



HAL
open science

**Effets des immunosuppresseurs et des microparticules
membranaires sur la transition
épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales
bronchiques en culture 2D et 3D : intérêt en
transplantation pulmonaire**

Margaux Gracyasz

► **To cite this version:**

Margaux Gracyasz. Effets des immunosuppresseurs et des microparticules membranaires sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales bronchiques en culture 2D et 3D : intérêt en transplantation pulmonaire. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ070 . tel-03651865

HAL Id: tel-03651865

<https://theses.hal.science/tel-03651865>

Submitted on 26 Apr 2022

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

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

ÉCOLE DOCTORALE __ 414 __

UMR 1260 Nanomédecine Régénérative

THÈSE présentée par :

Margaux GRACYASZ

soutenue le : **03 décembre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Pharmacologie / Pharmacocinétique

**Effets des immunosuppresseurs et des
microparticules membranaires sur la
transition épithélio-mésenchymateuse des
cellules épithéliales bronchiques en culture
2D et 3D : intérêt en transplantation
pulmonaire**

THÈSE dirigée par :

M. KESSLER Romain
Mme. OLLAND Anne

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

Mme. MELONI Federica
M. MAGNAN Antoine

Professeur, Université de Pavie, Italie
Professeur, Université de Nantes

Examineur externe :

M. LE PAVEC Jérôme

Docteur, Université de Paris

Examineur interne :

Mme. CAILLARD OHLMANN Sophie

Professeur, Université de Strasbourg

A ma fille Lucie, ma plus belle réussite

A mon père, parti bien trop tôt

Remerciements

Merci chers membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse Pr. Romain Kessler, sans qui cette aventure n'aurait jamais été possible. Je vous remercie de la confiance que vous avez eue en moi, j'en serai à jamais reconnaissante. A vos côtés, j'ai beaucoup appris.

Je tiens à remercier ma co-directrice de thèse, Pr. Anne Olland qui a été à mes côtés et m'a soutenue. Merci de votre gentillesse.

Je remercie également Pr. Laurence Kessler et Pr. Florence Toti, deux professeures au top du top qui m'ont aidées à avancer, à me remettre toujours en question. J'ai énormément appris à vos côtés.

Je remercie également Fatiha El-Ghazouani pour ces 4 années. Eh oui, cette aventure a commencé en septembre 2017 lors de mon stage M2. Tu as été un soutien énorme, tu étais toujours là pour moi. Le laboratoire a vraiment beaucoup de chance de t'avoir professionnellement et humainement surtout.

Je remercie également Mohamad Kassem et Louise Chomel pour ces années passées ensemble. On a vécu des hauts et des bas, mais on s'en est toujours relevé ! On a vécu beaucoup de moments ensemble et je ne les oublierai pas.

Je remercie également mes homologues Noura Sbat et Hanine El Itawi, qui ont débuté leur doctorat en même temps que moi ainsi que Foteini Moschovaki-Filippidou. Nous étions une sacrée équipe. Je me souviendrais de beaucoup de moments passés ensemble, avec des fous rires et des moments moins joyeux.

Je remercie ma famille qui a toujours été là pour moi. Merci à ma mère et mon beau-père de m'avoir soutenue. Merci maman d'être là, d'être toi...la meilleure des mamans.

Merci mon chéri d'avoir toujours été à mes côtés, même à la fin quand le mot « thèse » te rendait fou. Merci à toi, ma fille, mon « petit rat », tu es venue sublimer ma vie au meilleur moment. Je vous aime

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Abréviations	11
État général de la transplantation pulmonaire	15
1. L'insuffisance pulmonaire.....	17
1.1. Définition	17
1.2. Pathologie et prévalence.....	19
2. La transplantation pulmonaire.....	19
2.1. État des lieux et prévalence de la transplantation pulmonaire	19
2.2. Le poumon : morphologie et structure	21
2.3. Principe de la transplantation pulmonaire	24
La dysfonction chronique du greffon : la Bronchiolite Oblitérante	28
1. Définition et prévalence	30
2. Diagnostic de la bronchiolite oblitérante	30
3. Classification de la bronchiolite oblitérante.....	32
4. Les cellules impliquées	32
5. Les facteurs de risque de la bronchiolite oblitérante.....	33
5.1 Facteur allo-immuns.....	33
5.2 Facteur non-allo-immuns	37
6. Traitements et leurs limites	39
6.1 Traitement préventif.....	39
6.2 La photophorèse extracorporelle.....	40
6.3 Les anticorps anti-lymphocytaires	40
6.4 La retransplantation.....	41
La transition épithélio-mésenchymateuse dans la bronchiolite oblitérante	42
1. Caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse	44
1.1 Type I	44
1.2 Type III.....	44
1.3 Type II.....	44
2. Mécanisme	46

2.1	Mécanismes cellulaires et moléculaires	46
2.2	Processus inflammatoire	48
3.	Voie intracellulaire impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse	50
3.1	Voie principale : voie du TGF-beta.....	50
3.2	Les autres voies de signalisations impliquées	52
3.3	Voie intracellulaire anti-fibrotique.....	54
4.	Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse	55
4.1	Marqueurs épithélieux.....	55
4.2	Marqueurs mésenchymateux.....	55
	L'impact des microparticules dans la bronchiolite oblitérante	56
1.	Origine.....	58
2.	Mécanisme de formation.....	58
3.	Les microparticules en transplantation : biomarqueurs/bioeffecteur	60
4.	Microparticule pro-inflammatoires	62
	Le double jeu des immunosuppresseurs.....	63
1.	Caractéristique et mécanisme des immunosuppresseurs.....	65
1.1	Inhibiteur des calcineurines.....	65
1.2	Agent antiprolifératif.....	65
1.3	Inhibiteur des mTOR.....	66
1.4	Corticoïdes	66
2.	Le Tacrolimus	68
2.1	Origine.....	68
2.2	Pharmacocinétique	68
2.3	Pharmacodynamie	70
2.4	Effets indésirables du TAC	70
3.	L'Évérolimus.....	71
3.1	Origine.....	71
3.2	Pharmacocinétique	71
3.3	Pharmacodynamie	73
3.4	Effets indésirables	73
	Intérêt des modèles pour l'étude de la bronchiolite oblitérante	75
1.	Modèle 2D.....	76
2.	L'intérêt du modèle 3D	76
2.1.	Définition	76

2.2. Le modèle 3D : sphéroïde/organoïde	78
2.3. Formation des sphéroïdes.....	79
2.4. Matériel et méthode de la formation 3D	79
2.5. Limite du modèle 3D.....	84
Hypothèses et objectifs.....	85
Hypothèses	86
Les objectifs	86
Partie 1 : Effet du Tacrolimus et Everolimus dans la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales bronchiques humaines.....	88
Contexte	89
Matériels et méthodes.....	90
Résultats	91
Conclusion.....	91
ARTICLE.....	92
Conclusion.....	124
Partie 2 : Mise en place d'un modèle 3D cellulaire	125
Introduction	126
Objectif.....	126
Matériels et méthodes.....	126
Culture cellulaire 2D de BEAS-2B	126
Développement du modèle 3D.....	127
Immunofluorescence	127
Résultats	128
Liaisons cellules-microbilles magnétiques.....	128
Culture de sphéroïdes	128
Analyse morphologique des sphéroïdes	128
Conclusion.....	129
Conclusion générale	135
Discussion / Perspective.....	140
Communications.....	145
Congrès SFT 2018.....	146
Résumé.....	165
Résumé en anglais.....	166

Liste des tableaux

Tableau 1: Évolution du nombre de greffe d'organes effectuées de 2011 à 2020 en France (Agence de Biomédecine)	18
Tableau 2: Caractéristique des receveurs au niveau mondial (Chambers, 2021)	18

Liste des figures

Figure 1: Spirométrie (Kharat, Hôpitaux Universitaire Genève, 2018)	16
Figure 2: Diagnostiques receveur sur les différentes continents (Chambers, 2021)	20
Figure 3: survie Kaplan-Meier (Chambers 2021)	20
Figure 4: Reconnaissance directe et indirecte des alloantigènes (Abbas, 2013).....	26
Figure 5: Flowchart de l'évolution des CLAD (Verleden, 2019)	29
Figure 6: Examen au microscope optique d'une bronchiolite en coupe transversale d'un poumon témoin indemne de bronchiolite oblitérante (gauche) et avec lésions de avancées (droite (Thèse du Dr. Renaud-Picard Benjamin)	29
Figure 7: Fonction des cellules Th1, Th2 et Th17 (Abbas, 2013).....	31
Figure 8: Mécanisme et histopathologie du rejet de greffe (Abbas, 2013)	34
Figure 9: Impact de l'ischémie reperfusion sur l'organe greffé, (Walter Gottlieb Land, 2016)	36
Figure 10: Mécanisme de l'ischémie-reperfusion lors d'une greffe (Gennai, 2014)	36
Figure 11: Les 3 type de TEM (Kalluri, 2009).....	43
Figure 12: TEM de type II au cours du remodelage bronchique.....	45
Figure 13: Facteurs de croissance impliqué dans la TEM (Stone, 2016).....	45
Figure 14: La TEM est médiée par HIF1 (Tam, 2020)	47
Figure 15: Voie de signalisation de TGF- β lors de l'inflammation pulmonaire dans la BO (Lan, 2011).....	49
Figure 16: Les voies de TGF- β impliquées dans la TEM (Amhadi, 2018).....	51
Figure 17: Mécanisme d'action du BMP7	53
Figure 18: Remodelage membranaire et émission de microparticules par des cellules soumises à un stress (Hugel, 2005).....	57
Figure 19: Transporteur des phospholipides membranaires (Coleman, 2013)	59
Figure 20: Microparticules (Bakouboula, 2011)	61
Figure 21: Représentation graphique de l'émission de MPs de monocytes humains après stimulation au LPS de <i>P. Aeruginosa</i> (Renaud-Picard, 2017)	61
Figure 22: Mécanismes des immunosuppresseurs (Walter Gottlieb Land, 2016)	64
Figure 23: Mode d'action du Tacrolimus	67
Figure 24: Mode d'action du TAC dans les cellules immunes et non immunes	69
Figure 25: Mécanisme de mTOR (Hasskarl, 2018)	72

Figure 26: Mécanisme de l'Everolimus	74
Figure 27: Différence entre la culture en monocouche et la formation de sphéroïde et d'organoïde (Sakalem, 2021).....	77
Figure 28: Formation d'une structure 3D par le système de goutte suspendue (Tostivint, 2017)	80
Figure 29: Formation de structure 3D par aimantation des cellules (Greiner©)	80
Figure 30: L'intérêt du système microfluidique dans l'étude des médicaments (Industrie Techno).....	82
Figure 31: Formation de structure 3D encapsulé d'un hydrogel	82

Abréviations

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
AKT	Protein kinase B (PKB)
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BO	Bronchiolite oblitérante
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CD	Cluster of differentiation
CD3	Cluster of differentiation 3
CD52	Cluster of differentiation 52
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
CLAD	Chronic lung allograft dysfunction
CSF	Colonie stimulating factor
CV	Capacité vitale
CXCL8	C-X-X motif ligand 8
DAPI	Diaminido phenylindol
DLCO	Capacité de diffusion du monoxyde de carbone
DPG	Dysfonction primaire du greffon
DSA	Donor specific antigen
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
EFR	Exploration fonctionnelle respiratoire
EnMT	Transition endothélio-mésenchymateuse
ERK	Extracellular signal regulated kinase
EVE	Évérolimus
FBS	Foetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor

FIO2	Fraction inspirée en oxygène
FKBP12	FK506-binding protein 12
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
FSP1	Ferroptosis suppressor protein 1
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3 beta
HGF	Hepatic growth factor
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
IFNγ	Interféron gamma
IGF1	Insulin growth factor
IL-1β	Interleukine 1- β
IL-2	Interleukine 2
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
IL-10	Interleukine 10
IL-12	Interleukine 12
IL-13	Interleukine 13
IL-15	Interleukine 15
IL-17	Interleukine 17
IL-23	Interleukine 23
IMC	Indice de masse corporelle
IP3	Inositol triphosphate
IRC	Insuffisance respiratoire chronique
IS	Immunosuppresseur
LAP	Latency-associated peptide
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTBP	Latent TGF- β binding protein
LTx	Lung transplantation
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDR1	Multi-drug resistance 1
miRNA	Micro acide ribonucléique

MMF	Mycophénolate mofétil
MMP2	Métalloprotéinase 2
MMP9	Métalloprotéinase 9
MPA	Mycophenolic acid
MPAG	Mycophenolic acid glucuronic
MPs	Microparticules
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
mTORC1	Mammalian target of Rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target og Rapamycin complex 2
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
NOS	Nitric oxide synthases
NR4a1	Nuclear Receptor 4a1
NTD	Nintédanib
OLD	Oxygénation de longue durée
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAO2	Pression partielle d'O2
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phosphatitylethanolamine
PEEP	Positive end expiratory pressure
PI2K	Phosphoinositide 2-kinase
PI3	Phosphoinositide 3
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLL	Poly-L-Lysine
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS	Phosphatitylinositol
PTLD	Post-transplantation lymphoproliferation disease
RAS	Restrictif allograft syndrome
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Shh	Sonic Hedgehog
SIP1	Smad interacting protein 1

siRNA	Silencing ARN
SIRT6	Sirtuine 6
SV40	Simien virus 40
TAC	Tacrolimus
TAK1	Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	Transforming growth factor β
Th1	Lymphocytes Thelper 1
Th2	Lymphocytes Thelper 2
Th17	Lymphocytes Thelper 17
TLR4	Toll like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
Treg	Lymphocyte T régulateur
TWEAK	Tumor necrosis factor-like weak inducer apoptosis
UV	Ultra-violet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEMS	Volume expiratoire maximal en 1 seconde

Chapitre 1 :

État général de la transplantation pulmonaire

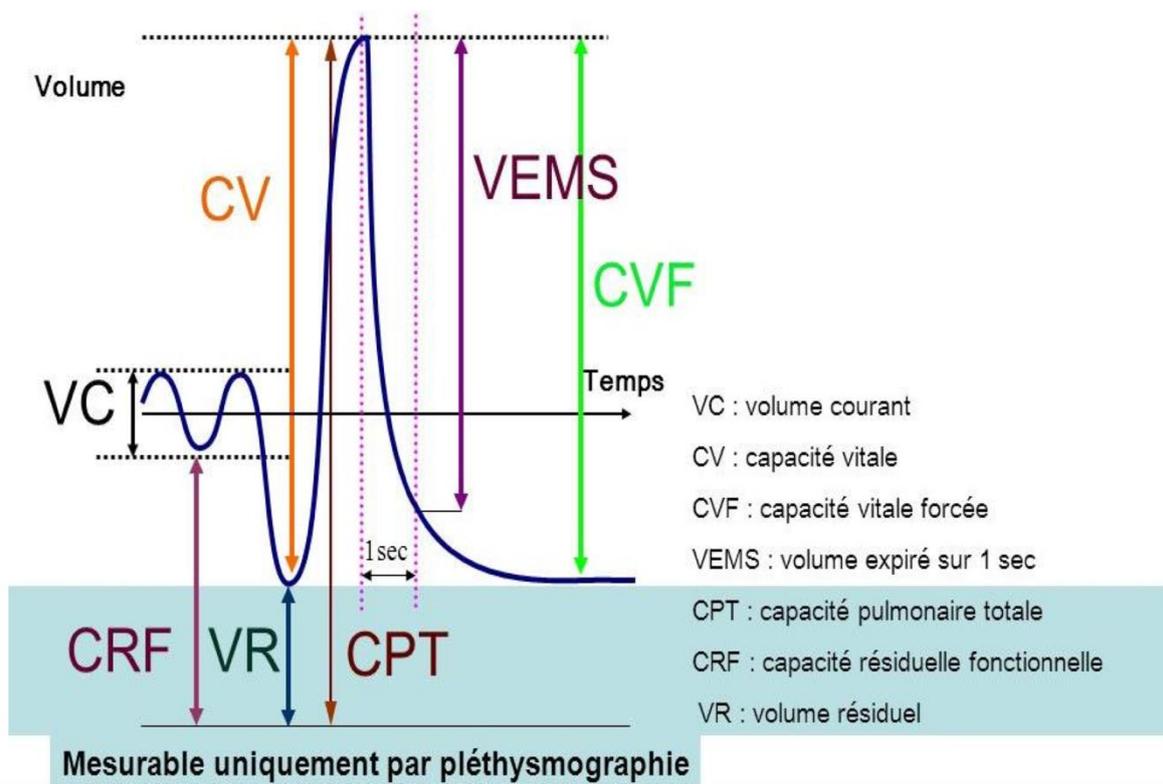


Figure 1: Spirométrie (Kharat, Hôpitaux Universitaire Genève, 2018)

1. L'insuffisance respiratoire chronique grave

1.1. Définition

Les maladies respiratoires sont actuellement la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde (Calvert, 2019). La transplantation pulmonaire (LTx) est à l'heure actuelle le seul traitement efficace permettant d'augmenter l'espérance de vie des patients en stade terminal d'insuffisance respiratoire chronique (IRC). L'IRC est défini par une incapacité d'assurer les échanges gazeux qui engendre une hypoxémie (Melhem, 2020). Au niveau clinique, cela se traduit par une dyspnée à l'effort, puis au repos ainsi que par une cyanose (Jacobs, 2020). Avec le temps, une insuffisance cardiaque droite peut se développer, complication directement liée à l'insuffisance respiratoire chronique : les signes cliniques en sont principalement les œdèmes des membres inférieurs (Berglund, 2020). L'IRC engendre également des troubles hématologiques tels que la polyglobulie (augmentation anormale de l'hémoglobine) ainsi que des troubles neurologiques sous forme de troubles de la concentration, du sommeil, de l'attention, une irritabilité ainsi qu'une baisse de la libido (Pison, 2004). Il existe plusieurs types d'IRC selon les caractéristiques des explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) permettant d'apprécier la capacité fonctionnelle du poumon en mesurant les volumes et les débits pulmonaires à travers le Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) et la capacité vitale (CV). Le VEMS est défini par le volume d'air expiré pendant 1 seconde lors d'une expiration forcée ; ce paramètre permet de caractériser la sévérité de maladies respiratoires. La CV représente le volume obtenu après inspiration et expiration maximales (Figure 1). Le rapport VEMS/CV permet de déterminer s'il y a obstruction pulmonaire ou non (Concilio).

Les IRC sont classées en 4 catégories différentes selon les EFR (Pedersen, 2015) :

- L'IRC obstructive : telle que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), définie par une chute du VEMS avec CV normale et un VEMS/CV bas (<70%)
- L'IRC restrictive : comme la fibrose pulmonaire. Le VEMS est normal avec une baisse de la CV, donc un rapport VEMS/CV normal ou augmenté
- L'IRC mixte : association d'une IRC obstructive et d'une IRC restrictive
- IRC par maladie cardiovasculaire : exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) normale avec un transfert du CO abaissé et une désaturation à l'effort ou une hypoxémie de repos.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Coeur	398	397	410	423	471	477	467	450	425	370
Coeur-poumons	12	20	11	13	8	13	6	9	9	8
Foie	1164 (14)	1161 (9)	1241 (13)	1280 (12)	1355 (15)	1322 (5)	1374 (18)	1325 (14)	1356 (19)	1128 (15)
Intestin	10	7	3	3	3	3	2	4		3
Pancréas	73	72	85	79	78	90	96	78	84	34
Poumon	312	322	299	327	345	371	378	373	384	283
Rein	2976 (302)	3044 (357)	3074 (401)	3232 (514)	3486 (547)	3615 (576)	3782 (611)	3567 (541)	3643 (510)	2595 (390)
Total	4945 (316)	5023 (366)	5123 (414)	5357 (526)	5746 (562)	5891 (581)	6105 (629)	5806 (555)	5901 (529)	4421 (405)

Tableau 1: Évolution du nombre de greffes d'organes effectuées de 2011 à 2020 en France (Agence de Biomédecine)

ARTICLE IN PRESS

Chambers et al. ISHLT Registry 38th Adult Lung Transplantation Report 3

Table 1 Recipient Characteristics by Era (Transplants: January 1992 – June 2018)

	Jan 1992-Dec 2000 (n = 11,796)	Jan 2001-Dec 2009 (n = 21,806)	Jan 2010-Jun 2018 (n = 33,891)	p-value
Geographic location:				
- Europe	3,751 (31.8%)	7,818 (35.9%)	12,414 (36.6%)	<0.0001
- North America	7,324 (62.1%)	12,545 (57.5%)	18,594 (54.9%)	<0.0001
- Other	721 (6.1%)	1,443 (6.6%)	2,883 (8.5%)	
Age (years)	50 (23 - 63)	54 (23 - 66)	57 (24 - 69)	
Male	51.9%	55.6%	58.0%	<0.0001
Weight (kg)	75.7 (53.5 - 101.6)	78.0 (54.0 - 106.1)	80.0 (54.4 - 108.9)	<0.0001
Height (cm)	174.0 (157.0 - 188.0)	174.0 (157.5 - 188.0)	174.0 (157.5 - 188.0)	0.0463
BMI (kg/m ²)	25.0 (19.1 - 32.4)	25.7 (19.3 - 33.7)	26.5 (19.6 - 34.6)	<0.0001
Blood type:				
- A	45.2%	43.3%	42.0%	<0.0001
- AB	5.2%	5.3%	5.8%	
- B	12.2%	13.1%	14.1%	
- O	37.4%	38.2%	38.1%	
PRA ≥ 20%	3.4%	6.2%	14.6%	<0.0001
PRA ≥ 80%	0.4%	0.7%	2.0%	<0.0001
CMV antibody positive	62.9%	59.5%	56.2%	<0.0001
EBV antibody positive	76.7% ^a	86.0%	90.5%	<0.0001
Hep B antibody positive	2.4% ^b	4.1%	4.8%	<0.0001
Hep C antibody positive	1.7% ^b	1.8%	1.8%	0.8656
Diabetes	6.1% ^b	15.2%	20.1%	<0.0001
History of malignancy	2.7% ^b	5.2%	7.9%	<0.0001
History of smoking	-	62.5% ^c	57.9%	<0.0001
Previous lung surgery	25.7% ^b	21.8%	15.0%	<0.0001
Ventilator use	2.5%	4.2%	6.5%	<0.0001
Hospitalized	9.2%	12.0%	21.7%	<0.0001
Bilirubin (mg/dl)	0.5 (0.2 - 1.3) ^b	0.5 (0.2 - 1.2)	0.5 (0.2 - 1.2)	<0.0001
Creatinine (mg/dl)	0.9 (0.5 - 1.4) ^b	0.8 (0.5 - 1.3)	0.8 (0.5 - 1.3)	<0.0001
GFR (ml/min/1.73 m ²) ^d	90.5 (50.8 - 154.1) ^b	93.5 (53.0 - 157.5)	97.9 (55.5 - 169.9)	<0.0001
PCW mean (mm Hg)	11.0 (4.0 - 21.0) ^b	10.0 (4.0 - 22.0)	10.0 (3.0 - 21.0)	<0.0001
PA mean (mm Hg)	25.0 (15.0 - 54.0) ^b	25.0 (14.0 - 49.0)	25.0 (14.0 - 49.0)	0.0095
PVR (Wood units)	2.7 (1.0 - 7.6) ^b	2.7 (1.0 - 7.3)	2.8 (1.1 - 7.9)	<0.0001
FEV1% predicted	23.0 (12.0 - 78.0)	29.0 (13.0 - 77.0)	35.0 (14.0 - 78.0)	<0.0001
FVC% predicted	48.0 (24.0 - 86.0)	47.0 (25.0 - 82.0)	46.0 (25.0 - 82.0)	<0.0001

BMI, body mass index; CVA, cerebrovascular accident; CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein Barr virus; GFR, glomerular filtration rate.

