka, L.A., and Rosengard, B.R. (2002). Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8⁺ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat. Med.* 8, 233–239.

Kroshus, T.J., Kshetry, V.R., Savik, K., John, R., Hertz, M.I., and Bolman, R.M., 3rd (1997). Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 114, 195–202.

Lama, V.N., Harada, H., Badri, L.N., Flint, A., Hogaboam, C.M., McKenzie, A., Martinez, F.J., Toews, G.B., Moore, B.B., and Pinsky, D.J. (2006). Obligatory role for interleukin-13 in obstructive lesion development in airway allografts. *Am. J. Pathol.* 169, 47–60.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 982–987.

Lau, C.L., Palmer, S.M., Posther, K.E., Howell, D.N., Reinsmoen, N.L., Massey, H.T., Tapson, V.F., Jagers, J.J., D'Amico, T.A., and Davis, R.D., Jr (2000). Influence of panel-reactive antibodies on posttransplant outcomes in lung transplant recipients. *Ann. Thorac. Surg.* 69, 1520–1524.

De Lemos, J.A., Morrow, D.A., Sabatine, M.S., Murphy, S.A., Gibson, C.M., Antman, E.M., McCabe, C.H., Cannon, C.P., and Braunwald, E. (2003). Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 107, 690–695.

Leonard, C.T., Soccia, P.M., Singer, L., Berry, G.J., Theodore, J., Holt, P.G., Doyle, R.L., and Rosen, G.D. (2000). Dendritic cells and macrophages in lung allografts: A role in chronic rejection? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1349–1354.

Li, B., Hartwig, M.G., Appel, J.Z., Bush, E.L., Balsara, K.R., Holzknecht, Z.E., Collins, B.H., Howell, D.N., Parker, W., Lin, S.S., et al. (2008). Chronic aspiration of gastric fluid induces the development of obliterative bronchiolitis in rat lung transplants. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8, 1614–1621.

Li, Q., Liu, B.-C., Lv, L.-L., Ma, K.-L., Zhang, X.-L., and Phillips, A.O. (2011). Monocytes induce proximal tubular epithelial-mesenchymal transition through NF-kappa B dependent upregulation of ICAM-1. *J. Cell. Biochem.* 112, 1585–1592.

Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 17, 62–70.

Lim, J.H., Um, H.J., Park, J.-W., Lee, I.-K., and Kwon, T.K. (2009). Interleukin-1beta promotes the

expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human aorta smooth muscle cells via multiple signaling pathways. *Exp. Mol. Med.* 41, 757–764.

Lin, K.L., Suzuki, Y., Nakano, H., Ramsburg, E., and Gunn, M.D. (2008). CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 2562–2572.

Liu, M., Suga, M., Maclean, A.A., St George, J.A., Souza, D.W., and Keshavjee, S. (2002). Soluble transforming growth factor-beta type III receptor gene transfection inhibits fibrous airway obliteration in a rat model of Bronchiolitis obliterans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 419–423.

Luckraz, H., Sharples, L., McNeil, K., Wreghitt, T., and Wallwork, J. (2003). Cytomegalovirus antibody status of donor/recipient does not influence the incidence of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 22, 287–291.

Lundien, M.C., Mohammed, K.A., Nasreen, N., Tepper, R.S., Hardwick, J.A., Sanders, K.L., Van Horn, R.D., and Antony, V.B. (2002). Induction of MCP-1 expression in airway epithelial cells: role of CCR2 receptor in airway epithelial injury. *J. Clin. Immunol.* 22, 144–152.

Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Hall, M.E., and Lindsey, M.L. (2014a). Using plasma matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 to predict future cardiovascular events in subjects with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 232, 231–233.

Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Hall, M.E., and Lindsey, M.L. (2014b). Using plasma matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 to predict future cardiovascular events in subjects with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 232, 231–233.

Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V., and Bayry, J. (2012). Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am. J. Pathol.* 181, 8–18.

Madri, J.A., and Furthmayr, H. (1980). Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol.* 11, 353–366.

Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* 13, 2207–2217.

Magnan, A., Mege, J.L., Reynaud, M., Thomas, P., Capo, C., Garbe, L., Meric, B., Badier, M., Bongrand, P., and Viard, L. (1994). Monitoring of alveolar macrophage production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in lung transplant recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 684–689.

Magnan, A., Mege, J.L., Escallier, J.C., Brisse, J., Capo, C., Reynaud, M., Thomas, P., Meric, B., Garbe, L., Badier, M., et al. (1996). Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. Marseille and Montréal Lung Transplantation Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 1431–1436.

Magnusson, J., Westin, J., Andersson, L.-M., Brittain-Long, R., and Riise, G.C. (2013). The impact of viral respiratory tract infections on long-term morbidity and mortality following lung transplantation:

a retrospective cohort study using a multiplex PCR panel. *Transplantation* 95, 383–388.

Maloy, K.J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N.J., and Powrie, F. (2003). CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197, 111–119.

Mamessier, E., Milhe, F., Badier, M., Thomas, P., Magnan, A., and Reynaud-Gaubert, M. (2006). Comparison of induced sputum and bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 25, 523–532.

Mamessier, E., Lorec, A.-M., Thomas, P., Badier, M., Magnan, A., and Reynaud-Gaubert, M. (2007). T regulatory cells in stable posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 84, 908–916.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231–234.

Maouche, K., Polette, M., Jolly, T., Medjber, K., Cloëz-Tayarani, I., Changeux, J.-P., Burlet, H., Terryn, C., Coraux, C., Zahm, J.-M., et al. (2009). $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 175, 1868–1882.