Summary statistics excluded transplants with missing data

Continuous factors are expressed as median (5th – 95th percentiles)

Comparisons for categorical variables were made using the chi-square statistic

Comparisons for continuous variables were made using the Wilcoxon test

^aBased on October 1999 – December 2000 transplants

^bBased on April 1994 – December 2000 transplants

^cBased on July 2004 – December 2009 transplants

^dGFR was estimated using the Cockcroft-Gault formula

Tableau 2: Caractéristiques des receveurs au niveau mondial (Chambers, 2021)

1.2.Pathologie et prévalence

En France, l'indication majeure pour une LTx est la BPCO (36%), suivie de la fibrose pulmonaire idiopathique (27%), de la mucoviscidose (8%), de l'hypertension pulmonaire (9%) et de la retransplantation (4%) (Agence de Biomédecine). Au niveau mondial, l'indication majeure est la fibrose pulmonaire idiopathique (32,4%), suivie de la BPCO (26,1%) et de la mucoviscidose (13,1%) (Verleden, 2020).

2. La transplantation pulmonaire

2.1.État des lieux et prévalence de la transplantation pulmonaire

En 2020, 31 LTx ont été réalisées à Strasbourg, 283 LTx en France et 4000 LTx dans le monde (Tableau 1) (Agence de Biomédecine) (Bos, 2020).

La première LTx sur l'Homme date de 1963. A cette époque, la survie d'un patient greffé était très faible. La première greffe pulmonaire a permis une survie du patient de 18 jours, cependant il est décédé d'une infection rénale (Mc Curry, 2019). Ce n'est qu'à partir des années 1980 que la transplantation en général a pu se développer grâce au tout 1^{er} IS : la cyclosporine A.

Le nombre de LTx cumulé dans le monde était de 11 000 en 1990, de 22 000 en 2000 et jusqu'à 34 000 en 2018. L'âge des patients a également évolué. On remarque que les patients sont plus âgés : actuellement la moyenne d'âge des patients greffés est de 57 ans (Chambers 2021) comparé à la moyenne d'âge des patients ayant plusieurs greffes d'organes qui est de 36 ans (Chambers, 2018). De plus, l'indice de masse corporelle de ces derniers est également en hausse : en 1990 le patient moyen pesait 75,7kg avec un IMC de 25kg/m² (Tableau 2). A l'heure actuelle, en France, le patient moyen pèse 80kg avec un IMC de 26,5kg/m² (Rapport de l'agence de Biomédecine).

La prévalence des anciens fumeurs a diminué de 62,5% en 2000 à 57,9% actuellement. En Europe, les indications de greffe restent inchangées avec le temps. Cependant, on remarque que sur le reste du globe, il y a une diminution des indications pour la mucoviscidose et une augmentation pour la fibrose pulmonaire idiopathique (Figure 2) (Chambers, 2021).

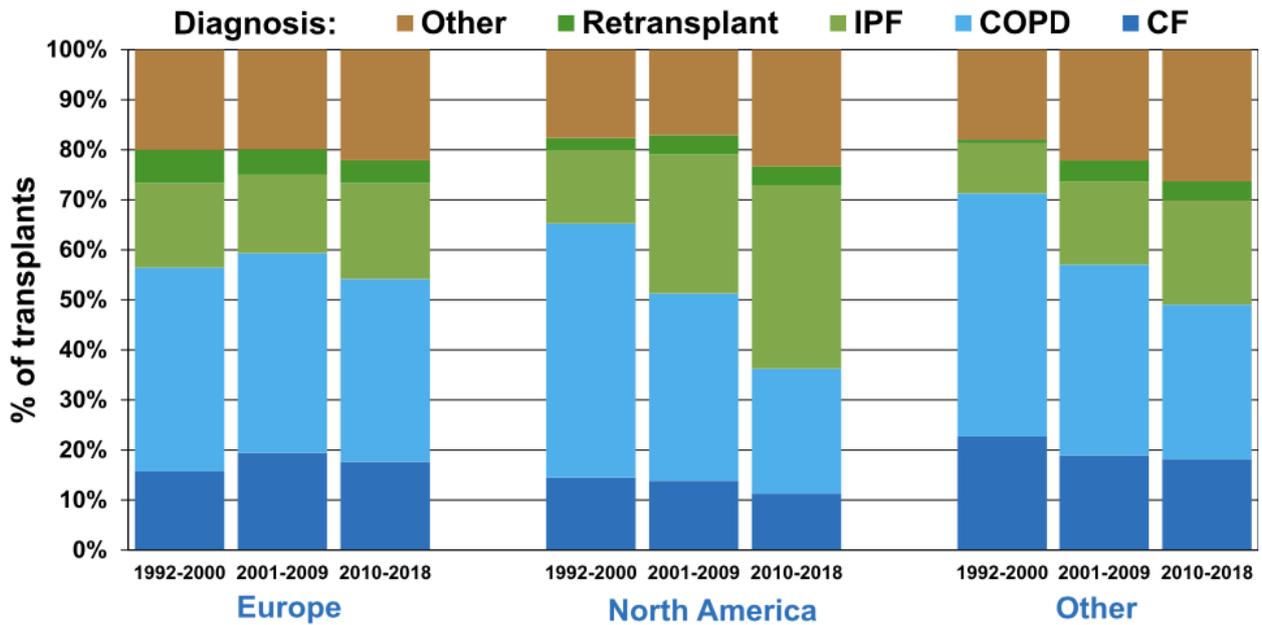


Figure 2: Indications de la greffe sur les différents continents (Chambers, 2021)

IPF: idiopathic pulmonary fibrosis. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. CF: cystic fibrosis

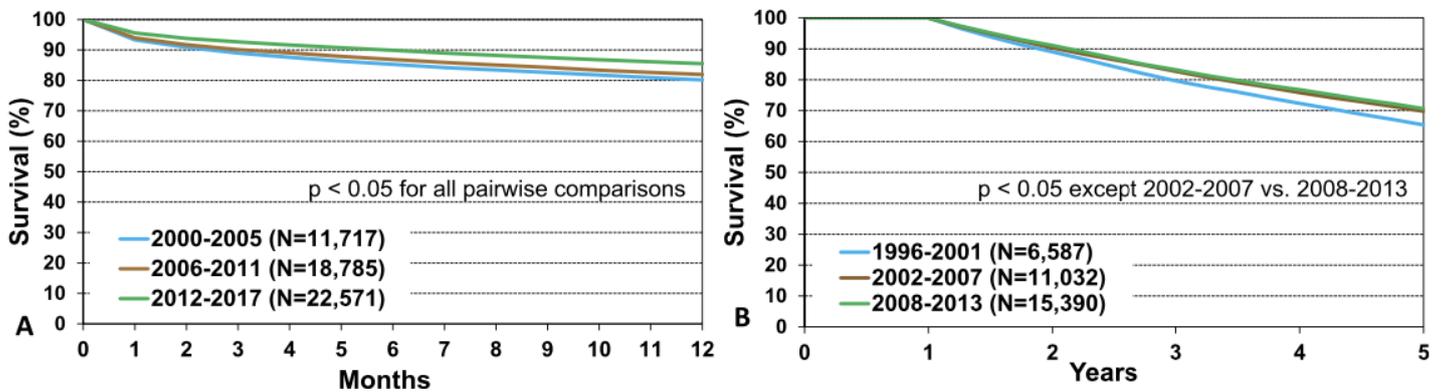


Figure 3: Survie après greffe pulmonaire (Chambers 2021)

(A) Survie à 12 mois (patients transplantés de janvier 2000 à juin 2017)

(B) Survie à 5 ans, si patient a survécu au moins la première année (patients transplantés de janvier 1996 à juin 2013)

La survie à un an s'est considérablement améliorée quel que soit l'âge ou l'indication de greffe du patient. Le résultat est similaire pour la survie à 5 ans avec une différence significative pour les patients de 18-59 ans (Chambers, 2021).

En France, le nombre de nouveaux candidats inscrits en liste d'attente a diminué de 30,5% en 2020 avec 321 nouveaux inscrits comparé à 2019. En revanche, le nombre de candidats restant sur liste d'attente au 1^{er} janvier 2021 est identique à l'année précédente. Après 1 an d'attente, les malades inscrits sur la liste d'attente de greffe pulmonaire entre 2015 et 2020 ont 85% de chance d'être greffés et 6% de risque de décéder en attente (Agence de Biomédecine).

Au niveau mondial, après 1 an d'attente, les patients sur liste d'attente entre 2015 et 2018 ont 87% de chance d'être greffés et 5% de risque de décéder (Verleden, 2020).

En France, la survie des patients ayant subi une LTx à 1 an, 5 ans, 10 ans et 15 ans est de 82%, 63%, 43% et 26% respectivement (Agence de biomédecine). Au niveau mondial la survie à 1 an et à 5 ans est de 80% et 61% respectivement (Figure 3), mais ce taux dépend également de l'indication de greffe. La médiane de survie de la mucoviscidose, BPCO et FPI est de 9,9 ans, 7,1 ans et 5,6 ans respectivement (Verleden, 2020).

2.2. Le poumon : morphologie et structure

i. Constitution du poumon

L'appareil respiratoire est caractérisé par les voies aériennes supérieures composées des voies nasales, du larynx et de la trachée et par les voies aériennes profondes composées des bronches, bronchioles et alvéoles, ce qui constitue le poumon (Murray, 2010)

ii. Histologie

Les voies aériennes sont composées de 3 tuniques concentriques : la muqueuse, la tunique moyenne et l'adventice (Carillo, 2004).

La tunique moyenne

La tunique moyenne est composée de fibres, de muscle lisse et de cartilage, cette tunique maintient les voies aériennes ouvertes

La muqueuse

La muqueuse est composée d'un épithélium et du chorion.

L'épithélium est composé de cellules épithéliales plus ou moins ciliées ainsi que des cellules en brosse et de cellules de Clara.

Les cellules en brosse sont des cellules possédant des microvillosités apicales (et non des cils). Les cellules de Clara sont des cellules prismatiques sans cils ni microvillosités présentes au niveau de la zone de transition et sécrètent les protéines du surfactant alvéolaire. Au fil de l'arbre bronchique, l'épithélium prismatique pseudo-stratifié devient prismatique simple puis cubique simple (Silverman, 1997).

On comprend donc bien que plus le calibre des voies diminue, plus l'épaisseur de l'épithélium diminue (Murray, 2010). De plus, au niveau des dernières générations de divisions, les cellules de Clara remplacent les cellules ciliées.

Le chorion pulmonaire est composé de cellules conjonctives tels que des fibroblastes ainsi que de cellules pro-inflammatoires tel que les mastocytes. Le chorion permet de garder l'intégrité de l'arbre bronchique (Carillo, 2004).

iii. Mécanismes muco-ciliaire

Pour éviter l'accumulation de poussière, de corps étrangers dans les alvéoles pulmonaires un mécanisme de clairance est en place, composé de mucus et de cils afin d'excréter les particules étrangères inhalées.

Le mucus

Le mucus, gel épais et visqueux, tapisse uniformément toutes les voies de conduction (bronches / bronchioles) et provient des glandes du chorion. Le mucus piège les particules, humidifie l'air inspiré et a un rôle protecteur des cellules épithéliales. Le mucus est composé d'eau (à 95%), de sels, de lipides et de protéines. Dans ce mucus, il y a des protéines antibactériennes inhibant la prolifération des bactéries : les lysozymes détruisent les peptidoglycanes de la paroi des GRAM +, les lactoferrines chélatent le fer pour bloquer leur prolifération.

La viscosité du mucus est directement liée aux liaisons de certaines protéines, les mucines. Les mucines forment des ponts disulfures afin d'augmenter la viscosité du gel.

Les cils

Le cil a des mouvements intrinsèques bien définis en trois phases : une phase de propulsion, ATP-dépendante où le cil se projette en avant en formant un mouvement circulaire, une phase de récupération où le cil revient à sa position de départ et une phase de repos par lequel le mécanisme du cil doit à nouveau se charger en ATP afin de propulser le cil.

iv. Les échanges gazeux

Les échanges gazeux se situent au niveau des alvéoles pulmonaires. Les alvéoles sont des évaginations terminales des canaux alvéolaires. Ces canaux sont des bronchioles respiratoires où les alvéoles forment une grappe. L'atrium ou sac alvéolaire est l'extrémité du canal alvéolaire. L'épithélium alvéolaire est un épithélium simple pavimenteux très fragile et très fin (environ 6 à 10µm d'épaisseur, ce qui représente le diamètre des hématies) (Murray, 1985).

Cet épithélium est composé de 2 types cellulaires : les pneumocytes 1 qui sont des cellules épithéliales alvéolaires très étalées, pavimenteuses, recouvrant 90% de la surface et les pneumocytes 2 qui sont des cellules cubiques, arrondies, enchâssées dans les pneumocytes 1. Le côté apical des pneumocytes 2 possède des microvillosités. Ces cellules sécrètent le corps lamellaire, granule de sécrétion du surfactant alvéolaire.

Au sein des alvéoles, 3 éléments majeurs sont présents : l'air, les cellules libres et le surfactant. Les cellules libres, mobiles dans l'alvéole sont composées de macrophages alvéolaires et de lymphocytes. Les macrophages représentent 2% des cellules pulmonaires et constituent la première ligne de défenses contre les pathogènes. Ce sont des cellules libres que l'on récupère lors de lavage broncho-alvéolaire afin d'analyser l'état général et infectieux du patient.

Le surfactant, sécrété par les pneumocytes 2, forme une structure en réseau appelé myéline tubulaire (Carillo, 2004).

v. Les voies sanguines et lymphatiques

La pression artérielle pulmonaire est 5 à 6 fois plus faible que la pression artérielle systémique. La circulation pulmonaire est une circulation sous basse pression (Hizlop, 1978)

La circulation bronchique, quant à elle, est une circulation systémique nutritive à pression artérielle élevée. La circulation pulmonaire, fonctionnelle, est une circulation à haut débit, basse pression et faible résistance afin de favoriser l'hématose.

2.3. Principe de la transplantation pulmonaire

i. Le donneur

En France, toute personne est considérée comme donneur d'organes, c'est ce qu'on appelle le consentement présumé. Si au contraire, un individu ne souhaite pas être donneur après sa mort, il est impératif qu'il s'inscrive sur la liste nationale des refus (Agence de biomédecine)

La majeure partie des transplantations se fait sur donneurs décédés, en état de mort encéphalique. Quand on parle de patient décédé, cela se traduit par l'arrêt du cœur engendrant une anoxie cérébrale. Phénomène plus rare, le patient peut décéder d'une mort cérébrale dans laquelle le cerveau meurt avant le cœur. Ce décès survient lorsque le patient a subi un traumatisme crânien sévère ou une rupture d'anévrisme. Étant donné que la boîte crânienne n'est pas extensible, la pression intracrânienne augmente et lorsque la pression est supérieure à la pression artérielle, le sang ne peut plus irriguer le cerveau (Agence de biomédecine).

Lors d'un arrêt cardiaque, les organes sont rapidement inutilisables (environs 15 minutes après le décès). Cela est dû à l'ischémie chaude (organe non vascularisé à température corporelle). Cela implique que les organes doivent être vite réfrigérés afin de garder l'intégrité de celui-ci. En revanche, lorsque le cerveau meurt en premier, le cœur continue de battre pendant quelques heures ce qui permet d'organiser la transplantation et d'arriver au bloc opératoire avec un cœur qui bat. Cependant, la régulation hémodynamique ne se faisant plus, les réanimateurs ne peuvent pas quitter le patient. Le donneur est vite envoyé au bloc opératoire, le sang du patient est remplacé par un liquide à basse température permettant ainsi de diminuer la température des organes avant de les prélever et de les conserver au froid. Le manque de greffon étant très présent en transplantation pulmonaire, il est impératif d'avoir les meilleures techniques de préservation des organes (Giwa, 2017).

Pour déterminer qui peut être donneur, la transplantation est règlementée et suit la classification de Maastricht avec différents cas possibles de donneur (Thuong, 2016) :

- **Classe I :** arrêt cardiaque du patient en dehors de tout contexte de prise en charge médicalisée et pour lequel le prélèvement d'organes ne pourra être envisagé que si la mise en œuvre de gestes de réanimation de qualité a été réalisée moins de trente minutes après l'arrêt cardiaque

- **Classe II** : Arrêt cardiaque du patient en présence de secours qualifiés, aptes à réaliser un massage cardiaque et une ventilation mécanique efficaces, mais dont la réanimation ne permettra pas une récupération hémodynamique.
- **Classe III** : mort du patient survenant par les suites d'une décision d'arrêt de traitements en réanimation
- **Classe IV** : mort cérébrale du patient

ii. Le receveur

En LTx, deux possibilités s'offrent aux patients : la greffe mono-pulmonaire (greffe d'un seul poumon) ou la greffe bi-pulmonaire. En fonction de la gravité de la pathologie, il est possible de greffer uniquement un seul poumon permettant ainsi à 2 patients d'être greffés à partir d'un seul donneur. Cependant, si la pathologie touche les deux poumons (dans la mucoviscidose par exemple), il est nécessaire de pratiquer une greffe bi-pulmonaire (Olland, 2016).

iii. Un défi systémique et immunologique

Le groupe ABO

Le premier obstacle de la greffe est le groupe sanguin ABO incompatible. Ce phénomène engendre une inflammation, conduisant à une fibrose et à la destruction de l'organe greffé (Abbas, 2013). En effet, la transplantation se fait en général en respectant les compatibilités de groupes sanguins.

Le système HLA

Le système HLA (Human leucocyte antigen) appelé également CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) est un marqueur de l'identité (Dausset, 1958). Les molécules du HLA sont des présentateurs d'antigènes pour les LT. Elles sont très immunogènes. Ces molécules présentent une fraction de l'antigène aux LT permettant d'activer le système immunitaire (Abbas, 2013).

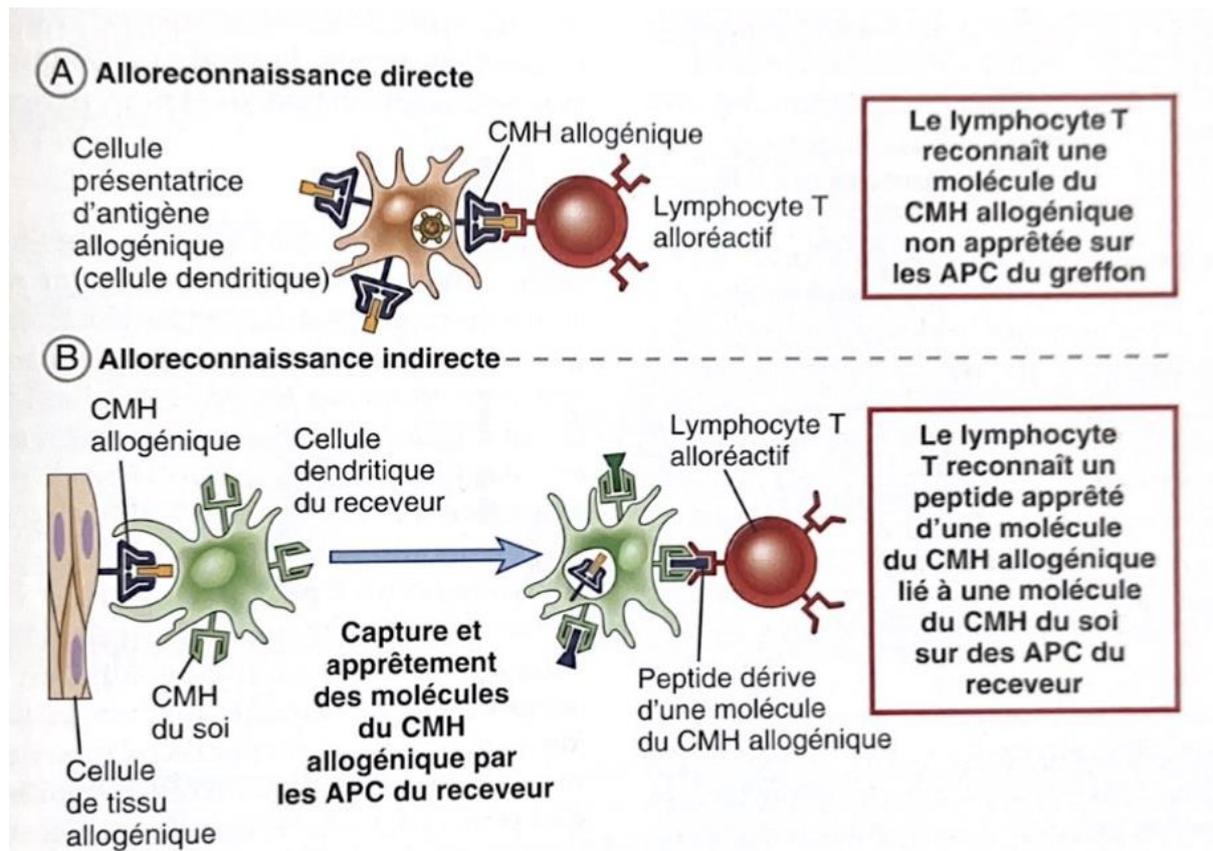


Figure 4: Reconnaissance directe et indirecte des alloantigènes (Abbas, 2013)

Le système HLA est de 2 types (Petersdorf, 2017) :

- Type I (A, B, C) exprimé de manière constitutive sur toutes les cellules nucléées
- Type II (DR, DP, DQ) : exprimé sur les cellules présentant l'antigène dérivé de la moelle osseuse

Le HLA I et le HLA II sont polygéniques (plusieurs gènes de structures et de fonctions pour la même classe) et sont également polymorphiques (nombreux variants alléliques). Ces 2 caractéristiques permettent au système HLA d'augmenter la possibilité de présentation de peptides.

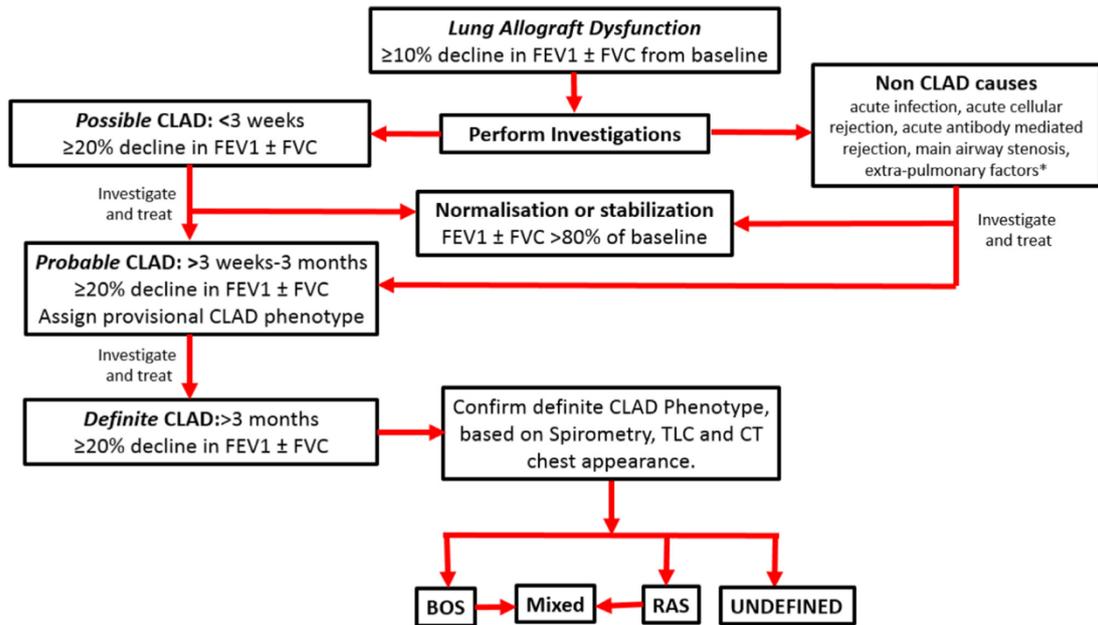
Lors d'une transplantation, les cellules de l'organe du donneur présentent des molécules HLA du donneur. En LTx, on ne tient pas compte de la compatibilité HLA sauf en cas d'immunisation préalable (présence d'anticorps anti-HLA chez le receveur).

Les lymphocytes du receveur peuvent reconnaître les allo-antigènes du donneur de manière directe ou indirecte (Figure 4). Les lymphocytes T peuvent reconnaître les molécules du HLA allo-génique des cellules présentatrices d'antigène du greffon ou peuvent également reconnaître les allo-antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigène du receveur (Abbas, 2013) L'allorecognition directe se caractérise par la reconnaissance des LT d'une molécule du HLA allogénique non apprêtée sur les cellules présentatrices d'antigène du greffon.

L'allorecognition indirecte se définit, quant à elle, par la reconnaissance des LT d'un peptide apprêté d'une molécule HLA allogénique liée à une molécule du soi sur des cellules présentatrices d'antigène du receveur. Ces allorecognitions vont engendrer l'activation des LT attaquant le greffon (Abbas, 2013).

Chapitre 2 :

La dysfonction chronique du greffon : la Bronchiolite Oblitérante



Flowchart of evolution of CLAD. The date of onset of CLAD is defined as the date at which the first value of $FEV_1 \pm FVC \leq 80\%$ of baseline was recorded, provided subsequent values remain at $\leq 80\%$ of baseline. Undefined indicates patients who do not fit in the current definitions of BOS, RAS, and mixed phenotypes (see Table 3). Asterisk (*) indicates non-CLAD causes, as described in Table 1. BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; CT, computerized tomography; FEV_1 , forced expiratory volume in 1 second; FVC, forced vital capacity; RAS, restrictive allograft syndrome; TLC, total lung capacity.

Figure 5: Flowchart de l'évolution des CLAD (Verleden, 2019)

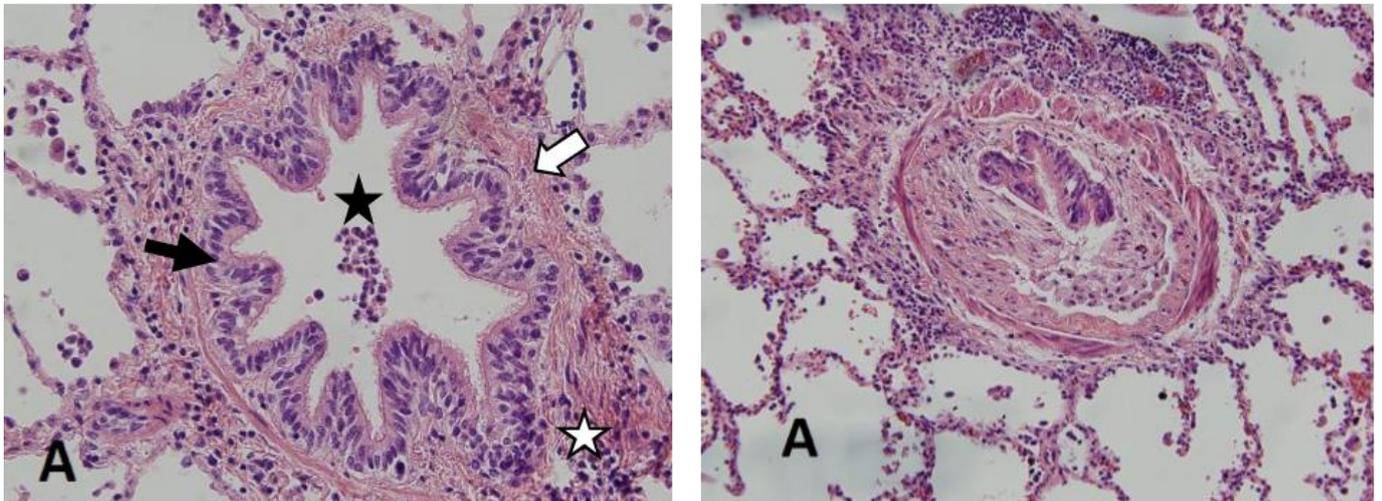


Figure 6: Examen au microscope optique d'une bronchiolite en coupe transversale d'un poumon témoin indemne de bronchiolite oblitérante (gauche) et avec lésions de BO avancées (droite (Thèse du Dr. Renaud-Picard Benjamin)

La lumière bronchiolaire est indiquée par l'étoile noire, entourée par l'épithélium bronchique (flèche noire) et les fibres musculaires lisses de la paroi (flèche blanche) avec présence de quelques cellules inflammatoires (étoiles blanches).

1. Définition et prévalence

La BO a été décrite et définie la première fois en 1993 chez les patients transplantés pulmonaires (Verleden, 2019). Elle peut survenir de manière insidieuse avec un déclin progressif ou de manière abrupte avec un déclin sévère de la fonction respiratoire (Weigt, 2013). La BO affecte 10% des patients chaque année (Chambers, 2018) et représente la première cause de décès chez le patient greffé pulmonaire. La médiane de survie des patients est de 6,2 ans et atteint 8,3 ans pour les patients ayant survécu après la première année de greffe (Van der Mark, 2020). En France, la médiane de survie est de 8,3 ans (Agence de biomédecine). Cependant, avec le temps, un phénomène de dysfonction chronique du greffon pulmonaire (CLAD : chronic lung allograft dysfunction) se développe. Ce CLAD se manifeste soit par un syndrome de bronchiolite oblitérante, soit par un syndrome restrictif du greffon pulmonaire, soit par une forme mixte (Figure 5). Cette pathologie liée à la greffe se caractérise par un remodelage anormal de l'épithélium bronchique, provoquant au fil du temps un épaississement de la paroi conduisant à une obstruction des petites voies aériennes (Figure 6) (Pain, 2014). Cette obstruction est due à un phénomène de fibrose accompagné d'un infiltrat lymphocytaire (Le Pavec, 2013). Sa prévalence augmente de 50% à 5 ans à 75% à 10 ans (Benden, 2017). L'un des mécanismes impliqués dans le CLAD est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zhang, 2017).

2. Diagnostic de la bronchiolite oblitérante

La BO se caractérise par un déclin persistant du VEMS $>20\%$ comparé aux moyennes des 2 meilleurs VEMS obtenus à au moins 3 semaines d'écart (Fig (Verleden, 2019). L'analyse scannographique peut déceler des anomalies pulmonaires avec un aspect « en mosaïque » des poumons mieux visible sur les coupes en expiration. L'analyse histologique ne peut être que rarement réalisée et révèle des lésions atteignant essentiellement les voies aériennes distales inférieures à 2 mm (Verleden, 2016).

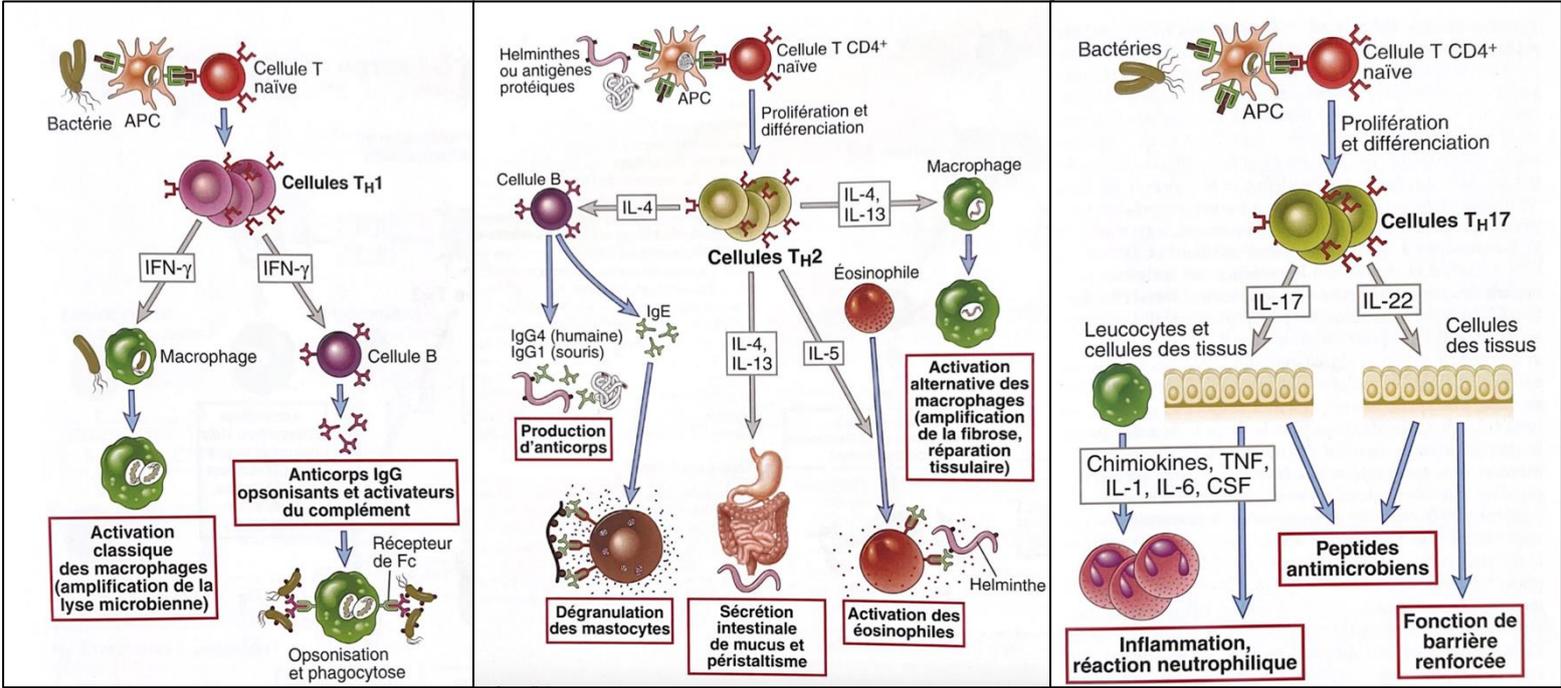


Figure 7: Fonction des cellules Th1, Th2 et Th17 (Abbas, 2013)

3. Classification de la bronchiolite oblitérante

La BO est catégorisée en 5 grades où le grade 5 (CLAD-4) représente le stade le plus avancé de la pathologie (Verleden, 2019) :

CLAD-0: VEMS > 80%

CLAD-1: $65\% \leq \text{VEMS} \leq 80\%$

CLAD-2: $50\% \leq \text{VEMS} \leq 65\%$

CLAD-3: $35\% \leq \text{VEMS} \leq 50\%$

CLAD-4: VEMS < 35%

4. Les cellules impliquées

La réparation des voies respiratoires est un équilibre entre Th1/Th2/Th17/Treg (Figure 7).

Les lymphocytes Thelper 1 (Th1) sont associés à une réponse lymphocytaire cytotoxique, avec synthèse de molécules pro-inflammatoires tel qu'IL-2, IL-12 et IFN γ , responsables d'un rejet aigu cellulaire. Les lymphocytes Thelper 2 (Th2) sont associés à la synthèse de molécules permettant le développement des lymphocytes T (LT) et sont liés à un rejet chronique. Les lymphocytes Thelper 17 (TH17) sont associés à la synthèse de molécules pro-inflammatoires tel qu'IL-17 et IL-23, impliqués dans l'auto-immunité. L'auto-immunité contre le collagène de type V prédispose les patients au développement d'une BO. Il en découle une production de TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23 élevée dans le LBA des patients BO. Quant aux lymphocytes T régulateurs (LTreg), ils jouent un rôle dans la modulation des réponses effectrices (Weigt, 2013).

D'autres cellules du système immunitaire innée sont également impliquées tels que les macrophages libérant des chimiokines afin de recruter d'autres cellules immunitaires (Abbas, 2011). De plus, une étude récente sur les neutrophiles démontre que les NETs joueraient un rôle dans la pathogenèse de la BO (Bozzini, 2021).

5. Les facteurs de risque de la bronchiolite oblitérante

5.1 Facteurs allo-immuns

i. Rejet hyper-aigu

Le rejet hyper-aigu apparaît quelques minutes après la transplantation (Figure 8). Ce rejet est dû à la présence d'anticorps spécifiques des antigènes des cellules endothéliales du greffon. Ce sont des anticorps préformés qui sont des anticorps anti-HLA du donneur. Cela entraîne une thrombose vasculaire provoquant la nécrose du greffon. Pour éviter ce rejet, avant de transplanter l'organe chez le receveur, une analyse de risque du rejet hyper-aigu est mise en place par la technique du cross-match (Abbas, 2013). Les lymphocytes T cytotoxiques du donneur exprimant les HLA sont prélevés et mis en présence du sérum du receveur. Si l'anticorps anti-HLA reconnaît un antigène HLA spécifique, le LT cytotoxique s'y lie. Après ajout des molécules du complément, si l'anticorps est fixé, le LT cytotoxique s'active et lyse la cellule. Un colorant est ajouté pour visualiser le mécanisme de lyse : s'il y a lyse cellulaire, le colorant pénètre dans la cellule.

La technique du cross-match est une étude fonctionnelle, utilisant les LT cytotoxiques exprimant les molécules HLA entières et non altérées. Cependant elle ne met en évidence que les LT cytotoxiques capables de se fixer au complément. Si le cross-match est positif il y a lyse des cellules par les LT. Néanmoins, il est possible que ce sont les anticorps du donneur qui activent la lyse cellulaire, c'est ce qu'on appelle un auto-cross-match. Ainsi, une étape de vérification est nécessaire afin d'analyser l'effet des LT cytotoxiques du donneur en présence d'anticorps du donneur. Si le résultat est positif, les anticorps sont des auto-anticorps (Abbas, 2013).

Le cross-match est défini par des conditions bien précises. Ainsi cette technique a ses limites. L'anticorps doit fixer le complément, or toutes les immunoglobulines ne le fixent pas, donc il n'y a pas de lyse cellulaire possible. Pour qu'il y ait lyse, le taux d'anticorps doit être très élevé.

Cette technique est une méthode peu sensible mais très spécifique.

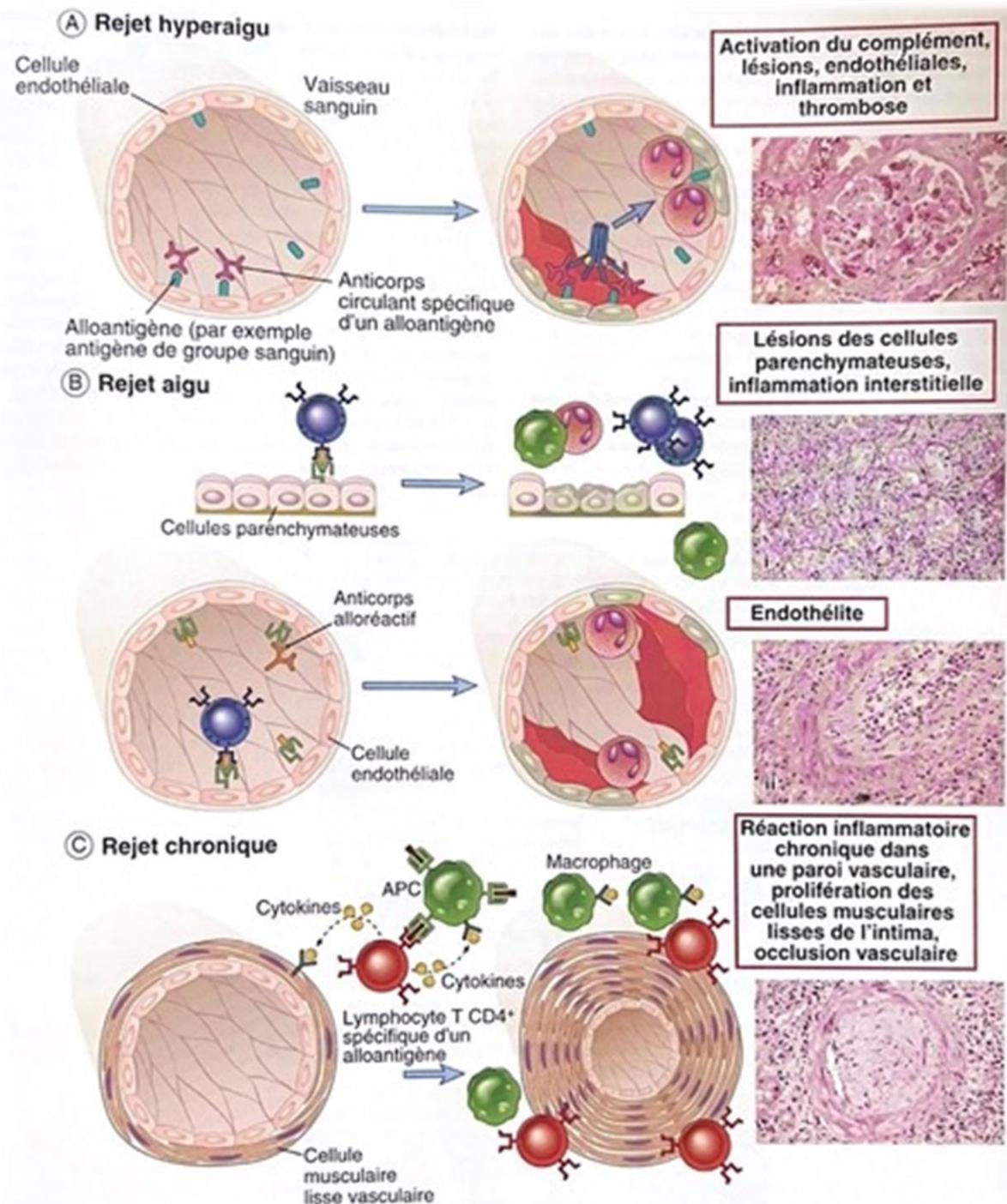


Fig. 10.9 Mécanismes et histopathologie du rejet de greffe. A. Dans le rejet hyperaigu, des anticorps préformés réagissent avec des alloantigènes de l'endothélium vasculaire du greffon, activent le complément et déclenchent une thrombose intravasculaire rapide et une nécrose de la paroi du vaisseau. Les micrographies de droite montrent des aspects histologiques représentatifs de chaque type de rejet. B. Dans le rejet aigu, les lymphocytes T CD8⁺ réagissent avec les alloantigènes des cellules endothéliales et parenchymateuses du greffon, alors que les anticorps réagissent surtout avec les cellules endothéliales. L'inflammation de l'endothélium est parfois appelée « endothélite ». L'histologie montre un rejet cellulaire aigu (microphotographie i) et un rejet humoral, dépendant des anticorps (microphotographie ii). C. Dans le rejet chronique avec artériosclérose du greffon, les lymphocytes T réagissant avec les alloantigènes du greffon peuvent produire des cytokines, qui induisent de l'inflammation et une prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses de l'intima, provoquant une occlusion luminale.