Marck KW, Hess F, Wildevuur, CRH: Microsurgical aspects of unilateral lung transplantation in the rat; in Lie TE (ed): *Microsurgery*, Amsterdam, The Netherlands, Excerpta Medica, 1979, pp. 363–368.

Marks, R., and Finke, J. (2006). *Biologics in the prevention and treatment of graft rejection*. Springer Semin. Immunopathol. 27, 457–476.

Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.

Matsumura, Y., Marchevsky, A., Zuo, X.J., Kass, R.M., Matloff, J.M., and Jordan, S.C. (1995). Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation* 59, 1509–1517.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305.

Matzinger, P., and Bevan, M.J. (1977). Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell. Immunol.* 29, 1–5.

Mauck, K.A., and Hosenpud, J.D. (1996). The bronchial epithelium: a potential allogeneic target for chronic rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 15, 709–714.

Medoff, B.D., Wain, J.C., Seung, E., Jakobek, R., Means, T.K., Ginns, L.C., Farber, J.M., and Luster, A.D. (2006). CXCR3 and its ligands in a murine model of obliterative bronchiolitis: regulation and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 7087–7095.

- Meloni, F., Vitulo, P., Bianco, A.M., Paschetto, E., Morosini, M., Cascina, A., Mazzucchelli, I., Ciardelli, L., Oggionni, T., Fietta, A.M., et al. (2004). Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 77, 762–766.
- Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L., and Crapo, J.D. (1994). Cell number and distribution in human and rat airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 613–624.
- Meyer, K.C., Nunley, D.R., Dauber, J.H., Iacono, A.T., Keenan, R.J., Cornwell, R.D., and Love, R.B. (2001). Neutrophils, unopposed neutrophil elastase, and alpha1-antiprotease defenses following human lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 97–102.
- Meyer K, Raghu G, Verleden G, et al. Diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome: an international ISHLT/ATS/ERS consensus guideline statement. Submitted.
- Milne, D.S., Gascoigne, A.D., Wilkes, J., Sviland, L., Ashcroft, T., Malcolm, A.J., and Corris, P.A. (1994). MHC class II and ICAM-1 expression and lymphocyte subsets in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. *Transplantation* 57, 1762–1766.
- Miyazono, K. (2000). Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7), 1101–1109.
- Mizuno, S., Kurosawa, T., Matsumoto, K., Mizuno-Horikawa, Y., Okamoto, M., and Nakamura, T. (1998). Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J. Clin. Invest.* 101, 1827–1834.
- Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., and Larue, L. (2001). IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20, 4942–4950.
- Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PloS One* 3, e3331.
- Mullol, J., Baraniuk, J.N., Logun, C., Benfield, T., Picado, C., and Shelhamer, J.H. (1996). Endothelin-1 induces GM-CSF, IL-6 and IL-8 but not G-CSF release from a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). *Neuropeptides* 30, 551–556.
- Myerburg, M.M., Latoche, J.D., McKenna, E.E., Stabile, L.P., Siegfried, J.S., Feghali-Bostwick, C.A., and Pilewski, J.M. (2007). Hepatocyte growth factor and other fibroblast secretions modulate the phenotype of human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L1352–1360.
- Nadeau, K.C., Azuma, H., and Tilney, N.L. (1995). Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8729–8733.

- Nakajima, J., Poindexter, N.J., Hillemeier, P.B., Trulock, E.P., Cooper, J.D., Patterson, G.A., Mohanakumar, T., and Sundaresan, R.S. (1999). Cytotoxic T lymphocytes directed against donor HLA class I antigens on airway epithelial cells are present in bronchoalveolar lavage fluid from lung transplant recipients during acute rejection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 117, 565–571.
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., and Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat. Rec.* 258, 119–127.
- Nakamura, T., Nakanishi, T., Haruta, T., Shirasaka, Y., Keogh, J.P., and Tamai, I. (2010). Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption. *Mol. Pharm.* 7, 187–195.
- Nakashima, S., Qian, Z., Rahimi, S., Wasowska, B.A., and Baldwin, W.M., 3rd (2002). Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 4620–4627.
- Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., and Hay, E.D. (2005). Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179, 11–23.
- Nawshad, A., Medici, D., Liu, C.-C., and Hay, E.D. (2007). TGFbeta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J. Cell Sci.* 120, 1646–1653.
- Neuringer, I.P., Mannon, R.B., Coffman, T.M., Parsons, M., Burns, K., Yankaskas, J.R., and Aris, R.M. (1998). Immune cells in a mouse airway model of obliterative bronchiolitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 379–386.
- Neuringer, I.P., Walsh, S.P., Mannon, R.B., Gabriel, S., and Aris, R.M. (2000). Enhanced T cell cytokine gene expression in mouse airway obliterative bronchiolitis. *Transplantation* 69, 399–405.
- Neurohr, C., Huppmann, P., Leuchte, H., Schwaiblmair, M., Bittmann, I., Jaeger, G., Hatz, R., Frey, L., Uberfuhr, P., Reichart, B., et al. (2005). Human herpesvirus 6 in bronchoalveolar lavage fluid after lung transplantation: a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome? *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 2982–2991.
- Neurohr, C., Huppmann, P., Samweber, B., Leuschner, S., Zimmermann, G., Leuchte, H., Baumgartner, R., Hatz, R., Frey, L., Ueberfuhr, P., et al. (2009). Prognostic value of bronchoalveolar lavage neutrophilia in stable lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 28, 468–474.
- Nicod, L.P. (2006). Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 444–449.
- Noah, T.L., Yankaskas, J.R., Carson, J.L., Gambling, T.M., Cazares, L.H., McKinnon, K.P., and

Devlin, R.B. (1995). Tight junctions and mucin mRNA in BEAS-2B cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31, 738–740.