Figure 8: Mécanisme et histopathologie du rejet de greffe (Abbas, 2013)

ii. Rejet aigu

27% de patients subissent un rejet aigu au cours de la première année de greffe (Chambers, 2018). Le rejet aigu est défini par une infiltration des LT dans le greffon surtout dans les régions périvasculaires et péribronchiques (Figure 8). Le risque est très élevé les trois premiers mois. Le nombre d'épisodes de rejet aigu est corrélé à un risque de rejet chronique plus important (Nakajima, 2011).

Le rejet aigu est défini par plusieurs grades (Stewart, 2007) :

- Grade A0 : pas de rejet aigu
- Grade A1 : rejet aigu minimal ; cicatrisation, infiltration peu fréquente
- Grade A2 : rejet aigu moyen ; infiltrat périvasculaire de lymphocytes, macrophages, d'éosinophiles
- Grade A3 : rejet aigu modéré : infiltration plus importante de cellules monocytaires, d'éosinophiles et de neutrophiles
- Grade A4 : rejet aigu sévère : infiltrat diffus, dommage alvéolaire, nécrose du tissu épithélial

iii. Rejet chronique

Le rejet chronique est irréversible, avec une diminution du calibre des petites voies aériennes et des vaisseaux dû à un phénomène de fibrose (Figure 8). La réponse à une inflammation chronique est la réparation aberrante et incontrôlée du tissu, engendrant un remodelage tissulaire dû à une réponse fibrotique. Les petites voies aériennes développent une occlusion de la lumière avec une persistance des lésions immunes. Quand les petites voies sont oblitérées, les voies aériennes proximales développent une bronchiectasie : flux d'air altéré, pertes des cellules ciliées, souvent colonisées par des bactéries GRAM – tel que *Pseudomonas aeruginosa* (Nakajima, 2011).

La cause majeure de perte de greffon est médiée par les anticorps. L'administration d'alloanticorps est capable de provoquer une oblitération des voies respiratoires dans un modèle murin. Les allo-anticorps peuvent induire des lésions des voies respiratoires (Abbas, 2013).

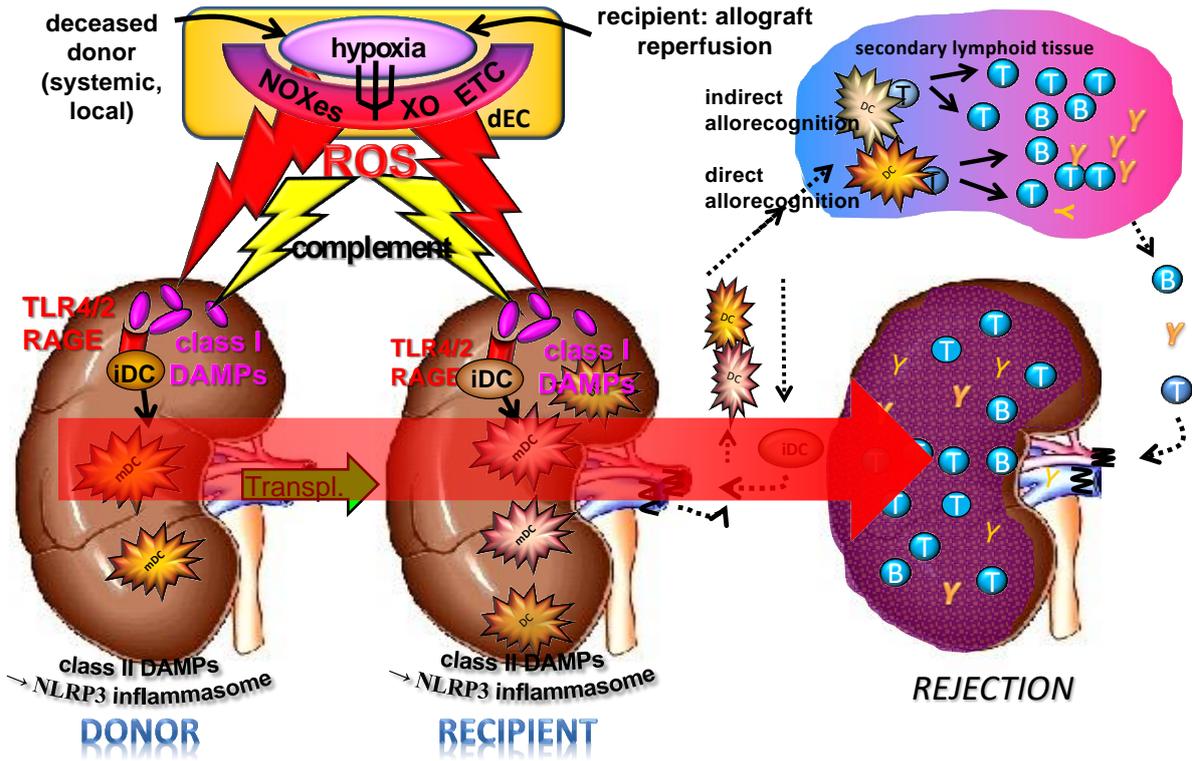


Figure 9: Impact de l'ischémie reperfusion sur l'organe greffé (Walter Gottfried Land, 2016)

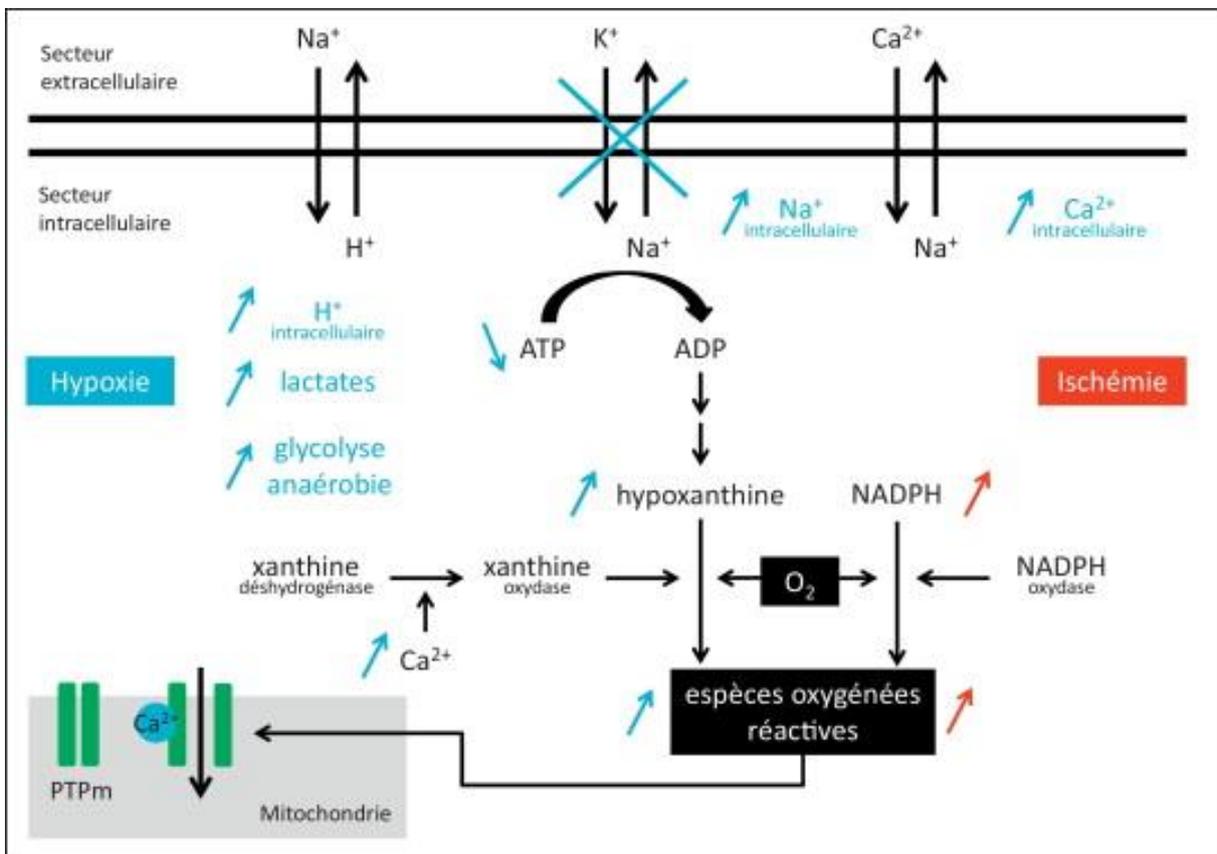


Figure 10: Mécanismes de l'ischémie-reperfusion lors d'une greffe (Gennai, 2014)

Le Collagène V, exprimé de manière omniprésente dans les tissus conjonctifs périvasculaires/ bronchiques, est incorporé dans les fibrilles de collagène I, ce qui le protège d'une réponse immunitaire. Chez l'Homme, s'il y a présence d'anticorps anti Collagène V, le risque est plus important de développer une BO.

Lorsque la tubuline K- α 1, exprimée dans les jonctions lacunaires des cellules épithéliales et endothéliales des voies respiratoires, est exposée au système immunitaire, il y a formation d'anticorps antiK- α 1 provoquant la destruction des cellules. Ces anticorps sont impliqués dans le rejet chronique, stimulant les facteurs de croissance profibrotique (Sureshabu, 2020).

5.2 Facteurs non-allo-immuns

i. Ischémie reperfusion

Au cours d'une transplantation, les organes subissent une période de conservation à 4°C, appelée ischémie froide. Le processus de l'ischémie reperfusion comporte un ensemble de lésions liées à l'hypothermie lors de la conservation, mais également liées à l'hypoxie (organe non vascularisé et donc non oxygéné) puis au réchauffement et à la ré-oxygénation associés à la reperfusion (Schuurs, 2006). L'ischémie reperfusion engendre des lésions inflammatoires lors de la transplantation (Jamieson, 2008).

Le processus de l'ischémie engendre un stress cellulaire (Figure 9). Ce stress induit une diminution en apport d'oxygène et de nutriment engendrant une diminution d'ATP. Cette diminution d'ATP augmente le calcium intracellulaire de l'organe greffé. L'augmentation de la concentration calcique augmente le potentiel de la membrane mitochondriale provoquant la diminution du pH intracellulaire. Lors d'une diminution de pH, cela engendre une augmentation de la concentration calcique intra-mitochondriale. L'acidification du milieu intracellulaire provoque la fermeture des pores mitochondriaux (Figure 10).

Le processus de reperfusion engendre la mort cellulaire des cellules stressées par l'exposition brutale à l'oxygène et aux nutriments provoquant une réversion très rapide. La forte augmentation d'O₂ induit une forte concentration de radicaux libres. Ce phénomène normalise le pH intracellulaire. La normalisation du pH ainsi que la forte concentration de ROS permet

l'ouverture des pores mitochondriaux. L'ouverture des pores permet l'exclusion du cytochrome C des mitochondries activant les caspases responsables de l'apoptose et de la nécrose par une rupture de la membrane mitochondriale puis cellulaire.

L'ischémie reperfusion engendre ainsi un stress cellulaire par l'accumulation de calcium intracellulaire provoquant la mort des cellules du greffon par un phénomène inflammatoire avec activation du système immunitaire.

ii. Dysfonction primaire du greffon

La dysfonction primaire du greffon (DPG) est une atteinte pulmonaire survenant dans les premières heures ou les premiers jours après la LTx. La DPG est un œdème pulmonaire aigu résultant du phénomène d'ischémie-reperfusion. Les patients développant un DPG sévère ont une mauvaise survie à long terme (Belperio, 2009). Ces lésions non-spécifiques prédisposent les patients à un développement d'une BO. La DPG contribue ainsi à la morbidité et mortalité tardives (Shah, 2018).

iii. Reflux gastro-œsophagien

Le reflux gastroœsophagien provoque des lésions de l'appareil bronchique. Lorsque le poumon est greffé, il est à nouveau vascularisé mais n'est plus innervé. La dénervation des poumons altère la clairance mucociliaire. Dans le LBA des patients, la présence de bile ou de pepsine peut témoigner de l'aspiration de liquide gastrique notamment en cas de reflux gastro-œsophagien. Les inhibiteurs de la pompe à protons réduisent les reflux acides mais ne bloquent pas les reflux non-acides (Belperio, 2009).

iv. Infections

Le poumon est un organe hautement immunogène exposé aux infections (Mc Curry, 2019). En LTx, les infections les plus fréquentes sont les infections bactériennes broncho-pulmonaires à hauteur d'environ 50%. Les infections pulmonaires des patients ayant une BO sont associées à une progression plus rapide de la pathologie (Nakajima, 2011).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie fréquente lors d'infections pulmonaires des patients greffés (40% des cas) (Nakajima, 2011). *P. aeruginosa* exprime des « pathogen associated molecular patterns » (PAMP) qui sont des lipopolysaccharides (LPS) de la surface membranaire qui se lient aux récepteurs « Toll Like Receptor 4 » (TLR4) des macrophages. Ce récepteur

« Toll Like Receptor 4 » est un « pattern recognition receptor » (PRR) (Kawashima, 2020). L'activation de TLR4 contribue à l'augmentation de la prolifération des fibroblastes présents dans l'épithélium pulmonaire lors de phénomènes de fibrose (Kawashima, 2018). *P. aeruginosa* provoque la production d'IL-8 des cellules épithéliales pulmonaires. IL-8 est une cytokine chimiotactique pour les cellules immunitaires, non inductrice directe de la TEM mais pouvant agir en synergie avec le TGF- β . *P. aeruginosa* induit sur les THP-1, lignée de monocytes humains, une augmentation de l'excrétion d'IL-8, d'IL-1 β et de TNF- α (Borthwick, 2011). *P. aeruginosa* accentue la TEM des cellules pulmonaires dans un environnement à forte concentration de TGF- β (Renaud-Picard, 2017). Ainsi, *P. aeruginosa* augmente le risque de BO. (Borthwick, 2011).

Les infections virales au *Cytomégalo*virus (CMV) induisent une augmentation de l'expression du HLA du donneur. Le CMV stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (Borthwick, 2011). Une infection à l'*Epstein-Barr virus* (EBV) est très problématique chez un patient greffé. C'est un virus oncogène associé au syndrome lymphoprolifératif post-greffe. Lors de la greffe, il est important de connaître l'état de l'immunité antivirale, en particulier pour le CMV et l'EBV, du donneur et du receveur (Nakajima, 2011).

En plus des infections bactériennes et virales, les transplantés ont entre 15 et 35% de risque de développer une infection fongique, en particulier à *Aspergillus fumigatus*. *Ce champignon* engendre des infections invasives et peut jouer aussi un rôle dans l'inflammation des voies aériennes conduisant à la BO.

6. Traitements et leurs limites

6.1 Traitement préventif

Lors d'essai clinique dans le traitement préventif de la BO, le critère principal est la « stabilisation ou réduction du taux de déclin du VEMS ». Il ne faut pas oublier qu'une stabilisation de la BO peut refléter l'histoire naturelle de la maladie. D'ailleurs, au moment du diagnostic de la BO, il est trop tard pour de la prévention (Neurohr, 2021).

L'Azithromycine, antibiotique de la famille des macrolides, a montré une amélioration de la fonction pulmonaire à court terme dans la LTx (Weigt, 2013).

Il est également possible de traiter une des causes de la BO par chirurgie. Le patient peut subir une chirurgie du reflux appelée fundoplication de Nissen où ce reflux est bloqué, améliorant les paramètres fonctionnels du patient (Heyer, 2011).

Lorsqu'un patient présente une BO, la première stratégie mis en place est le renforcement de l'immunosuppression (Verleden, 2019).

Actuellement, un essai clinique est en cours au Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg portant sur l'utilisation de la cyclosporine en aérosol. Le protocole BOSTON 2, sous l'identification NCT03656926 (*clinicaltrials.gov*), est un essai clinique mis en place pour démontrer l'efficacité et la sécurité d'une solution d'inhalation de cyclosporine A liposomale (L-CsA) dans le traitement de la BO chez les patients ayant subi une transplantation pulmonaire.

6.2 La photophorèse extracorporelle

La photophorèse consiste à récupérer des cellules mononuclées du sang qui seront soumises à des UV-A puis réinjectées au patient. Cela va induire une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-2, TNF α), une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β), une diminution de l'activation des lymphocytes T et une stimulation des Treg. (Benden, 2017).

6.3 Les anticorps anti-lymphocytaires

L'utilisation d'anticorps comme traitement dans la BO est possible par thérapie cytolytique à travers l'utilisation d'anticorps anti-lymphocytaires et anti-thymocytaire (Weigt, 2019). L'Alemtuzumab, utilisé dans la thérapie d'induction, est un anticorps dirigé contre le système immunitaire pour diminuer la réponse immune lors de la transplantation (Reams, 2007). L'Alemtuzumab est une immunoglobuline G, qui se lie à la glycoprotéine transmembranaire CD52 présente sur les lymphocytes T et B. Après appariement avec CD52, l'anticorps recrute les facteurs du complément afin de détruire les lymphocytes et bloquer la réponse immunitaire. Cette thérapie permet de diminuer le rejet par la déplétion des lymphocytes (Trindade, 2020). D'autres anticorps tel que le Muromonab, anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD3 des lymphocytes inhibe le rejet de greffe en bloquant les lymphocytes jouant un rôle dans le

rejet aigu. La liaison avec CD3 entraîne une activation précoce des lymphocytes conduisant à la libération de cytokines puis un blocage des fonctions des LT (Yannik, 2011).

6.4 La retransplantation

La retransplantation est le seul traitement pour certains patients sélectionnés avec un BOS très sévère (Weigt, 2019). En cas de retransplantation, la survie est moins bonne qu'en cas de primo-transplantation : 78% de survie à 1 an, 61% à 5 ans. (Heyer, 2014).

Chapitre 3

*La transition épithélio-
mésenchymateuse dans la
bronchiolite oblitérante*

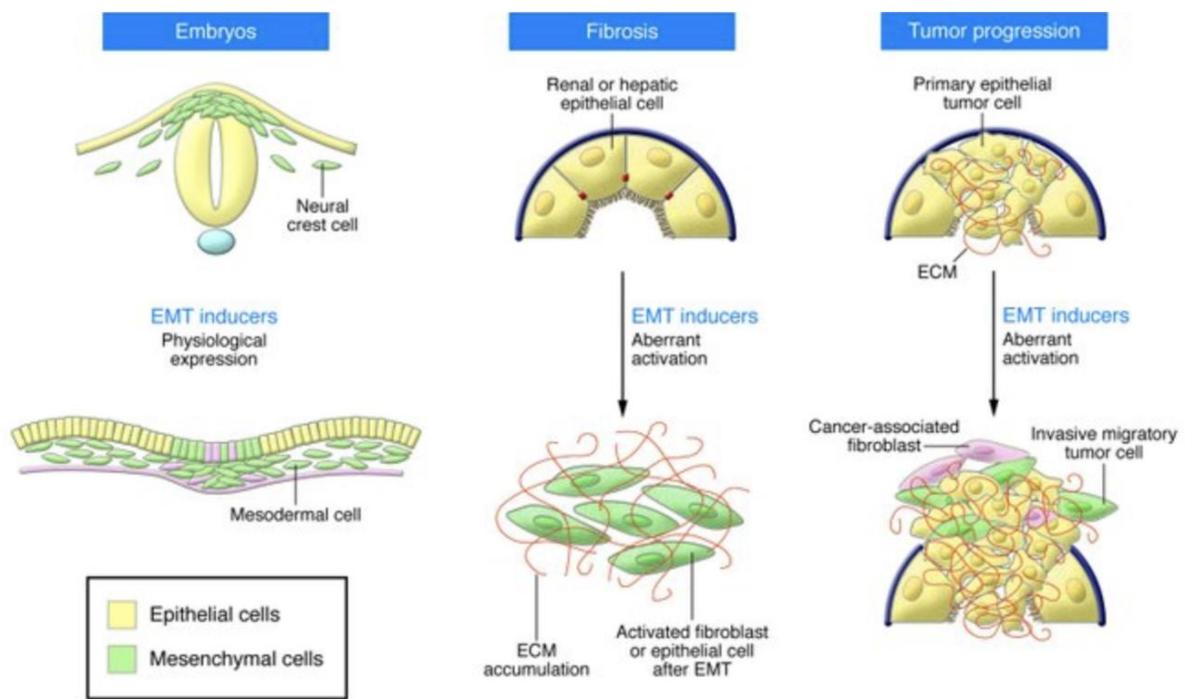


Figure 11: Les 3 types de TEM (Kalluri, 2009)

1. Caractéristiques de la transition épithélio-mésenchymateuse

1.1 Type I

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) de type 1 est un processus physiologique impliqué dans la formation des organes et tissus pendant l'embryogenèse (Kalluri, 2009). La TEM permet la formation du mésoderme jusqu'à l'épithélium. Cette TEM est réversible ; les cellules mésenchymateuses peuvent à nouveau devenir épithéliales (Figure 11). Cette TEM finit le processus de différenciation cellulaire et définit la structure des organes (Nawshad, 2005). TGF- β joue un rôle dans le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire.

1.2 Type III

La TEM de type 3 est une TEM pathologique engendrant une acquisition de nouvelles propriétés migratoire par les cellules épithéliales (Figure 11). Ce type de TEM est présent dans la cancérogenèse cellulaire. Ce type permet la perte de polarité et ainsi la dissémination des cellules mésenchymateuses, sous forme de métastases (Pain, 2014). TGF- β agit comme disséminateur de métastase.

1.3 Type II

La TEM de type 2 est la TEM impliquée dans le processus de cicatrisation permettant de régénérer le tissu lésé. La TEM est présente lors d'une réponse inflammatoire persistante, ce qui induit avec le temps une réponse excessive de TEM provoquant une fibrose de la zone inflammatoire (Figure 11). Cette fibrose est un processus d'accumulation de fibroblastes et de fibres de collagènes détruisant ainsi la structure épithéliale de l'organe. Cela engendre la dysfonction de l'organe (Pain, 2014).

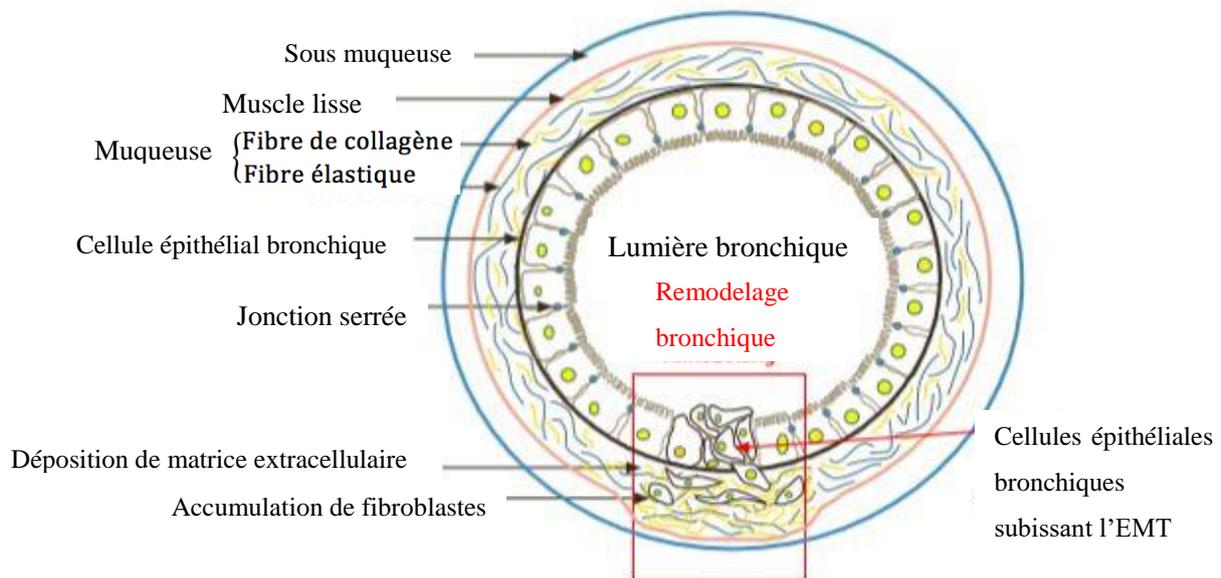


Figure 12: TEM de type II au cours du remodelage bronchique

L'EMT contribue au pool de cellules mésenchymateuses nécessaires pour la régénération tissulaire. Dans des conditions d'inflammation chronique, ce processus peut devenir excessif et entraîner la formation de tissu fibreux. L'accumulation de fibroblastes entraîne alors la sécrétion de collagène, responsable d'un dysfonctionnement de l'organe.

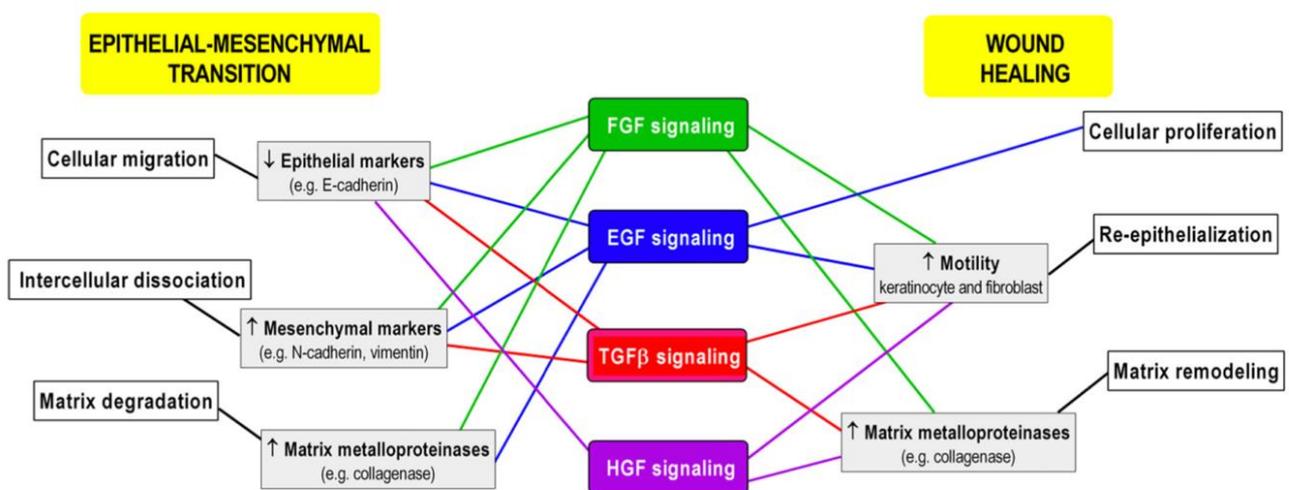


Figure 13: Facteurs de croissance impliqués dans la TEM (Stone, 2016)

2. Mécanismes

2.1 Mécanismes cellulaires et moléculaires

Dans la LTx, les cellules fibroblastiques peuvent avoir différentes origines : les fibroblastes peuvent provenir de la circulation sanguine ou de l'environnement local ou alors dériver du tissu local (Kalluri, 2003).

Lors d'une TEM, il y a perte des marqueurs épithéliaux, provoquant ainsi la perte de polarité cellulaire. De même, un réarrangement du cytosquelette s'opère à travers la perte de l'adhésion cellulaire intercellulaire (Figure 12). Cette TEM provoque l'expression des marqueurs mésenchymateux et fibroblastiques spécifiques avec la synthèse de matrice extracellulaire. Cette TEM engendre un phénotype fibroblastique caractérisé par des cellule fusiformes, allongées (Fintha,2019).

Lors de la TEM, il y a désassemblage des jonctions serrées et adhérentes, une répression des gène épithéliaux, ainsi qu'une perte de polarité cellulaire (Huang, 2012). Les cellules subissent une réorganisation du cytosquelette d'actine avec l'acquisition de capacités motrices et invasives permettant l'activation de l'expression des métalloprotéinase capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire. Les cellules expriment donc des gènes mésenchymateux (Lamouille, 2014).

FGF (Fibroblast Growth Factor) active un facteur de transcription, Slug, qui agit comme inducteur de la TEM. FGF permet la stimulation de sécrétion de métalloprotéinase 2 et 9 (MMP2-MMP9) impliquées dans la dégradation de la membrane basale. EGF (Epidermal Growth Factor) et HGF (Hepatic Growth Factor) facteurs de dispersion, induisent une déstabilisation des desmosomes, activent Snail et Slug (facteurs de transcription pro-TEM), inhibent le gène codant pour la desmoplakine (impliqué dans la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire) induisant l'acquisition de nouvelles propriétés migratrices ainsi qu'une diminution des marqueurs épithéliaux (Figure 13).

FGF et EGF favorisent l'endocytose de la E-cadhérine, l'expression de Snail, Twist et TGF- β permettant la dissociation cellulaire et une augmentation des marqueurs mésenchymateux.

FGF et EGF dégradent la matrice extracellulaire et augmentent la synthèse de métalloprotéinases (Stone, 2016).

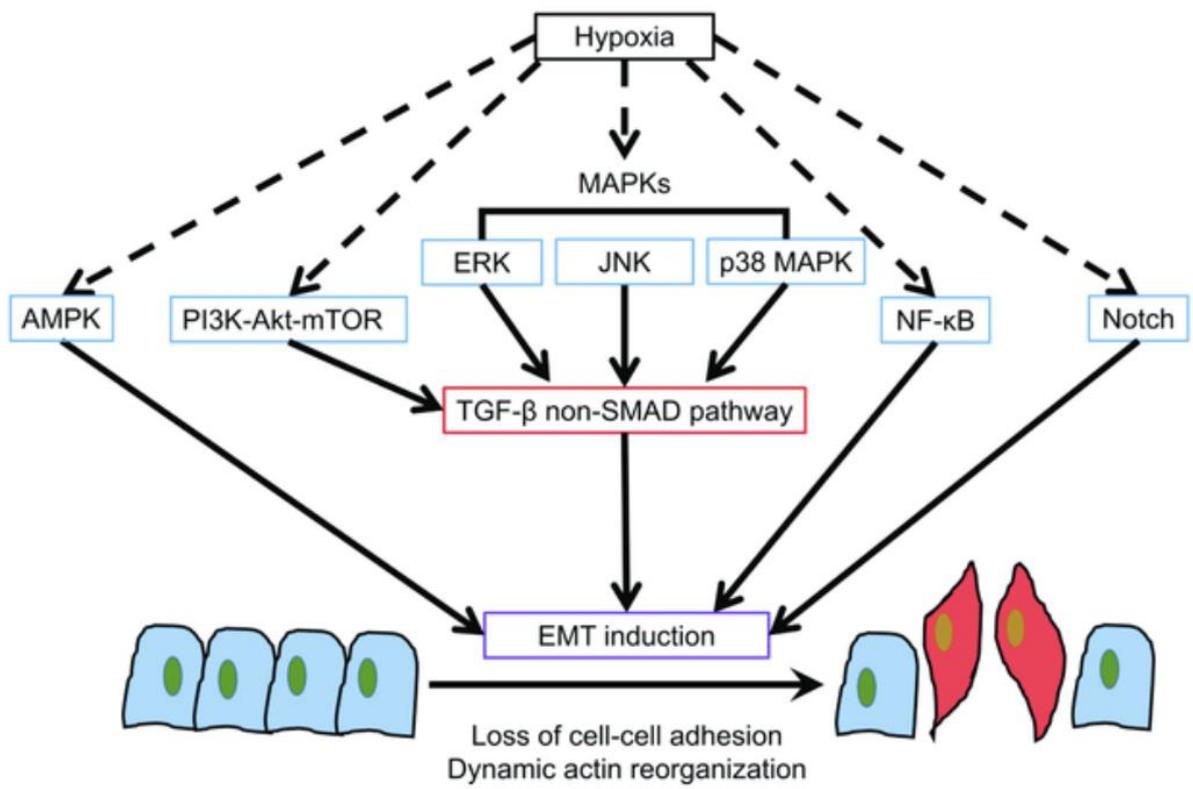


Figure 14: La TEM est médiée par HIF1 (Tam, 2020)

Les facteurs de transcription impliqués dans la TEM sont Snail, Slug, bHLH, ZEB où Snail et Slug répriment les gènes épithéliaux et activent les gènes mésenchymateux. (Lamouille, 2014). Les protéines de la famille TGF- β , Wnt, Notch et RTK activent l'expression de Snail.

Il s'avère que les macrophages induisent la TEM quand ils sont en contact direct avec les cellules épithéliales, produisant des cytokines et activant la TEM par des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β , et TNF- α (Sivanantham, 2019).

2.2 Processus inflammatoire

Dans la TEM impliquée dans la BO, différentes cytokines sont sécrétées dans l'environnement pulmonaire (D'Amico, 2020).

Lors de la greffe, l'organe est en hypoxie, conduisant à la synthèse de HIF-1, facteur de transcription, impliqué dans la réaction immune/inflammatoire, exprimant différentes protéines dont l'érythropoïétine, NOS, VEGF. HIF-1, lors de la transplantation, permet le recrutement des cellules angiogéniques de la moelle pour le remodelage artériel et l'angiogenèse. VEGF-A se lie au récepteur 2 de VEGF pour induire la perméabilité, l'expression de cytokines et de molécules chimiotactiques. Dans la greffe allogénique, HIF-1, VEGF-A et le récepteur 2 de VEGF sont surexprimés par les cellules épithéliales du greffon (Akhtar, 2014). Mais quel est le lien entre la BO et HIF-1 ? Le rôle d'HIF-1 n'est pas lié au rejet, mais à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et au recrutement des cellules inflammatoires (Figure 14). Or dans le poumon, HIF-1, VEGF et NOS sont libérés en condition hypoxique. Ainsi HIF-1, VEGF-A et le récepteur 2 de VEGF possèdent une voie signalisation qui peut être impliquée dans le développement et le pronostic de la BO après transplantation pulmonaire (Xu, 2019).

En présence de LTreg, l'IL-12 favorise la production d'INF- γ pendant la réponse allogénique. INF- γ limite le rejet aigu dû à son effet antiprolifératif sur les lymphocytes T, engendrant ainsi une diminution de l'activité lytique des lymphocytes T cytotoxiques (Verma, 2014).

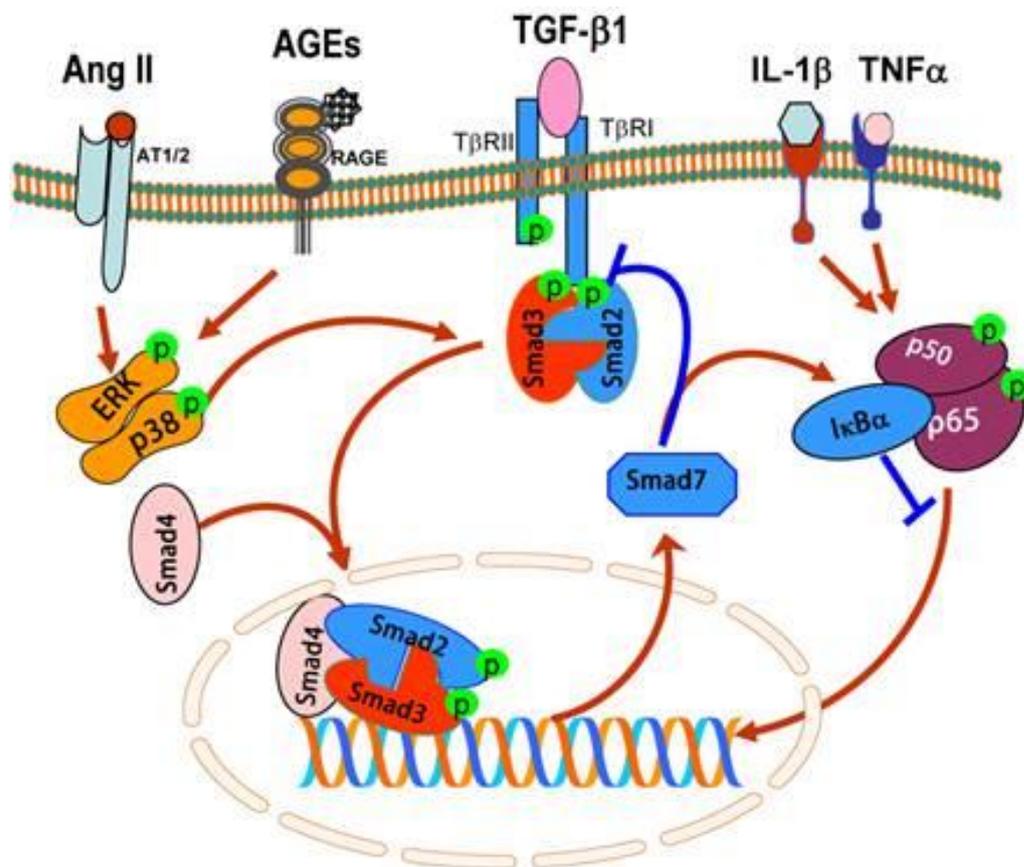


Figure 15: Voie de signalisation de TGF-β lors de l'inflammation pulmonaire dans la BO (Lan, 2011)

TGF-β se lie à son récepteur qui se dimérise. Le récepteur se phosphoryle et active Smad2 et Smad3 qui se lient à Smad4. Ce complexe est transloqué dans le noyau et participe à la régulation de gènes cibles. (Aris et al. 2002)

IFN- γ favorise davantage le rejet chronique par une augmentation du CMH-II à la surface des cellules endothéliales, activant ainsi les macrophages qui sécrètent des médiateurs profibrotiques. Quant à l'IL-15, produite par les phagocytes, cette cytokine est impliquée dans la différenciation et la prolifération des NK (Natural Killer) et LT. (Nakajima, 2011). Dans le LBA des patients ayant une BO, il y a une forte concentration d'IL-13, cette cytokine induit la fibrose par l'activation de son récepteur activant la voie intercellulaire JAK-STAT.

FGF a un pouvoir angiogénique, permettant la migration cellulaire la prolifération et l'activation des fibroblastes et la synthèse de collagène. TNF- α sécrété par les macrophages et les monocytes induit une inflammation et cause une fibrose. IGF-1 (Insulin Growth factor 1) régule la croissance des fibroblastes et produit du tissu conjonctif. EGF produit par les cellules épithéliales, stimule et différencie les cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (Aris, 2002)

Lors d'infections, les lymphocytes Th-17 produisent de l'IL-17 qui est une cytokine pro-inflammatoire. IL-17 stimule l'expression d'IL-6, IL-1 β , CXCL8, TNF- α contribuant ainsi à la BO. TNF- α est une cytokine sécrétée par les cellules sanguines surtout les macrophages (Wu, 2010). TNF- α favorise la TEM en établissant un microenvironnement inflammatoire. TNF- α permet la survie cellulaire en activant des voies anti-apoptotiques telle que la voie NF κ B (Gulluoglu, 2019).

3. Voies intracellulaires impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse

3.1 Voie principale : voie du TGF- β

TGF- β (Transforming Growth Factor β) est surexprimé chez les patients ayant une BO (Borthwick, 2009). TGF- β est synthétisé sous forme d'un précurseur et forme un complexe avec des peptides : « latency-associated peptide » (LAP) « latent TGF- β binding protein » (LTBP). Ce complexe permet de maintenir TGF- β sous forme inactive pour qu'il ne se lie pas à son récepteur. Le complexe latent est clivé dans l'espace extracellulaire par des protéases (plasmine, MMP2, MMP9) libérant TGF- β .

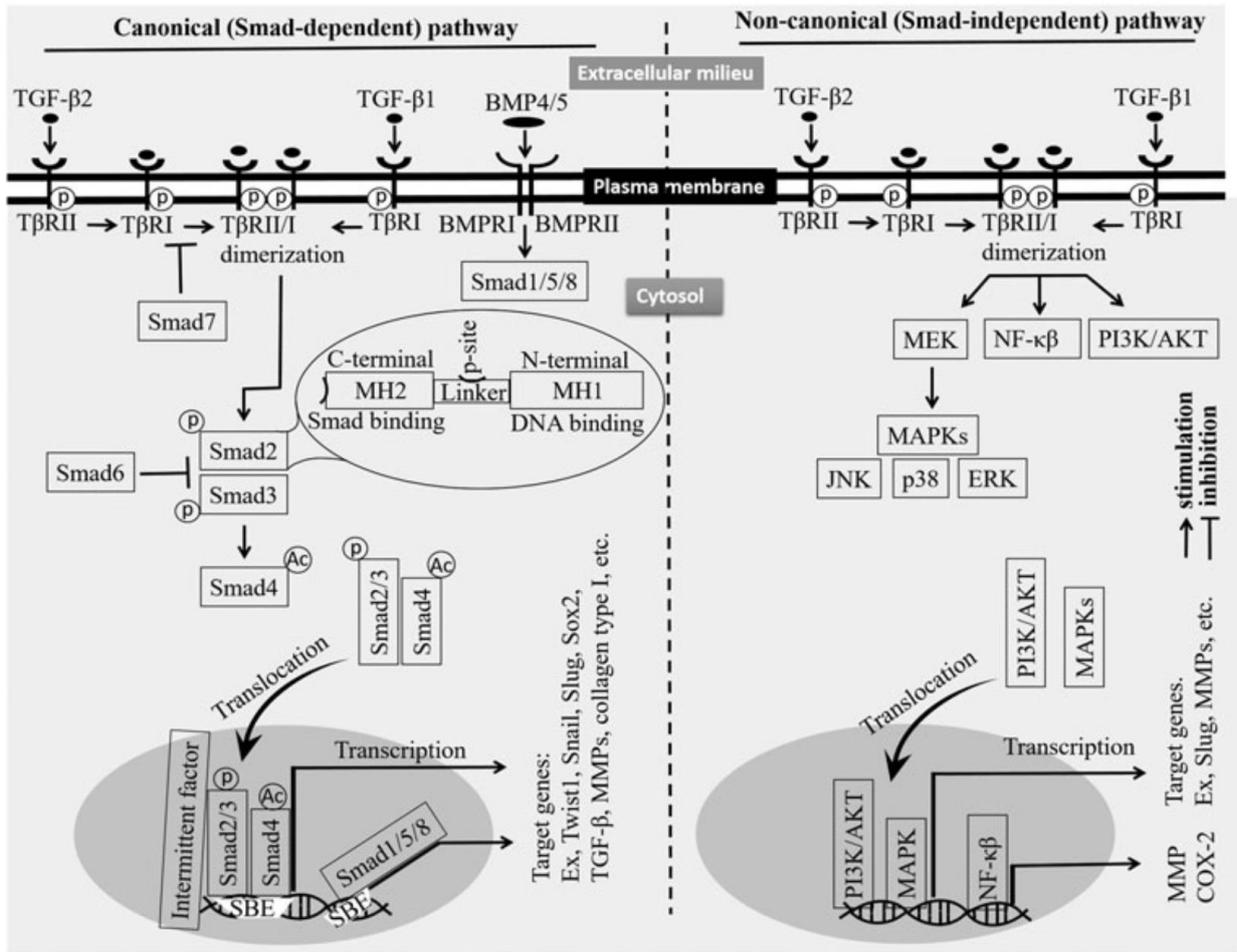


Figure 16: Les voies de TGF-β impliquées dans la TEM (Amhadi, 2018)

TGF- β se lie au récepteur TGF- β 2, qui recrute et active par phosphorylation le récepteur TGF- β 1. Le récepteur TGF- β 1 active la voie SMAD en activant SMAD 2 par phosphorylation de ses sites sérine (S208, S204 et S213) et thréonine (T179). Smad 2 phosphorylé se lie à SMAD3. Ce complexe SMAD2/3 sera transloqué dans le noyau via Smad4 (Ahmadi, 2018). Smad 2 et 4 ne possèdent pas de domaine qui se lie à l'ADN, mais Smad3 en possède un. Smad3 est un modulateur de transcription de gènes (Mao, 2019)

Smad 3 phosphorylé lié au complexe SMAD2/4 réprime l'expression de la E-cadhérine par les facteurs de transcription Snail et Slug qui induisent l'expression de protéines mésenchymateuses telles que N-cadhérine, fibronectine, vimentine (Figure 15).