Nolan-Stevaux, O., Lau, J., Truitt, M.L., Chu, G.C., Hebrok, M., Fernández-Zapico, M.E., and Hanahan, D. (2009). GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* 23, 24–36.

Norbury, C.C., Chambers, B.J., Prescott, A.R., Ljunggren, H.G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 280–288.

Nord, M., Schubert, K., Cassel, T.N., Andersson, O., and Riise, G.C. (2002). Decreased serum and bronchoalveolar lavage levels of Clara cell secretory protein (CC16) is associated with bronchiolitis obliterans syndrome and airway neutrophilia in lung transplant recipients. *Transplantation* 73, 1264–1269.

Okazaki, M., Krupnick, A.S., Kornfeld, C.G., Lai, J.M., Ritter, J.H., Richardson, S.B., Huang, H.J., Das, N.A., Patterson, G.A., Gelman, A.E., et al. (2007a). A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 1672–1679.

Okazaki, M., Gelman, A.E., Tietjens, J.R., Ibricevic, A., Kornfeld, C.G., Huang, H.J., Richardson, S.B., Lai, J., Garbow, J.R., Patterson, G.A., et al. (2007b). Maintenance of airway epithelium in acutely rejected orthotopic vascularized mouse lung transplants. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 625–630.

Okuma, T., Terasaki, Y., Kaikita, K., Kobayashi, H., Kuziel, W.A., Kawasuji, M., and Takeya, M. (2004). C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 204, 594–604.

Oppenheim, J.J., and Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 359–365.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603–1609.

Pain, M., Bermudez, O., Lacoste, P., Royer, P.-J., Botturi, K., Tissot, A., Brouard, S., Eickelberg, O., and Magnan, A. (2014). Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 23, 118–130.

Palmer, S.M., Davis, R.D., Hadjiliadis, D., Hertz, M.I., Howell, D.N., Ward, F.E., Savik, K., and Reinsmoen, N.L. (2002). Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 74, 799–804.

Palmer, S.M., Burch, L.H., Trindade, A.J., Davis, R.D., Herczyk, W.F., Reinsmoen, N.L., and

- Schwartz, D.A. (2005). Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplant. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 780–785.
- Palmer, S.M., Klimecki, W., Yu, L., Reinsmoen, N.L., Snyder, L.D., Ganous, T.M., Burch, L., and Schwartz, D.A. (2007). Genetic regulation of rejection and survival following human lung transplantation by the innate immune receptor CD14. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *7*, 693–699.
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., and Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 7370–7377.
- Park, J.S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Sohn, J.-W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., et al. (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C917–924.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* *278*, 21113–21123.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* *112*, 535–548.
- Perrone, L.A., Plowden, J.K., García-Sastre, A., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2008). H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog.* *4*, e1000115.
- Pietarinen-Runtti, P., Raivio, K.O., Saksela, M., Asikainen, T.M., and Kinnula, V.L. (1998). Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 286–292.
- Pollock, K., Albares, L., Wendt, C., and Hubel, A. (2013). Isolation of fibroblasts and epithelial cells in bronchoalveolar lavage (BAL). *Exp. Lung Res.* *39*, 146–154.
- Pongracz, J.E., and Stockley, R.A. (2006). Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir. Res.* *7*, 15.
- Pouton, C.W., Lucas, P., Thomas, B.J., Uduehi, A.N., Milroy, D.A., and Moss, S.H. (1998). Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *53*, 289–299.
- Prekker, M.E., Nath, D.S., Walker, A.R., Johnson, A.C., Hertz, M.I., Herrington, C.S., Radosevich, D.M., and Dahlberg, P.S. (2006). Validation of the proposed International Society for Heart and Lung Transplantation grading system for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *25*, 371–378.

Prop J, Nieuwenhuis P, Wildevuur CRH: Technique of orthotopic unilateral lung transplantation in the rat. *Eur Surg Res* 1980;12:80.

Rabinowich, H., Zeevi, A., Paradis, I.L., Yousem, S.A., Dauber, J.H., Kormos, R., Hardesty, R.L., Griffith, B.P., and Duquesnoy, R.J. (1990). Proliferative responses of bronchoalveolar lavage lymphocytes from heart-lung transplant patients. *Transplantation* 49, 115–121.

Radisky, D.C. (2005). Epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 118, 4325–4326.

Räisänen-Sokolowski, A., Glysing-Jensen, T., and Russell, M.E. (1998). Leukocyte-suppressing influences of interleukin (IL)-10 in cardiac allografts: insights from IL-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* 153, 1491–1500.

Ramirez, A.M., Shen, Z., Ritzenthaler, J.D., and Roman, J. (2006). Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: tgf-beta signaling through smad3-dependent and -independent pathways. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 6, 2080–2088.

Rastaldi, M.P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Strutz, F., Müller, G.A., Colasanti, G., and D'Amico, G. (2002). Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* 62, 137–146.

Reams, B.D., Musselwhite, L.W., Zaas, D.W., Steele, M.P., Garantziotis, S., Eu, P.C., Snyder, L.D., Curl, J., Lin, S.S., Davis, R.D., et al. (2007). Alemtuzumab in the treatment of refractory acute rejection and bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 2802–2808.

Reid, D., Snell, G., Ward, C., Krishnaswamy, R., Ward, R., Zheng, L., Williams, T., and Walters, H. (2001). Iron overload and nitric oxide-derived oxidative stress following lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 20, 840–849.

Reitz, B.A., Bieber, C.P., Raney, A.A., Pennock, J.L., Jamieson, S.W., Oyer, P.E., and Stinson, E.B. (1981). Orthotopic heart and combined heart and lung transplantation with cyclosporin-A immune suppression. *Transplant. Proc.* 13, 393–396.