Paradoxalement, dans un environnement anti-inflammatoire, TGF- β agit comme un anti-inflammatoire. Cependant, lorsque l'environnement est pro-inflammatoire, notamment en présence d'IL-6, TGF- β joue un rôle amplificateur pro-inflammatoire.

3.2 Les autres voies de signalisations impliquées

TGF- β active également d'autres voies de signalisation : PI2K/AKT, MAPK, NF κ B, Rho, TAK1, TRAF4/6 (Ahmadi, 2018)

Snail est un facteur de transcription, activé par différentes voies de signalisation dont la voie TGF- β . Lorsque le récepteur du TGF- β est activé, il active la voie Smad, mais également la voie RAS-MAPK et PI3K/Akt. Cette induction est nécessaire et suffisante pour réguler la TEM (Wang, 2013). (Figure 16)

TWEAK, cytokine de la famille de TNF- α , possède un effet pro-inflammatoire et est impliquée dans le remodelage tissulaire. La distribution tissulaire de TWEAK est plus large que celle du TNF- α . TWEAK induit la production de cytokines et chimiokines telles que TSLP, RANTES, IL-8. RANTES et IL-8 sont des chimioattractants de leucocytes sur le site de l'inflammation. Ainsi la combinaison TWEAK – TGF- β induit la TEM. TGF- β initie l'induction de cytokines par TWEAK (Matsuno, 2019).

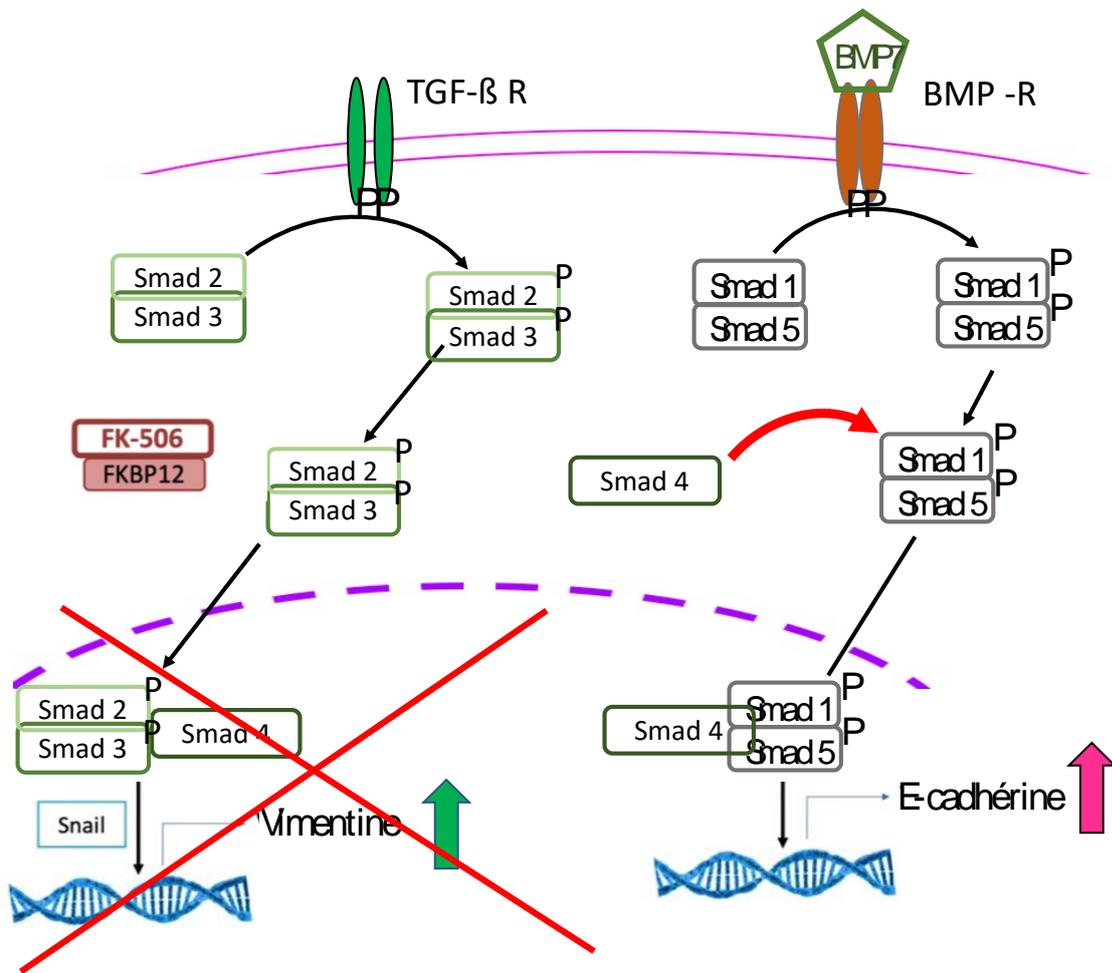


Figure 17: Mécanismes d'action du BMP7

La voie PI3K/Akt joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire et permet le maintien des caractéristiques biologiques des cellules mésenchymateuses (Figure 16). Cette voie active les facteurs de transcription Twist (Xu, 2015)

La voie Wnt est également activée. Le ligand Wnt active la voie β -caténine impliquée dans le mécanisme de remodelage pulmonaire. Le ligand Wnt se lie à son récepteur induisant la phosphorylation et l'inactivation de la GSK-3 β provoquant une accumulation de β -caténine qui sera transloqué dans le noyau. La voie Wnt et un médiateur de la voie TGF- β dans le type II de TEM (Pain, 2014).

Shh, de la voie Hedgehog Signaling, active le facteur de transcription Gli, initialement cytoplasmique, qui sera transloqué dans le noyau. Gli régule l'expression des gènes impliqués dans la prolifération à travers les cyclines. Cette voie est activée lors de réparation pulmonaire et du développement pulmonaire, permettant d'acquérir une capacité migratoire. La voie Shh en présence de TGF- β agit en synergie sur le phénomène de TEM.

3.3 Voie intracellulaire anti-fibrotique

BMP7 (Bone morphogenetic protein 7) fait partie de la superfamille des TGF- β . Son action est, entre autres, d'inhiber les effets de TGF- β . BMP7 s'oppose à l'activité fibrogénique du TGF- β (Sun, 2018). BMP7 bloque la voie canonique du TGF- β en activant le complexe SMAD1/5, se liant par compétition à SMAD4 (Figure 17). Ainsi le complexe SMAD1/5/4 est formé pour être transloqué dans le noyau (Piscione, 2001).

Pour contrer la fibrose, HGF réduit le niveau de TGF- β , restaurant ainsi les marqueurs épithéliaux tel que la E-cadhérine et diminue la quantité de MMP9. BMP7, antagoniste endogène de la TEM, induite par TGF- β , restaure la E-cadhérine par la voie Smad5 (Kalluri, 2003)

4. Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse

4.1 Marqueurs épithélieux

TWEAK régule à la baisse la E-cadhérine (Matsuno, 2019). Lors de la TEM, les jonctions sont détruites, les protéines de jonction sont relocalisées ou détruites. La E-cadhérine est clivée au niveau de la membrane plasmique puis dégradée (Yilmaz, 2009). La β -caténine ne peut plus interagir avec la E-cadhérine. Or, cette dernière favorise les interactions entre cellules : en cas de perte de la E-cadhérine il y a également perte de la polarité cellulaire.

Pour inhiber le phénomène de TEM, il est important de maintenir la E-cadhérine (Willis, 2007). Les marqueurs diminués dans la TEM sont : E-cadhérine, β -caténine, desmoplakine, ZO-1, cytokératine 18, occludine, claudine, desmoplakines présentes dans les jonctions cellulaires et les miR34, miR200 (Hermeking, 2014).

4.2 Marqueurs mésenchymateux

Dans les poumons, les cellules ayant subi une TEM expriment rarement α -SMA, les cellules pulmonaires se transforment rarement en myofibroblastes, en revanche elles deviennent majoritairement des fibroblastes produisant de la vimentine, filament intermédiaire mésenchymateux (Tanjore, 2009) (Degryse, 2011) (Hill, 2019).

Les marqueurs mésenchymateux sont représentés par la vimentine, le collagène I, la « fibroblast specific protein 1 » (FSP1), ainsi que Snail, Slug, SIP1, MMP2, MMP9, fibronectine, (Kalluri, 2003). La N-cadhérine est surexprimée durant la TEM. Cette cadhérine va changer l'adhésion cellulaire, permettant la perte de jonction cellule-cellule et l'acquisition d'une affinité plus forte avec les cellules mésenchymateuses (Theveneau, 2012).

Chapitre 4

L'impact des microparticules dans la bronchiolite oblitérante

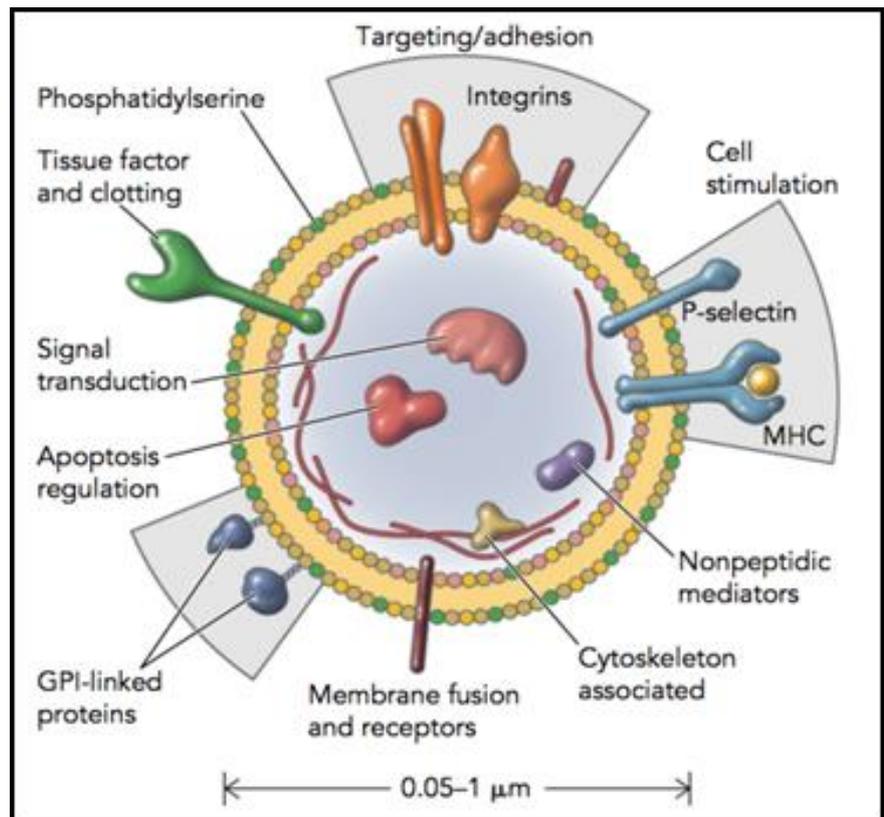
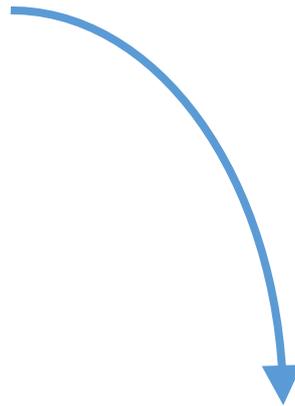
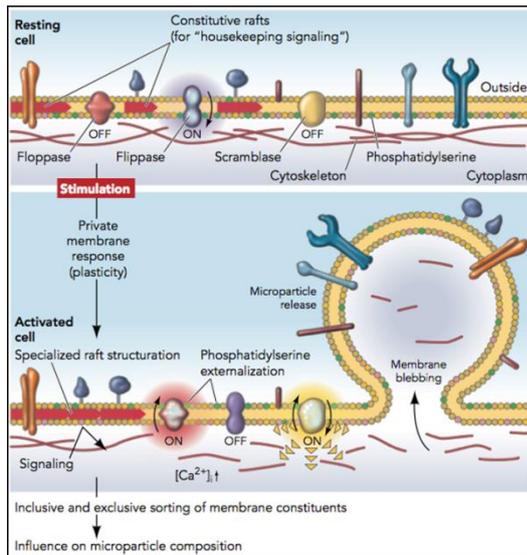


Figure 18: Remodelage membranaire et émission de microparticules par des cellules soumises à un stress (Hugel, 2005)

En réponse à la stimulation, l'activité floppase induit le transport rapide de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Pour la génération de microparticules, les calpaïnes et les kinases ROCK favorisent le bourgeonnement de la membrane plasmique et l'émission des microparticules.

1. Origine

Les microparticules (MPs), aussi appelées microvésicules, sont des fragments de membrane plasmique de 50 à 1000nm de diamètre. Elles sont caractéristiques de la membrane des cellules qui les ont émises, du stress initiateur et des molécules présentes dans leur environnement fluide ou tissulaire (Figure 18). Les MPs possèdent donc les mêmes caractéristiques membranaires que la cellule émettrice (Olland, 2016).

Elles portent les composants membranaires spécifiques de la cellule, ainsi qu'une fraction du contenu cytosolique présent au site d'émission membranaire. Dans le vaisseau sanguin, elles sont principalement d'origine plaquettaire, mais aussi leucocytaire, endothéliale ou érythrocytaire.

Parmi les vésicules extracellulaires, les MPs se distinguent des exosomes et des corps apoptotiques (Lin-Li LV, 2019) :

- Corps apoptotique : diamètre 200nm à 5µm : provient de la membrane plasmique de cellules en apoptose
- Microvésicule : diamètre 100 à 800 nm : provient de membrane plasmique de cellules viables, après exposition de la phosphatidylsérine
- Exosome : diamètre 30 à 150nm : libéré dans l'espace extracellulaire quand des corps multivésiculaires fusionnent avec la membrane, contenant des molécules actives

2. Mécanisme de formation

Les MPs reflètent un équilibre dynamique entre prolifération cellulaire, stimulation et mort cellulaire (Morel, 2011). Les MPs sont générées par une asymétrie de distribution des phospholipides membranaires lors d'un stress cellulaire ; les MPs sont libérées à la suite de la surcharge transitoire du feuillet externe en phosphatidylsérine (PS) associée à une dégradation accélérée du cytosquelette en réponse à l'influx calcique induit par la stimulation.

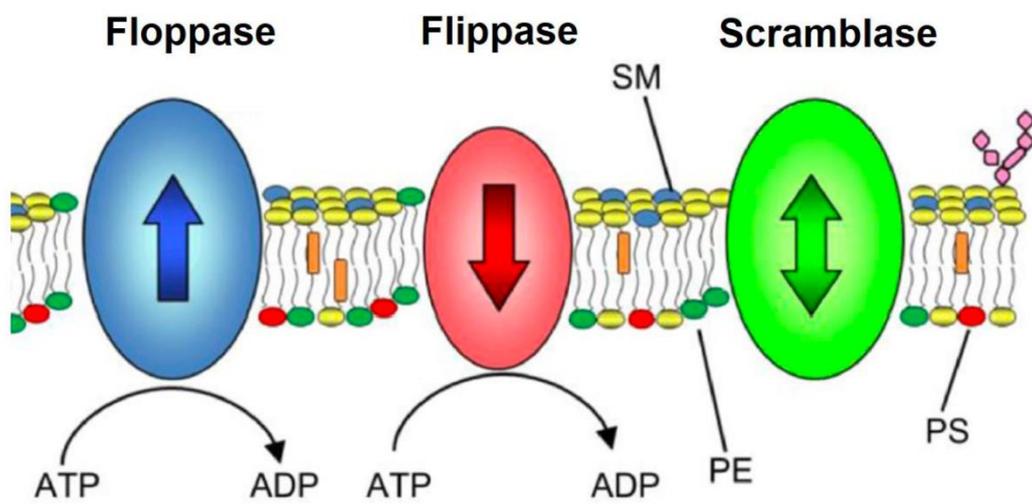


Figure 19: Transporteur des phospholipides membranaires (Coleman, 2013)

La phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE), qui normalement sont du côté interne du feuillet membranaire, se retrouvent sur le feuillet externe, ainsi ils sont exposés à leur environnement extracellulaire. En particulier, les MPs sont caractérisées par l'exposition de PS qui leur confère un caractère procoagulant lorsqu'elles circulent dans le sang (Ridger, 2017).

L'asymétrie est due à un transporteur ATP-dépendant : l'aminophospholipide translocase provoquant un phénomène de « flip-flop » grâce à une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} . Cette augmentation calcique provoque une diminution de l'activité de la flippase et une augmentation de la floppase (Figure 19).

Les caspases cytoplasmiques et les calpaines sont des thiols protéases dépendantes du Ca^{2+} permettant la réorganisation du cytosquelette. La caspase 3 est un facteur de réorganisation du cytosquelette, intervenant dans le clivage de ROCK 1 (rho-kinase) agissant par phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. L'activation de la myosine contracte la membrane cellulaire, provoquant le rétrécissement membranaire, libérant ainsi des MPs (Morel 2011).

3. Les microparticules en transplantation : biomarqueurs/bioeffecteurs

Plusieurs études ont montré que les MPs peuvent jouer un rôle comme biomarqueurs et en tant que bio-effecteurs. Les MPs ont été étudiées comme biomarqueurs dans le rejet aigu cardiaque (Morel, 2008) et le rejet cellulaire ou humoral dans la greffe d'îlots pancréatique (Toti, 2011), (Bakouboula, 2011). Les MPs ont aussi une qualité de bio-effecteurs dans la mesure où elles se comportent comme de véritables navettes biologiques qui disséminent un signal biologique de la cellule parentale à une cellule cible (Constantinescu, 2014).

Les MPs sont de puissants médiateurs permettant l'échange d'information. Les MPs sont capables de moduler les propriétés biologiques des cellules voisines par plusieurs mécanismes. Les MPs permettent de transférer des récepteurs associés à la membrane, de libérer des protéines activées dans le cytoplasme de la cellule cible, d'échanger des informations génétiques par le transfert d'ARN et d'induire une réponse immunitaire adaptative.

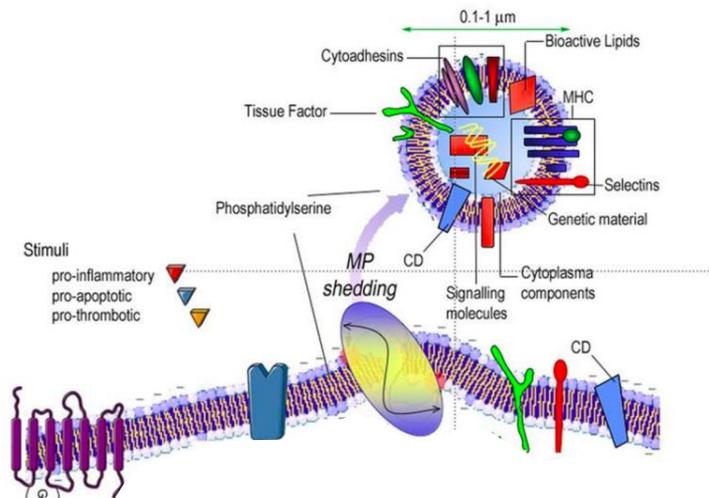


Figure 20: Microparticules (Bakouboula, 2011)

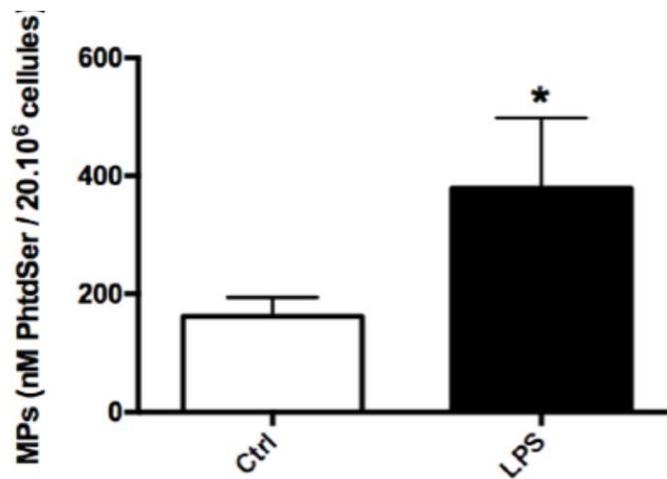


Figure 21: Représentation graphique de l'émission de MPs de monocytes humains après stimulation au LPS de *P. Aeruginosa* (Renaud-Picard, 2017)

Dans des conditions pathologiques, telles qu'une inflammation, la propagation des MPs peut amplifier la réponse inflammatoire (Morel, 2011).

D'ailleurs, les facteurs de coagulation Xa semblent impliqués dans la fibrose pulmonaire. Les MPs activeraient ces protéases par la PS et le facteur de tissulaire (FT) engendrant une coagulation. Le facteur VIIa s'associe au FT, exprimé sur les cellules non vasculaires.

Le complexe FVIIa/TF active FX (facteur X ou prothrombinase) en FXa : active la prothrombine en thrombine. Les MPs sont libérées lors de l'activation cellulaire ou d'apoptose. FXa induit la différenciation des cellules épithéliales en fibroblastes (Novelli, 2014)

4. Microparticules pro-inflammatoires

L'épithélium pulmonaire participe à la défense contre les pathogènes. Le processus inflammatoire pulmonaire est dû au recrutement des leucocytes et des chimiokines qui sont des molécules d'adhésion. Les MPs pro-inflammatoires de monocytes régulent les chimiokines et autres molécules d'adhésion (Cerri, 2016). Au sein du laboratoire, il a été observé que l'émission de MPs leucocytaires et leurs propriétés sur la cellule épithéliale bronchique étaient variables selon l'origine cellulaire ainsi que le type de stimulation subi par la cellule émettrice (Figure 20). Les MPs lymphocytaires provenant de la stimulation par le TNF- α ont un effet anti-apoptotique, renforçant le rôle de barrière des cellules épithéliales alors que les MPs monocytaires d'origine infectieuse induisent une modification de l'expression des protéines membranaires en faveur de l'initiation de l'EMT (Figure 21). Cette étude ouvre une perspective sur la dualité des MPs leucocytaires dans l'EMT et sur leur importance respective dans la dysfonction épithéliale bronchique (Renaud-Picard, 2017)

Les MPs leucocytaires régulent la synthèse d'IL-6 et d'IL8 par les cellules endothéliales. Les MPs lymphocytaires et monocytaires induisent la synthèse de MMP et de cytokines par des fibroblastes. Les MPs sur les cellules pulmonaires ont un effet pro-inflammatoire induisant l'activation de NF κ B (Neri, 2011).

Chapitre 5

Le double jeu des immunosuppresseurs

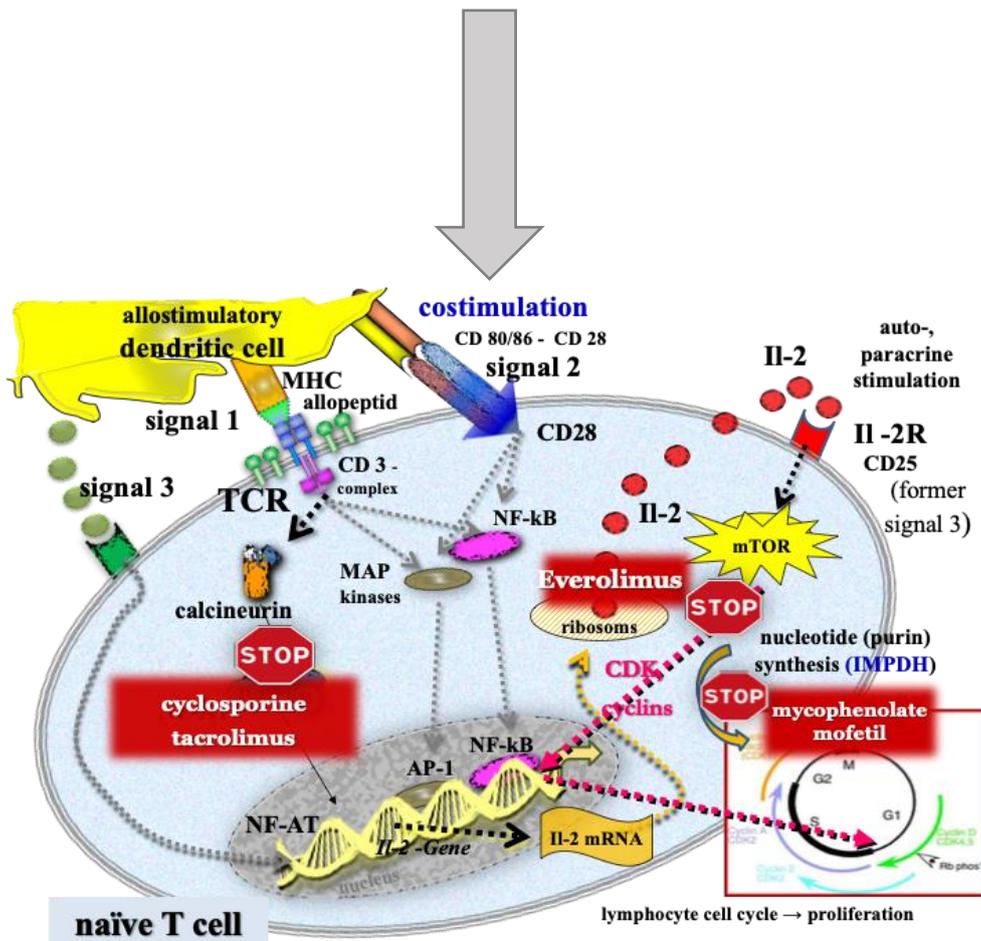
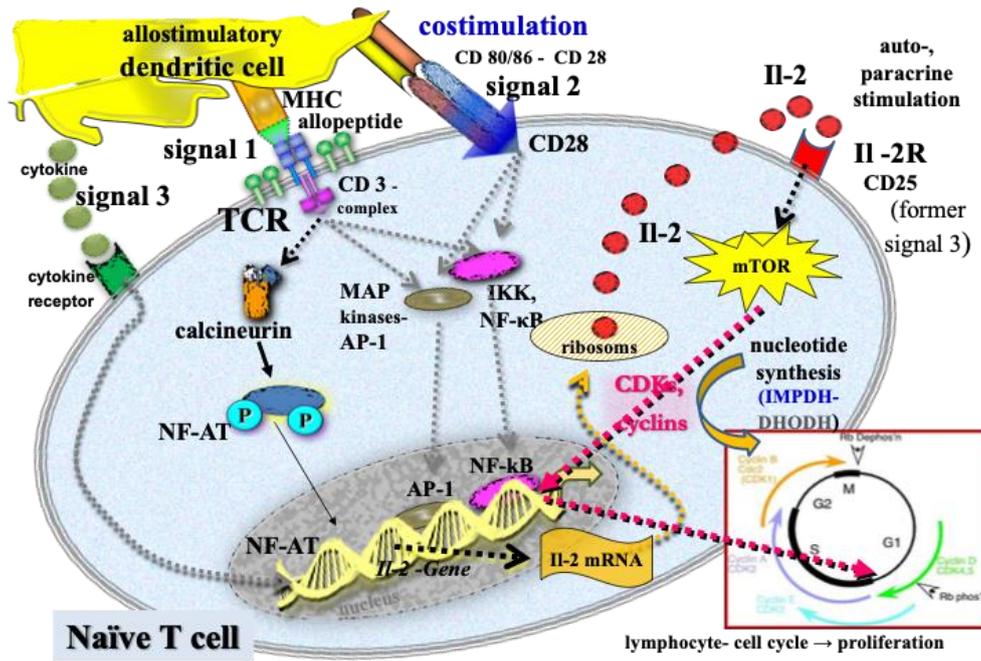


Figure 22: Mécanismes des immunosuppresseurs (Walter Gottlieb Land, 2016)

1. Caractéristiques et mécanismes des immunosuppresseurs

Après transplantation, le patient suit un protocole d'IS : une immunosuppression d'induction prévenant le rejet aigu post-greffe immédiat et une immunosuppression de maintenance permettant d'éviter les épisodes de rejet aigu et de rejet chronique (Scheffert,2014). L'immunosuppression de maintenance est un traitement au long cours. Les patients greffés pulmonaires sont soumis à un traitement immunosuppresseur à vie comportant généralement un inhibiteur de la calcineurine, un agent antiprolifératif et des corticostéroïdes (Figure 22).

1.1 Inhibiteurs des calcineurines

Les inhibiteurs de calcineurines inhibent l'activité phosphatase de la calcineurine et préviennent l'activation et la prolifération des cellules immunes en maintenant le facteur de transcription NFAT sous les formes phosphorylées restant dans le cytoplasme (Contantinescu, 2014). Les inhibiteurs des calcineurines les plus utilisés en transplantation sont la Cyclosporine et le Tacrolimus (TAC).

La cyclosporine est un composé lipophile, se liant à une cyclophiline intracellulaire des LT formant un complexe prévenant la transcription de l'IL-2, induisant une diminution de l'activation et de la prolifération des LT (Matsuda, 2000).

Le TAC est 10-100 fois plus puissant que la cyclosporine. Les effets secondaires les plus fréquents des inhibiteurs des calcineurines sont la néphrotoxicité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, la neurotoxicité et le diabète (Watkins, 2012).

1.2 Agent antiprolifératif

L'azathioprine, est une « pro-drug » convertie en 6-mercaptopurine puis en différents composés qui sont incorporés dans l'ADN des cellules en répllication, bloquant la synthèse de nucléotides puriques *de novo*, inhibant ainsi la prolifération cellulaire. Les effets secondaires fréquents sont liés à la toxicité médullaire avec une leucopénie et une anémie (Taylor, 2005)

Le mycophénolate mofétil (MMF) converti en métabolites actifs devient l'acide mycophénolique (MPA) inhibant la déshydrogénase monophosphate, responsable de la

biosynthèse *de novo* de GTP bloquant ainsi la prolifération des LT et LB. MMF subit une absorption rapide et se convertit en MPA. Le MPA est métabolisé en acide mycophénolique glucuronique (MPAG) dans le foie. MPAG est excrété par la bile dans l'intestin, MPAG est reconverti en métabolite actif, provoquant un 2^{ème} pic de concentration dans le plasma (Holt, 2002).

1.3 Inhibiteurs des mTOR

Les inhibiteurs des mTOR sont également utilisés en transplantation pulmonaire, en seconde intention, comme alternative aux autres IS. (Nanmoku, 2019).

Les inhibiteurs des mTOR sont le Sirolimus et l'Évérolimus (EVE). Ils se lient à FKBP12 bloquant mTOR (mais n'inhibent pas la calcineurine). Les effets secondaires sont une cicatrisation retardée, une leucopénie et une thrombocytopenie (Scheffert, 2014)

1.4 Corticoïdes

Les corticoïdes sont utilisés dans l'immunosuppression d'induction mais également dans l'immunosuppression de maintenance. Les corticoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires en inhibant la voie NFκB. Ils inhibent également la prolifération des LT, diminuent l'activation des macrophages et altèrent la migration lymphocytaire (Barnes, 2005).

Les effets secondaires possibles sont l'hypertension artérielle, un gain de poids, une hyperlipidémie, un diabète, une ostéoporose, une difficulté de cicatrisation.

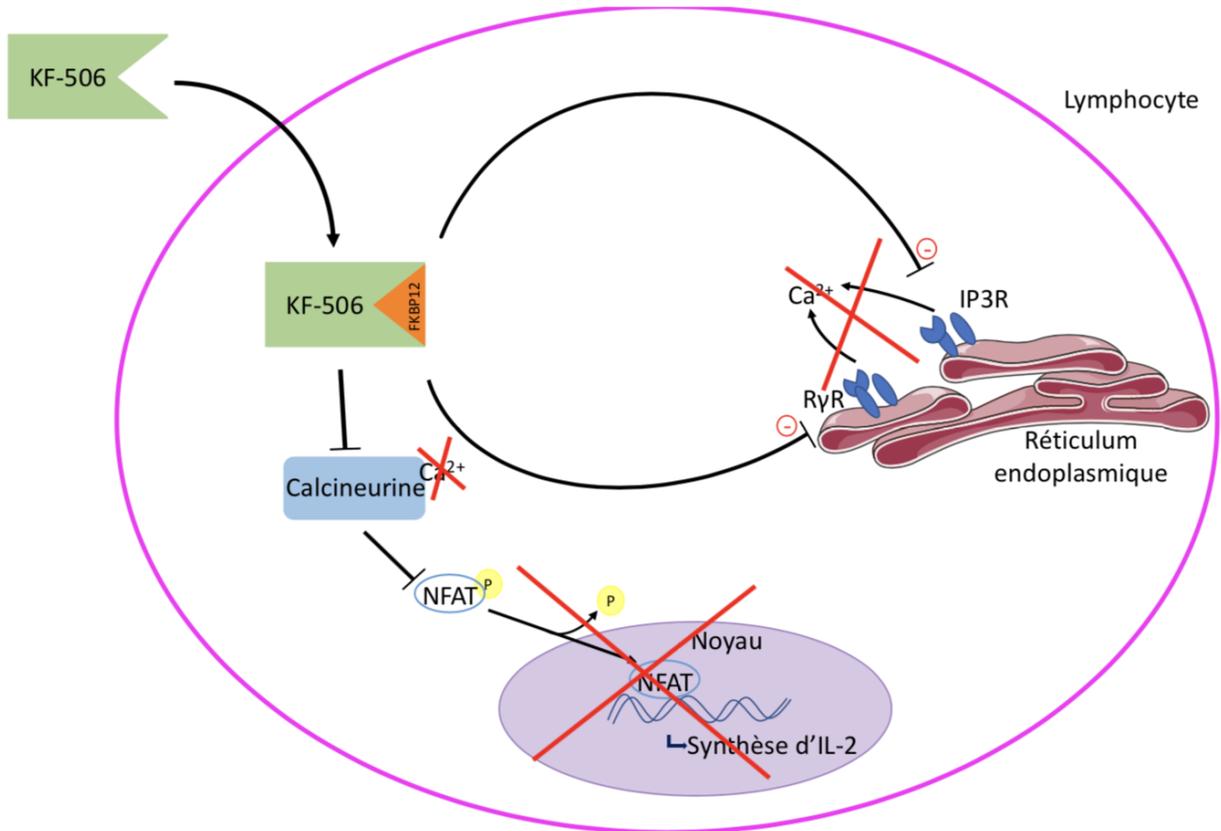


Figure 23: Mode d'action du Tacrolimus

Dans le cytoplasme de la cellule, le TAC se lie par compétition à FKBP12 en inhibant les canaux calciques R_yR et IP3R bloquant la libération de calcium dans le milieu cytoplasmique. Ce complexe neutralise ainsi la calcineurine. Cela se traduit par une non-déphosphorylation du facteur de transcription NF-AT qui ne pourra plus être transloqué dans le noyau inhibant ainsi la synthèse de cytokines dont IL-2 bloquant la prolifération des lymphocytes.

2. Le Tacrolimus

2.1 Origine

Le TAC appelé également FK-506, est un macrolide lactone lipophile de poids moléculaire 803,5 Da (Dheer, 2018). Cet IS a été décrit à la fin des années 80' (Okuhara, 1994, Tanaka, 1987). TAC a été découvert dans les années 1990, isolé de la bactérie *Streptomyces tsukubaensis* (Wang, 2019). TAC est le plus souvent utilisé par rapport à la cyclosporine (Boots, 2005) car il donne une meilleure innocuité ainsi qu'une meilleure survie chez les patients (Furlong, 2000) (Jurewicz, 2003).

2.2 Pharmacocinétique

Le TAC a des propriétés antibiotiques et se lie à FKBP12 dans la cellule. FKBP12, FK506-binding-protein, est une immunophiline de 12kDa (Xu, 2002). Cette dernière est une protéine ubiquitaire qui se lie aux canaux calciques intracellulaires et au récepteur 1 du TGF- β (Liu, 1991). Ainsi FKBP12 inhibe la voie du TGF- β par la liaison de cette protéine au récepteur (Friedman, 1991). Lorsque le récepteur du TGF- β est lié à son ligand, le récepteur est activé et FKBP12 perd l'interaction (Snyder, 1998) (Figure 23).

Lorsqu'il y a un excès de TAC, par compétition, FKBP12 quitte le récepteur du TGF- β pour se lier au TAC et le récepteur peut phosphoryler et activer la voie SMAD indépendamment de son ligand. FKBP12 se lie au site intracellulaire du TGF- β , car sans cela, le récepteur serait activé de manière constitutive. La liaison entre leucine/proline de FKBP12 et leucine/proline à proximité des sites de phosphorylation activateurs de TGF- β inhibe la phosphorylation du récepteur 1 du TGF- β par le récepteur 2 du TGF- β (Aghdasi, 2000).

Par défaut, FKBP12 est associé au récepteur 1 du TGF- β , mais également à l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) qui est un canal calcique. Le rajout de FK506 induit une rupture de ce complexe et modifie la conductance du canal (Okadome, 1996), ce qui provoque le blocage de sortie du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique. Le complexe TAC-FKBP12 inhibe l'activité de la calcineurine calcique et dépendante de la calmoduline ayant une activité phosphatase car la calcineurine est liée au récepteur d'IP3 par FKBP12 afin d'être activée. Lorsque TAC est présent, FKBP12 se détache du complexe provoquant l'inactivation de la calcineurine (Cameron, 1995).

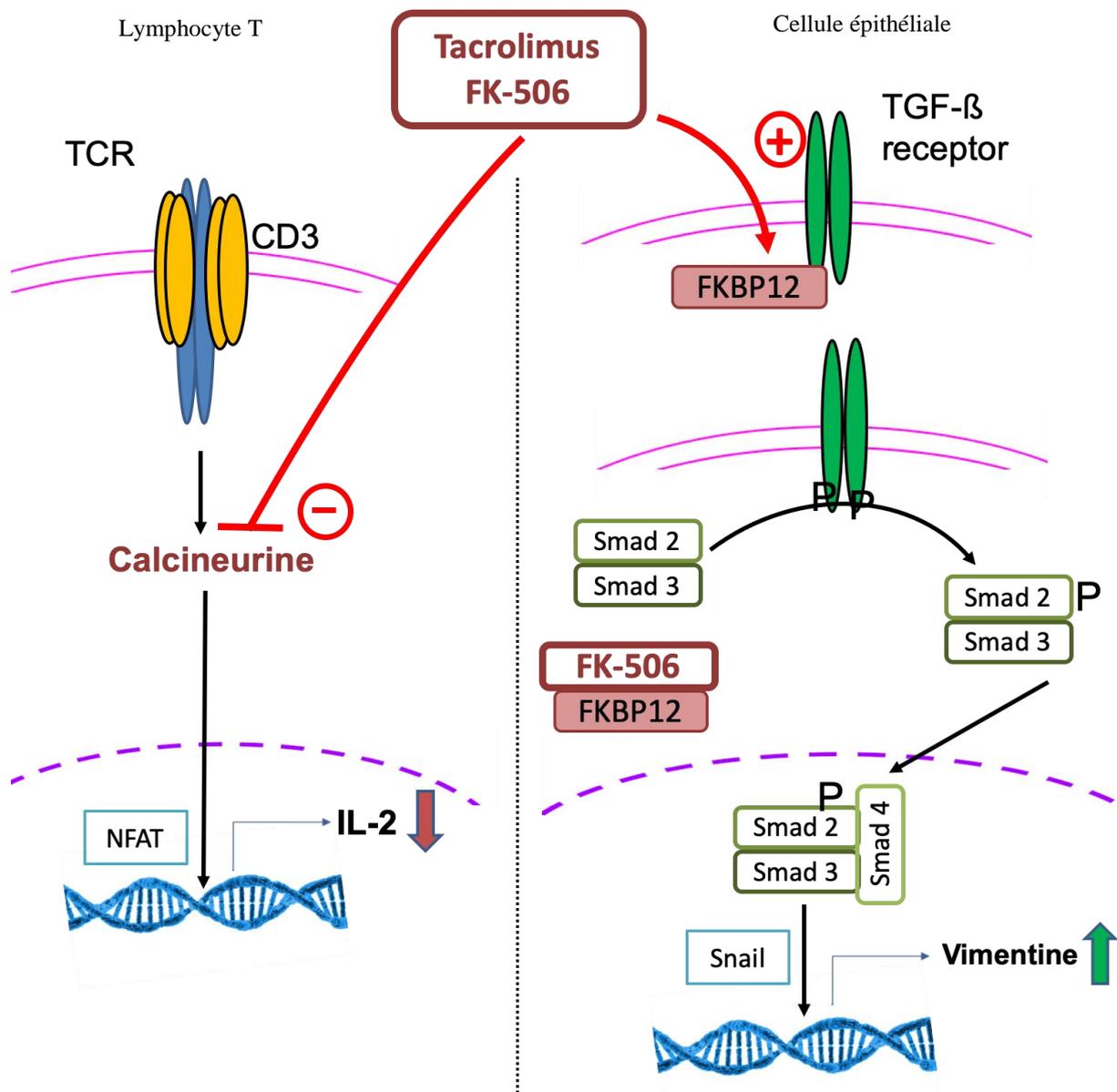


Figure 24: Mode d'action du TAC dans les cellules immunes et non immunes

Ainsi, le TAC bloque la déphosphorylation du facteur nucléaire des LT activés (NFAT). TAC inhibe l'activation des LT et autres cellules inflammatoires et inhibe ainsi la libération d'IL-1 β , GM-CSF, TNF- α et IFN- γ . Le TAC peut supprimer la réponse immune indépendante de la calcineurine : il diminue ainsi la régulation de NF κ B, module l'expression de VEGF, de molécules d'adhésion de matrice extracellulaire et de TGF- β (Kimsa, 2016). Le complexe TAC-FKBP12 limite donc la production d'IL-2 qui est un facteur de croissance autocrine pour le LT lui-même (Nasr, 2000) (Figure 24).

2.3 Pharmacodynamie

Le TAC possède un index thérapeutique faible, avec une forte variabilité intra et interindividuelle.