Reynaud-Gaubert, M., Thomas, P., Badier, M., Cau, P., Giudicelli, R., and Fuentes, P. (2000). Early detection of airway involvement in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. Functional and bronchoalveolar lavage cell findings. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1924–1929.

Reynaud-Gaubert, M., Marin, V., Thirion, X., Farnarier, C., Thomas, P., Badier, M., Bongrand, P., Giudicelli, R., and Fuentes, P. (2002a). Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 21, 721–730.

Reynaud-Gaubert, M., Marin, V., Thirion, X., Farnarier, C., Thomas, P., Badier, M., Bongrand, P., Giudicelli, R., and Fuentes, P. (2002b). Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 21, 721–730.

- Reznik, S.I., Jaramillo, A., SivaSai, K.S., Womer, K.L., Sayegh, M.H., Trulock, E.P., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2001). Indirect allorecognition of mismatched donor HLA class II peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. 1*, 228–235.
- Riise, G.C., Williams, A., Kjellström, C., Schersten, H., Andersson, B.A., and Kelly, F.J. (1998). Bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients is associated with increased neutrophil activity and decreased antioxidant status in the lung. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol. 12*, 82–88.
- Riise, G.C., Andersson, B.A., Kjellström, C., Martensson, G., Nilsson, F.N., Ryd, W., and Scherstén, H. (1999). Persistent high BAL fluid granulocyte activation marker levels as early indicators of bronchiolitis obliterans after lung transplant. *Eur. Respir. J. 14*, 1123–1130.
- Robertson, H., Ali, S., McDonnell, B.J., Burt, A.D., and Kirby, J.A. (2004). Chronic renal allograft dysfunction: the role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN 15*, 390–397.
- Rocha, P.N., Plumb, T.J., Crowley, S.D., and Coffman, T.M. (2003). Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol. Rev. 196*, 51–64.
- Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell, S.H., and Hogan, B.L.M. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106*, 12771–12775.
- Rokavec, M., Oner, M.G., Li, H., Jackstadt, R., Jiang, L., Lodygin, D., Kaller, M., Horst, D., Ziegler, P.K., Schwitalla, S., et al. (2014). IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Invest. 124*, 1853–1867.
- Romaniuk, A., Prop, J., Petersen, A.H., Wildevuur, C.R., and Nieuwenhuis, P. (1987). Expression of class II major histocompatibility complex antigens by bronchial epithelium in rat lung allografts. *Transplantation 44*, 209–214.
- Ropponen, J.O., Syrjälä, S.O., Krebs, R., Nykänen, A., Tikkanen, J.M., and Lemström, K.B. (2011). Innate and adaptive immune responses in obliterative airway disease in rat tracheal allografts. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. 30*, 707–716.
- Ross, D.J., Marchevsky, A., Kramer, M., and Kass, R.M. (1997). “Refractoriness” of airflow obstruction associated with isolated lymphocytic bronchiolitis/bronchitis in pulmonary allografts. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. 16*, 832–838.
- Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Mühlfeld, C., and Gehr, P. (2008). In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 4*, 1075–1089.
- Rothen-Rutishauser, B.M., Kiama, S.G., and Gehr, P. (2005). A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 32*,

281–289.

Röttschke, O., Falk, K., Wallny, H.J., Faath, S., and Rammensee, H.G. (1990). Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. *Science* 249, 283–287.

Rumbley, C.A., Silver, S.J., and Phillips, S.M. (2001). Dependence of murine obstructive airway disease on CD40 ligand. *Transplantation* 72, 1616–1625.

Runswick, S., Mitchell, T., Davies, P., Robinson, C., and Garrod, D.R. (2007). Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirol. Carlton Vic* 12, 834–842.

Russell, M.E., Wallace, A.F., Hancock, W.W., Sayegh, M.H., Adams, D.H., Sibinga, N.E., Wyner, L.R., and Karnovsky, M.J. (1995). Upregulation of cytokines associated with macrophage activation in the Lewis-to-F344 rat transplantation model of chronic cardiac rejection. *Transplantation* 59, 572–578.

Ruttens, D., Wauters, E., Kiciński, M., Verleden, S.E., Vandermeulen, E., Vos, R., Van Raemdonck, D.E., Nawrot, T.S., Lambrechts, D., Verleden, G.M., et al. (2013). Genetic variation in interleukin-17 receptor A is functionally associated with chronic rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 1233–1240.

Saggar, R., Ross, D.J., Saggar, R., Zisman, D.A., Gregson, A., Lynch, J.P., 3rd, Keane, M.P., Weigt, S.S., Ardehali, A., Kubak, B., et al. (2008). Pulmonary hypertension associated with lung transplantation obliterative bronchiolitis and vascular remodeling of the allograft. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8, 1921–1930.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531–562.

Salminen, U.-S., Maasilta, P.K., Harjula, A.L.J., Romanska, H.M., Bishop, A.E., and Polak, J.M. (2002). Nitric oxide in the development of obliterative bronchiolitis in a heterotopic pig model. *Transplantation* 73, 1724–1729.

San Segundo, D., Ballesteros, M.Á., Naranjo, S., Zurbano, F., Miñambres, E., and López-Hoyos, M. (2013). Increased numbers of circulating CD8 effector memory T cells before transplantation enhance the risk of acute rejection in lung transplant recipients. *PLoS One* 8, e80601.

Sato, M., Keshavjee, S., and Liu, M. (2009). Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 1981–1987.

Sato, M., Waddell, T.K., Wagnetz, U., Roberts, H.C., Hwang, D.M., Haroon, A., Wagnetz, D., Chaparro, C., Singer, L.G., Hutcheon, M.A., et al. (2011). Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 30, 735–742.

Sayegh, M.H., and Turka, L.A. (1998). The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 338, 1813–1821.

- Schamberger, A.C., Mise, N., Jia, J., Genoyer, E., Yildirim, A.Ö., Meiners, S., and Eickelberg, O. (2013). Cigarette Smoke-Induced Disruption of Bronchial Epithelial Tight Junctions is Prevented by Transforming Growth Factor-Beta. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*
- Schmid, R.A., Kwong, K., Boasquevisque, C.H., Wick, M., Patterson, G.A., and Sundt, T.M., 3rd (1997). A chronic large animal model of lung allograft rejection. *Transplant. Proc.* 29, 1521.
- Scholma, J., Slebos, D.J., Boezen, H.M., van den Berg, J.W., van der Bij, W., de Boer, W.J., Koëter, G.H., Timens, W., Kauffman, H.F., and Postma, D.S. (2000). Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 2221–2225.
- Sharples, L.D., Tamm, M., McNeil, K., Higenbottam, T.W., Stewart, S., and Wallwork, J. (1996). Development of bronchiolitis obliterans syndrome in recipients of heart-lung transplantation--early risk factors. *Transplantation* 61, 560–566.
- Sharples, L.D., McNeil, K., Stewart, S., and Wallwork, J. (2002). Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 21, 271–281.
- Sherman, L.A., and Chattopadhyay, S. (1993). The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 385–402.
- Shevach, E.M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 389–400.
- Shin, S.-Y., Rath, O., Zebisch, A., Choo, S.-M., Kolch, W., and Cho, K.-H. (2010). Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 70, 6715–6724.
- Shirwan, H. (1999). Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 68, 715–726.
- SivaSai, K.S., Smith, M.A., Poindexter, N.J., Sundaresan, S.R., Trulock, E.P., Lynch, J.P., Cooper, J.D., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (1999). Indirect recognition of donor HLA class I peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 67, 1094–1098.
- Slattery, C., Campbell, E., McMorrow, T., and Ryan, M.P. (2005). Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Pathol.* 167, 395–407.
- Slebos, D.-J., Scholma, J., Boezen, H.M., Koëter, G.H., van der Bij, W., Postma, D.S., and Kauffman, H.F. (2002). Longitudinal profile of bronchoalveolar lavage cell characteristics in patients with a good outcome after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 501–507.
- Slebos, D.-J., Postma, D.S., Koëter, G.H., van der Bij, W., Boezen, M., and Kauffman, H.F. (2004). Bronchoalveolar lavage fluid characteristics in acute and chronic lung transplant rejection. *J. Heart*

Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. 23, 532–540.

Smith, B.T. (1977). Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 285–293.

Smith, C.R., Jaramillo, A., Duffy, B.F., and Mohanakumar, T. (2000a). Airway epithelial cell damage mediated by antigen-specific T cells: implications in lung allograft rejection. *Hum. Immunol.* 61, 985–992.

Smith, C.R., Jaramillo, A., Duffy, B.F., and Mohanakumar, T. (2000b). Airway epithelial cell damage mediated by antigen-specific T cells: implications in lung allograft rejection. *Hum. Immunol.* 61, 985–992.

Smith, G.N., Mickler, E.A., Payne, K.K., Lee, J., Duncan, M., Reynolds, J., Foresman, B., and Wilkes, D.S. (2007a). Lung transplant metalloproteinase levels are elevated prior to bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant.* 7, 1856–1861.

Smith, G.N., Jr, Mickler, E.A., Payne, K.K., Lee, J., Duncan, M., Reynolds, J., Foresman, B., and Wilkes, D.S. (2007b). Lung transplant metalloproteinase levels are elevated prior to bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 1856–1861.

Smith, M.A., Sundaresan, S., Mohanakumar, T., Trulock, E.P., Lynch, J.P., Phelan, D.L., Cooper, J.D., and Patterson, G.A. (1998). Effect of development of antibodies to HLA and cytomegalovirus mismatch on lung transplantation survival and development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 116, 812–820.

Snell, G.I., Ward, C., Wilson, J.W., Orsida, B., Williams, T.J., and Walters, E.H. (1997). Immunopathological changes in the airways of stable lung transplant recipients. *Thorax* 52, 322–328.

Sridurongrit, S., Larsson, J., Schwartz, R., Ruiz-Lozano, P., and Kaartinen, V. (2008). Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Dev. Biol.* 322, 208–218.

Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., and Strieter, R.M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 9912–9918.

Steerenberg, P.A., Zonnenberg, J.A., Dormans, J.A., Joon, P.N., Wouters, I.M., van Bree, L., Scheepers, P.T., and Van Loveren, H. (1998). Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro. *Exp. Lung Res.* 24, 85–100.

Stern, M., Caplen, N.J., Browning, J.E., Griesenbach, U., Sorgi, F., Huang, L., Gruenert, D.C., Marriot, C., Crystal, R.G., Geddes, D.M., et al. (1998). The effect of mucolytic agents on gene transfer across a CF sputum barrier in vitro. *Gene Ther.* 5, 91–98.

Stewart, S., Fishbein, M.C., Snell, G.I., Berry, G.J., Boehler, A., Burke, M.M., Glanville, A., Gould, F.K., Magro, C., Marboe, C.C., et al. (2007). Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ.*

Int. Soc. Heart Transplant. *26*, 1229–1242.

Strutz, F. (2009). Pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in chronic allograft dysfunction. *Clin. Transplant. 23 Suppl 21*, 26–32.

Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F.N., Yang, C.-Q., Kalluri, R., Müller, G.A., and Neilson, E.G. (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int. 61*, 1714–1728.

Subramanian, G., Schwarz, R.E., Higgins, L., McEnroe, G., Chakravarty, S., Dugar, S., and Reiss, M. (2004). Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype¹. *Cancer Res. 64*, 5200–5211.

Suga, M., Iyonaga, K., Okamoto, T., Gushima, Y., Miyakawa, H., Akaike, T., and Ando, M. (2000). Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162*, 1949–1956.

Sumpter, T.L., and Wilkes, D.S. (2004). Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 286*, L1129–L1139.

Sun, W., Wu, R., and Last, J.A. (1995). Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology 100*, 163–174.

Swanson, S.J., Mentzer, S.J., Reilly, J.J., Bueno, R., Lukanich, J.M., Jaklitsch, M.T., Kobzik, L., Ingenito, E.P., Fuhlbrigge, A., Donovan, C., et al. (2000). Surveillance transbronchial lung biopsies: implication for survival after lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 119*, 27–37.

Taghavi, S., Krenn, K., Jaksch, P., Klepetko, W., and Aharinejad, S. (2005). Broncho-alveolar lavage matrix metalloproteases as a sensitive measure of bronchiolitis obliterans. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. 5*, 1548–1552.

Tamm, M., Aboyou, C.L., Chhajed, P.N., Rainer, S., Malouf, M.A., and Glanville, A.R. (2004). Treated cytomegalovirus pneumonia is not associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170*, 1120–1123.

Tan, C., Liu, Y., Li, W., Deng, F., Liu, X., Wang, X., Gui, Y., Qin, L., Hu, C., and Chen, L. (2014). Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima-media thickness. *Atherosclerosis 232*, 199–203.

Tanimizu, N., and Miyajima, A. (2007). Molecular mechanism of liver development and regeneration. *Int. Rev. Cytol. 259*, 1–48.

Taub, D.D., Proost, P., Murphy, W.J., Anver, M., Longo, D.L., van Damme, J., and Oppenheim, J.J. (1995). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest. 95*, 1370–1376.

- Thabut, G., Mal, H., Cerrina, J., Dartevelle, P., Dromer, C., Velly, J.-F., Stern, M., Loirat, P., Lesèche, G., Bertocchi, M., et al. (2005). Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 786–791.
- Thannickal, V.J., and Horowitz, J.C. (2006). Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* *3*, 350–356.
- Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., et al. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* *382*, 171–174.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 442–454.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 740–746.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 131–142.
- Thuault, S., Valcourt, U., Petersen, M., Manfioletti, G., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2006). Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* *174*, 175–183.
- Timmerman, L.A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J.M., Díez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J.C., et al. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* *18*, 99–115.
- Tiriveedhi, V., Gautam, B., Sarma, N.J., Askar, M., Budev, M., Aloush, A., Hachem, R., Trulock, E., Myers, B., Patterson, A.G., et al. (2013). Pre-transplant antibodies to α 1 tubulin and collagen-V in lung transplantation: clinical correlations. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *32*, 807–814.
- Tobian, A.A.R., Harding, C.V., and Canaday, D.H. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 5209–5214.
- Toda, A., and Piccirillo, C.A. (2006). Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 458–470.
- Todd, J.L., and Palmer, S.M. (2011). Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation. *Chest* *140*, 502–508.
- Todd, J.L., Wang, X., Sugimoto, S., Kennedy, V.E., Zhang, H.L., Pavlisko, E.N., Kelly, F.L., Huang, H., Kreisel, D., Palmer, S.M., et al. (2014). Hyaluronan Contributes to Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Stimulates Lung Allograft Rejection through Activation of Innate Immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*

Toews GB. Impact of bacterial infections on airway diseases. *Eur Resp Rev.* 2005;14:62–68

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.

Torii, K., Iida, K., Miyazaki, Y., Saga, S., Kondoh, Y., Taniguchi, H., Taki, F., Takagi, K., Matsuyama, M., and Suzuki, R. (1997). Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 43–46.

Trello, C.A., Williams, D.A., Keller, C.A., Crim, C., Webster, R.O., and Ohar, J.A. (1997). Increased gelatinolytic activity in bronchoalveolar lavage fluid in stable lung transplant recipients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1978–1986.

Trulock, E.P., Christie, J.D., Edwards, L.B., Boucek, M.M., Aurora, P., Taylor, D.O., Dobbels, F., Rahmel, A.O., Keck, B.M., and Hertz, M.I. (2007). Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26, 782–795.

Tsan, M.-F., and Gao, B. (2009). Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.* 85, 905–910.

Tsuruta, D., Hopkinson, S.B., and Jones, J.C.R. (2003). Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 54, 122–134.

Upham, J.W., and Stick, S.M. (2006). Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Curr. Drug Targets* 7, 541–545.

Valentine, V.G., Robbins, R.C., Berry, G.J., Patel, H.R., Reichenspurner, H., Reitz, B.A., and Theodore, J. (1996). Actuarial survival of heart-lung and bilateral sequential lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 15, 371–383.

Valmori, D., Merlo, A., Souleimanian, N.E., Hesdorffer, C.S., and Ayyoub, M. (2005). A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J. Clin. Invest.* 115, 1953–1962.

Vanaudenaerde, B.M., Meyts, I., Vos, R., Geudens, N., De Wever, W., Verbeke, E.K., Van Raemdonck, D.E., Dupont, L.J., and Verleden, G.M. (2008a). A dichotomy in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation revealed by azithromycin therapy. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 32, 832–843.

Vanaudenaerde, B.M., Wuyts, W.A., Geudens, N., Nawrot, T.S., Vos, R., Dupont, L.J., Van Raemdonck, D.E., and Verleden, G.M. (2008b). Broncho-alveolar lavage fluid recovery correlates with airway neutrophilia in lung transplant patients. *Respir. Med.* 102, 339–347.

Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M., Zbinden, M., Mas, C., Gervaz, P., and Ruiz i Altaba, A. (2009). Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for

tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol. Med.* *1*, 338–351.

Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* *18*, 1131–1143.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179–189.

Verheggen, M.M., van Hal, P.T., Adriaansen-Soeting, P.W., Goense, B.J., Hoogsteden, H.C., Brinkmann, A.O., and Versnel, M.A. (1996). Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 beta, TNF-alpha and LPS. *Eur. Respir. J.* *9*, 2036–2043.

Verleden, S.E., Vos, R., Mertens, V., Willems-Widyastuti, A., De Vleeschauer, S.I., Dupont, L.J., Verleden, G.M., Van Raemdonck, D.E., and Vanaudenaerde, B.M. (2011). Heterogeneity of chronic lung allograft dysfunction: insights from protein expression in broncho alveolar lavage. *J. Heart Lung Transplant.* *30*, 667–673.

Verleden, S.E., Scheers, H., Nawrot, T.S., Vos, R., Fierens, F., Geenens, R., Yserbyt, J., Wauters, S., Verbeke, E.K., Nemery, B., et al. (2012). Lymphocytic bronchiolitis after lung transplantation is associated with daily changes in air pollution. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 1831–1838.

Verleden, S.E., Vos, R., Vandermeulen, E., Ruttens, D., Vaneylen, A., Dupont, L.J., Verbeke, E.K., Verleden, G.M., Van Raemdonck, D.E., and Vanaudenaerde, B.M. (2013). Involvement of interleukin-17 during lymphocytic bronchiolitis in lung transplant patients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *32*, 447–453.

Vilchez, R.A., McCurry, K., Dauber, J., Iacono, A., Keenan, R., Zeevi, A., Griffith, B., and Kusne, S. (2001). The epidemiology of parainfluenza virus infection in lung transplant recipients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *33*, 2004–2008.

Vittal, R., Fan, L., Greenspan, D.S., Mickler, E.A., Gopalakrishnan, B., Gu, H., Benson, H.L., Zhang, C., Burlingham, W., Cummings, O.W., et al. (2013). IL-17 induces type V collagen overexpression and EMT via TGF-β-dependent pathways in obliterative bronchiolitis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *304*, L401–414.

Vos, R., Vanaudenaerde, B.M., Geudens, N., Dupont, L.J., Van Raemdonck, D.E., and Verleden, G.M. (2008). Pseudomonas airway colonisation: risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation? *Eur. Respir. J.* *31*, 1037–1045.

Wallny, H.J., and Rammensee, H.G. (1990). Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* *343*, 275–278.

Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Tovey, E.R., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Stewart, G.A., Taylor, G.W., Garrod, D.R., Cannell, M.B., et al. (1999). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest.* *104*, 123–133.

- Wang, K., Pan, L., Che, X., Cui, D., and Li, C. (2010). Sonic Hedgehog/GLI₁ signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas. *Neurol. Res.* *32*, 975–980.
- Ward, C., Whitford, H., Snell, G., Bao, H., Zheng, L., Reid, D., Williams, T.J., and Walters, E.H. (2001). Bronchoalveolar lavage macrophage and lymphocyte phenotypes in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *20*, 1064–1074.
- Ward, C., Forrest, I.A., Murphy, D.M., Johnson, G.E., Robertson, H., Cawston, T.E., Fisher, A.J., Dark, J.H., Lordan, J.L., Kirby, J.A., et al. (2005). Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax* *60*, 865–871.
- Warrens, A.N., Lombardi, G., and Lechler, R.I. (1994). Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl. Immunol.* *2*, 103–107.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., and Baylin, S.B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* *422*, 313–317.
- Weigt, S.S., DerHovanessian, A., Wallace, W.D., Lynch, J.P., 3rd, and Belperio, J.A. (2013a). Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *34*, 336–351.
- Weigt, S.S., Copeland, C.A.F., Derhovanessian, A., Shino, M.Y., Davis, W.A., Snyder, L.D., Gregson, A.L., Saggar, R., Lynch, J.P., 3rd, Ross, D.J., et al. (2013b). Colonization with small conidia *Aspergillus* species is associated with bronchiolitis obliterans syndrome: a two-center validation study. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 919–927.
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J.-K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2004). The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2434–2439.
- Whyte, R.I., Rossi, S.J., Mulligan, M.S., Florn, R., Baker, L., Gupta, S., Martinez, F.J., and Lynch, J.P., 3rd (1997). Mycophenolate mofetil for obliterative bronchiolitis syndrome after lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* *64*, 945–948.
- Williams, A., Riise, G.C., Anderson, B.A., Kjellström, C., Scherstén, H., and Kelly, F.J. (1999). Compromised antioxidant status and persistent oxidative stress in lung transplant recipients. *Free Radic. Res.* *30*, 383–393.
- Willingham, S.B., Allen, I.C., Bergstralh, D.T., Brickey, W.J., Huang, M.T.-H., Taxman, D.J., Duncan, J.A., and Ting, J.P.-Y. (2009). NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 2008–2015.
- Willis, B.C., and Borok, Z. (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *293*, L525–534.

- Willis, B.C., and Borok, Z. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: potential role in obliterative bronchiolitis? *Thorax* *64*, 742–743.
- Wright, D.T., Fischer, B.M., Li, C., Rochelle, L.G., Akley, N.J., and Adler, K.B. (1996). Oxidant stress stimulates mucin secretion and PLC in airway epithelium via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* *271*, L854–861.
- Xie, L., Law, B.K., Chytil, A.M., Brown, K.A., Aakre, M.E., and Moses, H.L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* *N. Y. N* *6*, 603–610.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* *19*, 156–172.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* *14*, 818–829.
- Yingling, J.M., Blanchard, K.L., and Sawyer, J.S. (2004). Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 1011–1022.
- Young, L.R., Hadjiliadis, D., Davis, R.D., and Palmer, S.M. (2003). Lung transplantation exacerbates gastroesophageal reflux disease. *Chest* *124*, 1689–1693.
- Yousem, S.A. (1996). Significance of clinically silent untreated mild acute cellular rejection in lung allograft recipients. *Hum. Pathol.* *27*, 269–273.
- Yousem, S.A., Ray, L., Paradis, I.L., Dauber, J.A., and Griffith, B.P. (1990). Potential role of dendritic cells in bronchiolitis obliterans in heart-lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* *49*, 424–428.
- Zavadil, J., and Böttinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* *24*, 5764–5774.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Bottinger, E.P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6686–6691.
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., and Böttinger, E.P. (2004). Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* *23*, 1155–1165.
- Zeisberg, M., Bottiglio, C., Kumar, N., Maeshima, Y., Strutz, F., Müller, G.A., and Kalluri, R. (2003a). Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *285*, F1060–1067.
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. (2003b). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* *9*, 964–968.
- Zeyneloglu, H.B., Senturk, L.M., Seli, E., Oral, E., Olive, D.L., and Arici, A. (1998). The role of

monocyte chemotactic protein-1 in intraperitoneal adhesion formation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *13*, 1194–1199.

Zhang, X.L., Selbi, W., de la Motte, C., Hascall, V., and Phillips, A.O. (2005). Bone morphogenic protein-7 inhibits monocyte-stimulated TGF-beta1 generation in renal proximal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *16*, 79–89.

Zheng, L., Walters, E.H., Ward, C., Wang, N., Orsida, B., Whitford, H., Williams, T.J., Kotsimbos, T., and Snell, G.I. (2000). Airway neutrophilia in stable and bronchiolitis obliterans syndrome patients following lung transplantation. *Thorax* *55*, 53–59.

Zheng, L., Orsida, B., Whitford, H., Levvey, B., Ward, C., Walters, E.H., Williams, T.J., and Snell, G.I. (2005). Longitudinal comparisons of lymphocytes and subtypes between airway wall and bronchoalveolar lavage after human lung transplantation. *Transplantation* *80*, 185–192.

Un nouveau biomarqueur de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire: du modèle *in vitro* à la cohorte COLT

La principale complication à long terme de la transplantation pulmonaire est l'apparition d'une dysfonction chronique du greffon (CLAD), dont l'un des phénotypes est la bronchiolite oblitérante (BO), caractérisée par un remodelage bronchique excessif et une obstruction bronchique irréversible. Plusieurs études démontrent que les cellules épithéliales bronchiques (CEB) jouent un rôle dans ce processus, selon un mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Le but de notre étude est de 1) mettre en place un nouveau modèle *in vitro* entre les CEB et des LT activés et monocytes allogéniques 2) déterminer l'influence de ces cellules dans la TEM et 3) identifier de potentiels biomarqueurs de la BO. Lors de ces travaux, j'ai développé un modèle proche de la situation retrouvée chez les patients avec la sécrétion de CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL-10 dans les surnageants de culture. J'ai démontré que les cellules immunitaires, en synergie avec le TGF- β 1 accentuent la sécrétion de MMP-9 par l'épithélium. De plus, j'ai mis en évidence l'importance de l'axe CCL2/CCR2 dans cette sécrétion, proposant ainsi CCR2 comme cible thérapeutique potentielle. Enfin, j'ai montré la pertinence de la MMP-9 comme biomarqueur prédictif de la BO dans les plasmas de patients de la cohorte COLT. Ces travaux démontrent l'implication du contexte allogénique dans la TEM au cours du remodelage de l'épithélium, par la production de MMP-9 et suggèrent un lien entre CCL2 et MMP-9. La validation de ce biomarqueur prédictif permettra de mettre en place de nouvelles thérapeutiques afin d'anticiper l'apparition de la BO et de limiter son développement avant la dégradation des fonctions respiratoires.

Mots clés : Transplantation pulmonaire, Cellules épithéliales bronchiques, Transition épithélio-mésenchymateuse, MMP-9, dysfonction chronique du greffon, CCR2

A new biomarker of chronic lung allograft dysfunction : from an *in vitro* model to COLT cohort

Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is the major limitation to lung transplantation, with the most common phenotype being bronchiolitis obliterans (BO). BO is characterized by an irreversible airflow obstruction after an aberrant airway remodeling process. Bronchial epithelial cells (BEC) seem to play a key role in this process through epithelial to mesenchymal transition (EMT). The aim of this study was to 1) set up an *in vitro* model of allogeneic co-culture 2) test the impact of allogeneic context on EMT 3) identify new predictive biomarkers of BO.

I have developed a new *in vitro* co-culture model between BEC and allogeneic activated T cells and/or monocytes. Detection of CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL-10 in culture supernatants shows the relevance of the model. I have demonstrated that immune cells in synergy with TGF- β favors MMP-9 secretion. Furthermore, I have demonstrated the role of CCL2/CCR2 in this secretion, suggesting CCR2 as a potential therapeutic target. Finally, thanks to COLT cohort, I have validated plasma MMP-9 as a predictive biomarker of BO.

This new *in vitro* model suggests the implication of allogenicity in EMT during epithelium remodeling by the induction of MMP and propose a link between CCL2 and MMP-9. It appears as a relevant tool for biomarker discovery as presented here with MMP9. Plasma MMP-9 may be a valuable biomarker for BO.

Keywords : Lung Transplantation, Bronchial epithelial cells, epithelial to mesenchymal transition, MMP-9, chronic lung allograft dysfunction, CCR2