La concentration résiduelle sérique cible de TAC est en générale de 10-15 μ g/L au cours des 3 premiers mois puis 5-12 μ g/L. La biodisponibilité du TAC, au plus faible est de 10% (Darley, 2019). La disponibilité du médicament n'est pas la même pour chaque patient, cela provient de la métabolisation du TAC par CYP3a5 dans le foie et des polymorphismes associés (Zhang, 2017) (Vanhove, 2016).

TAC a des propriétés biopharmaceutiques médiocres comme une solubilité dans l'eau assez faible allant de 4 à 12 g/mL ainsi qu'une biodisponibilité d'environ 21 % uniquement, en raison de l'effet de premier passage considérable via le gène CYP-450 3A4 dans l'intestin ainsi que l'absorption hépatique qui est encore entravée par l'efflux de la glycoprotéine P appelée MDR1 (Hebert, 1997) (Vanhove, 2017) (Yigitaslan, 2016).

2.4 Effets indésirables du TAC

L'effet secondaire le plus commun est la néphrotoxicité provoquant des lésions rénales ; c'est la principale raison de la non-observance des patients chroniques (Stratta, 2005) (Cosner, 2015) (Nankivell, 2003). Le TAC induit une vasoconstriction des artéioles glomérulaires afférentes et efférentes avec une réduction du débit sanguin rénal et du débit de filtration glomérulaire. Ces altérations entraînent une dysfonction des cellules endothéliales et la formation de plaque d'athérome (Lamas, 2005).

Le diabète post-transplantation est également un effet indésirable majeur du TAC, facteur de risque important dans les maladies cardiovasculaires (Katari, 1997).

Le TAC induit également une neurotoxicité allant des maux de tête, à l'apparition de convulsions et d'un coma (Toledo Perdomo, 2012) (Wu., 2016). Le TAC, comme tout IS favorise les infections et la survenue de cancers (Costa, 2017).

D'autres effets indésirables sont imputés au TAC telles que l'alopecie, l'hyperkaliémie, une hypercholestérolémie et une hypertension (Higgins, 2004) (Hoorn, 2011),(Ilyas, 2017) (Scott, 2003) (Triñanes, 2017) (Flechner, 2008) (Heisel, 2004).

3. L'Évérolimus

3.1 Origine

L'EVE est un analogue du Sirolimus, d'un poids moléculaire de 958Da ayant des propriétés immunosuppressives (Schuler, 1997) (Eng, 1991) (Kirchner, 2004). Le Sirolimus est un macrolide découvert en 1975, isolé de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* (Hasskarl, 2012) (Senhgal, 1995). L'Évérolimus a eu l'autorisation de mise sur le marché en 2003, en France.

3.2 Pharmacocinétique

EVE se lie également à FKBP12 comme TAC, mais inhibe, quant à lui, une protéine cible « mammalian Target Of Rapamycin » (mTOR) (Roman, 2011) (Figure 25). Le complexe EVE-FKBP12 se lie à mTOR bloquant la phosphorylation de p70S6kinase engendrant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Ciolczyk-Wierzbicka, 2020). EVE est un inhibiteur allostérique de mTORC1, un inhibiteur du signal prolifératif (Masola, 2015).

mTOR est une protéine sérine-thréonine kinase intracellulaire qui régule la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Ainsi EVE inhibe la prolifération cellulaire des cellules stimulées par des facteurs de croissance. mTOR appartient à la famille des PI3 kinases (Mak, 2004), composée de 2 sous unités: mTORC1 et mTORC2 (Saxton, 2017), (Jacinto, 2004) (Figure 26).

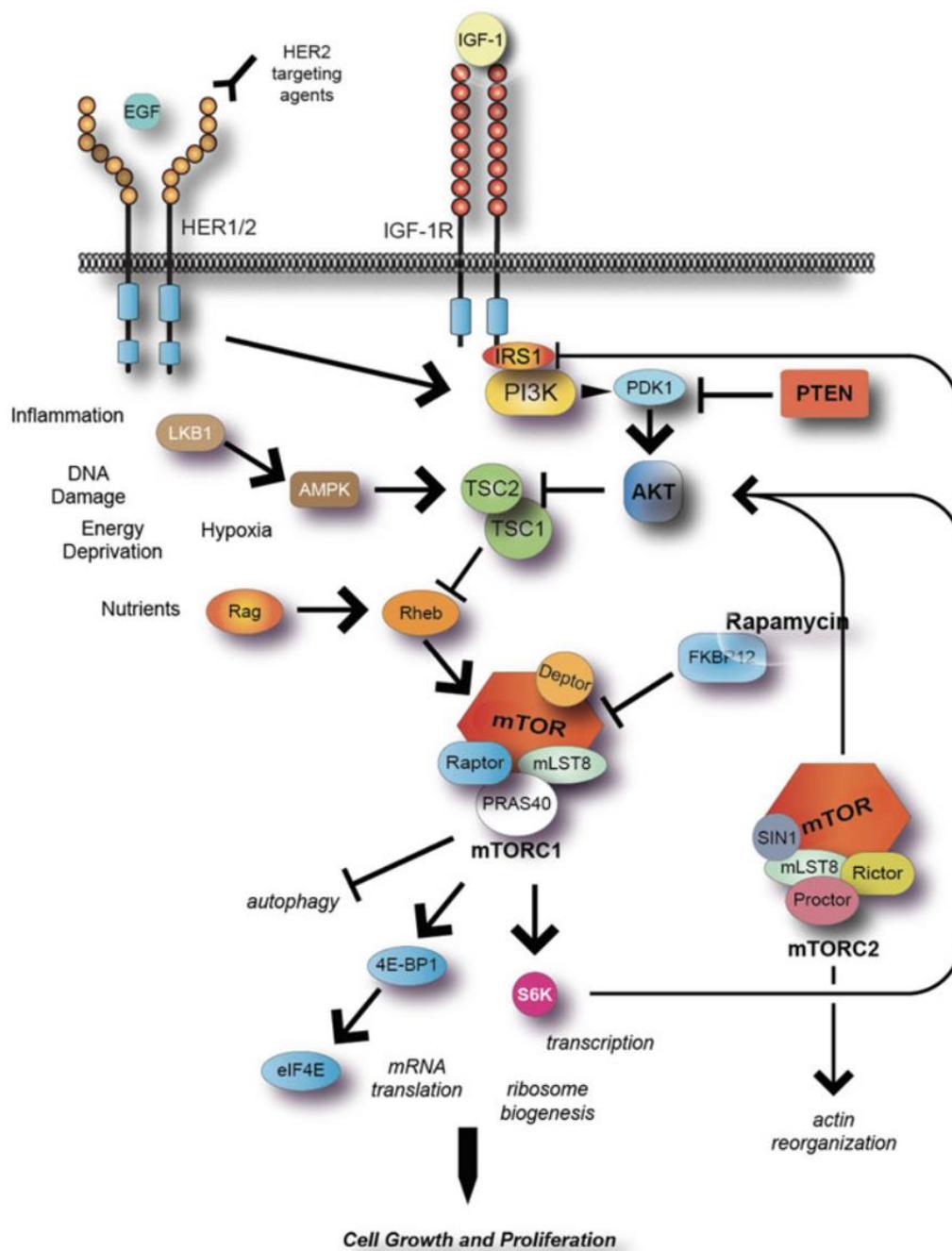


Figure 25: Mécanismes de mTOR (Hasskarl, 2018)

mTOR forme au sein de la cellule deux complexes mTORC1, une protéine kinase qui régule la traduction et la croissance cellulaire (Chapman, 2007) et mTORC2 impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, dans la survie, et l'apoptose.

L'inhibition de mTOR peut paradoxalement jouer un rôle pro-TEM ou anti-TEM (Han, 2018).

3.3 Pharmacodynamie

L'EVE a une marge thérapeutique étroite avec une forte variabilité intra et interindividuelle.

La concentration résiduelle sérique cible d'EVE est de 3 à 8µg/L. La biodisponibilité de l'EVE est faible et cette différence de biodisponibilité provient de la métabolisation de l'EVE par CYP3a4 et des polymorphismes associés (Crow, 1999).

L'EVE a une biodisponibilité d'environ 16 % en raison de l'effet de l'absorption intestinale, du premier passage hépatique via le gène CYP-450 3A4 et de l'efflux de la glycoprotéine P appelée MDR1 qui relargue l'EVE dans le milieu extracellulaire (Yacyshyn, 1996), (Crowe, 1998), (Lampen, 1998), Jacobson, 2001).

3.4 Effets indésirables

L'EVE induit une néphrotoxicité moindre que le TAC (Geissler, 2008) Cependant, l'EVE induit des effets indésirables similaires au TAC tels que des infections urinaires (Schena, 2009), des formations tumorales cutanées malignes, une leucopénie (Augustine, 2004), une hyperlipidémie (MacDonald, 2001), un diabète sucré (Basic-Jukic, 2010). L'EVE provoque également des insomnies, des céphalées. L'EVE diminue la spermatogenèse responsable de troubles de la fertilité chez l'homme si le traitement est pris au long cours (Kirsanov, 2020).

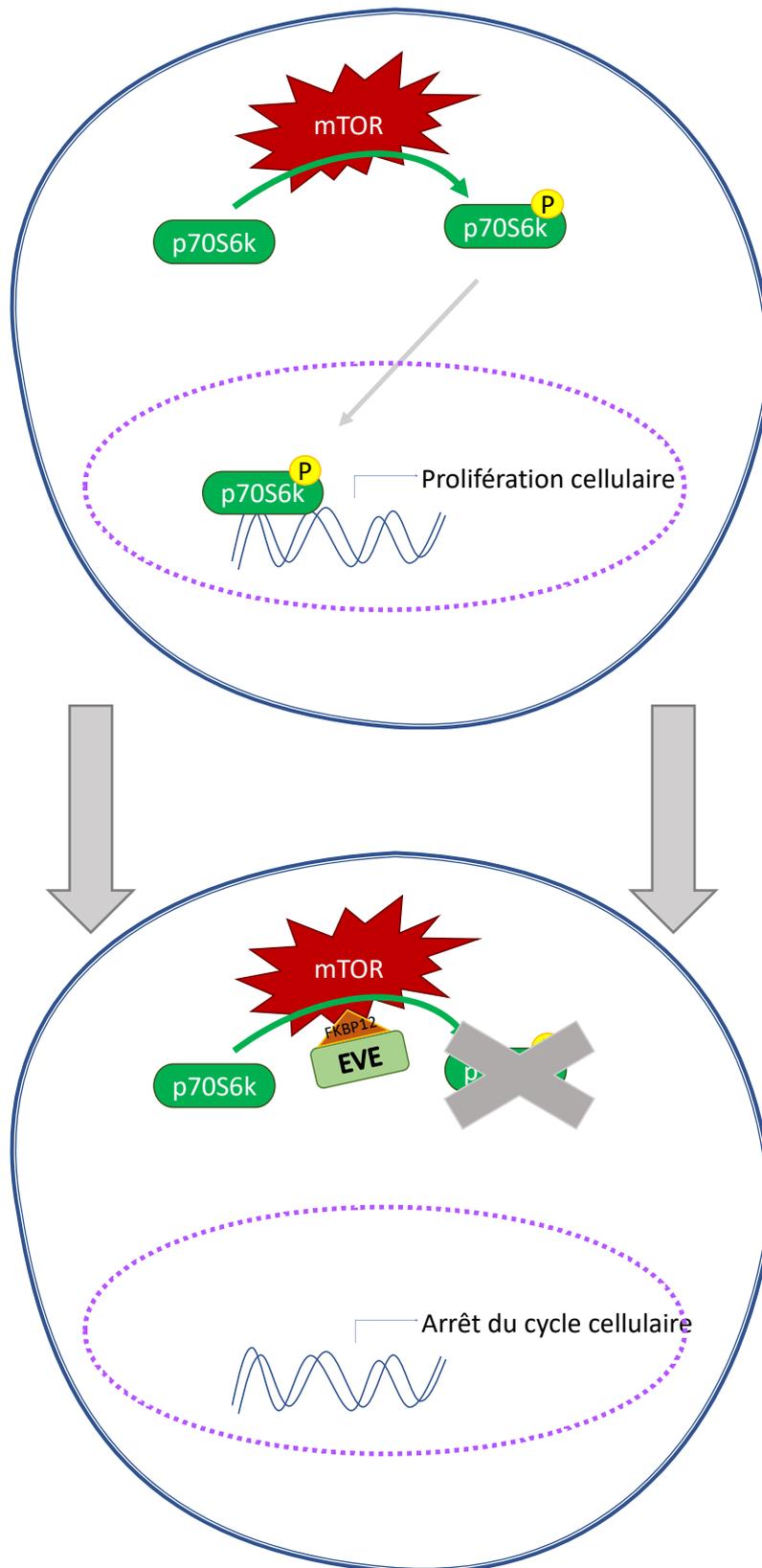


Figure 26: Mécanismes de l'Everolimus

Chapitre 6

*Intérêt des modèles pour l'étude
de la bronchiolite oblitérante*

1. Modèle 2D

La recherche fondamentale s'appuie sur de nombreuses études basées sur la culture cellulaire en 2 dimensions, c'est-à-dire une culture de cellules formant un tapis cellulaire. La culture 2D étant la plus ancienne est donc la plus présente dans la littérature. Elle représente plusieurs avantages non négligeables. La culture 2D est bien connue et est donc facilement réalisable, peu onéreuse puisque la technique ne demande qu'un investissement minimal comprenant du milieu de culture et des flasques. Cette technique est hautement reproductible, l'environnement cellulaire est modulable et les cellules sont facilement visualisables par un simple microscope optique.

Cependant, ce modèle a des limites. Les cellules prolifèrent sur une surface plane alors que leur environnement naturel correspond à une organisation tridimensionnelle. D'ailleurs, toutes les cellules ne se comportent pas de la même manière *in vitro* et *in vivo* et elles n'expriment pas/plus nécessairement les mêmes gènes ou protéines présentes *in vivo*. (Gomes, 2017). L'exposition à la matrice extracellulaire est différente entraînant une polarité cellulaire différente avec des modifications du métabolisme et de l'expression protéique (Antoni, 2015). Ainsi, les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire font défaut (Foglietta, 2020).

Les cultures de cellules en 2D ne représentent pas l'organisation spatiale des cellules *in vitro*.

2. L'intérêt du modèle 3D

2.1. Définition

Le modèle 3D comprend une organisation tridimensionnelle cellulaire permettant de mimer plus fidèlement les interactions cellules-cellules mais également cellules-environnement. Une des utilisations du modèle 3D est de pouvoir comprendre les mécanismes impliqués dans une pathologie donnée avant de passer sur un modèle murin bien plus coûteux.

Le 3D est utilisé pour la régénération de cartilage articulaire par des chondrocytes autologues ou la régénération de tissus adipeux (Gullota, 2018) entre autres.

Ce modèle est également très utilisé en pharmacologie pour le criblage, la pharmacocinétique, l'utilisation de bioréacteur perfusé (Powers, 2012).

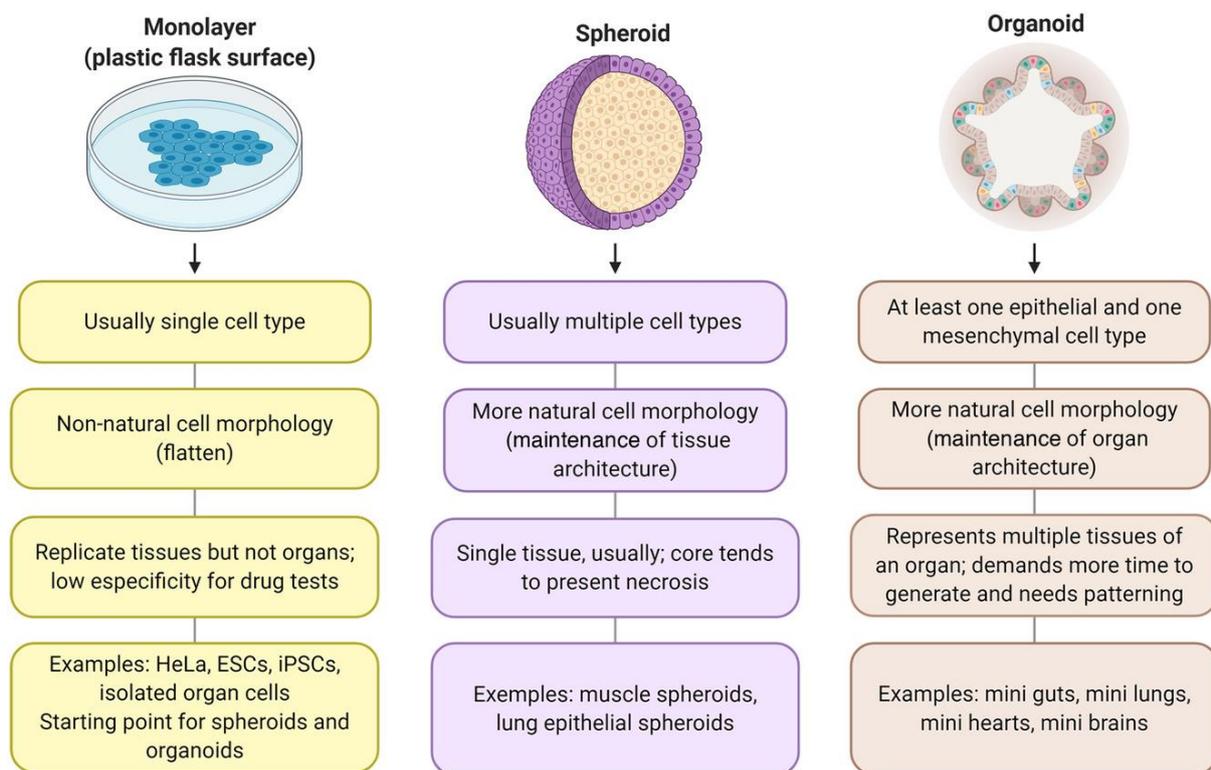


Figure 27: Différence entre la culture en monocouche et la formation de sphéroïde et d'organoïde (Sakalem, 2021)

Cependant, l'utilisation la plus fréquente du 3D est pour l'étude de la biologie tumorale. Il permet l'analyse de l'invasion, de la formation des métastases, de l'interaction cellules – cellules et cellules – matrice extracellulaire (Fang, 2017). Cette technique permet d'utiliser directement les cellules provenant de patients (Bregenzler, 2019).

2.2. Le modèle 3D : sphéroïde/organoïde

Le modèle 3D se décline en deux groupes : les sphéroïdes et les organoïdes (Figure 27). Tous deux sont des amas de cellules, cependant leur structure et leur formation diffèrent. Les organoïdes forment des structures non homogènes alors que les sphéroïdes forment une sphère plus ou moins concentrique (Corning®).

i. Organoïdes

Les organoïdes sont des amas complexes de cellules spécifiques à un organe donné, telles que des cellules de l'estomac, du foie ou du poumon. Ils sont constitués de cellules souches ou de cellules progénitrices et s'auto-assemblent à l'aide d'un « scaffold » lorsqu'ils sont placés dans un environnement extracellulaire. Ces structures se développent à partir de cellules souches embryonnaires, des cellules souches pluripotentes induites, de cellules souches somatiques ou de cellules cancéreuses. La formation de la structure est comparable à un organe parent viable pour une étude 3D. Ils représentent l'architecture et la physiologie 3D de l'organe intact (Bredenoord, 2017).

Les organoïdes sont utilisés dans la modélisation de maladies ainsi que dans l'optimisation de la découverte de nouveaux médicaments. Les organoïdes sont également utilisés pour étudier le développement des organes et de l'édition des gènes par l'utilisation de CRISPR. Les organoïdes peuvent fournir un aperçu des signatures mutationnelles de certains cancers et imitent la physiopathologie des tumeurs humaines. Les organoïdes sont de véritables organes parents miniatures (Corning®)

ii. Sphéroïdes

Les sphéroïdes sont de simples amas de cellules à large spectre tels que des tissus tumoraux ou des cellules différenciées. Ils ne nécessitent pas de « scaffold » pour former une telle structure.

Les cellules s'agglutinent les unes aux autres pour former un sphéroïde. Les sphéroïdes ne peuvent pas s'autoassembler, ou se régénérer.

La formation de sphéroïdes est une agrégation de cellules avec des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire fortes. La structure 3D mime le microenvironnement cellulaire (Foglietta, 2020).

Les sphéroïdes permettent de comprendre le microenvironnement *in vivo* des tumeurs permettant de prédire l'efficacité des médicaments dans la recherche sur le cancer.

Les sphéroïdes peuvent aussi être utilisées pour le développement de corps embryoides (Corning®).

2.3. Formation des sphéroïdes

Au départ, les cellules sont cultivées sous forme d'un tapis cellulaire, en 2D. Ces cellules sont ensuite détachées et forment spontanément des agrégats en se liant aux intégrines de la membrane plasmique des cellules. Le contact cellule-cellule induit une régulation positive de la E-cadhérine. La E-cadhérine s'accumule à la surface de la membrane plasmique. La liaison E-cadhérine-E-cadhérine permet la formation de solides agrégats (Cui, 2017).

Les sphéroïdes, de forme sphérique, sont constitués de plusieurs couches cellulaires décomposées en trois zones. En périphérie, le rebord prolifératif est composé de cellules actives pour la prolifération cellulaire et ont un fort métabolisme, puis la zone de quiescence qui est composée de cellules ayant une activité métabolique minimale même après exposition aux nutriments et enfin, au centre, la zone nécrotique où les noyaux et les membranes cellulaires sont endommagés, les cellules ont donc perdu leur fonction en raison de la privation de nutriments et d'oxygène (Cui, 2017) (Foglietta, 2020).

2.4. Matériels et méthodes de la formation 3D

Il est vrai que le modèle 3D est plus difficile à mettre en place. Tout d'abord, il est nécessaire de trouver la bonne technique de formation 3D pour les cellules d'intérêt. Actuellement il existe plusieurs façons de créer des structure 3D : par gravité, par l'utilisation de matrices ou encore de billes magnétiques (Fennema, 2013).

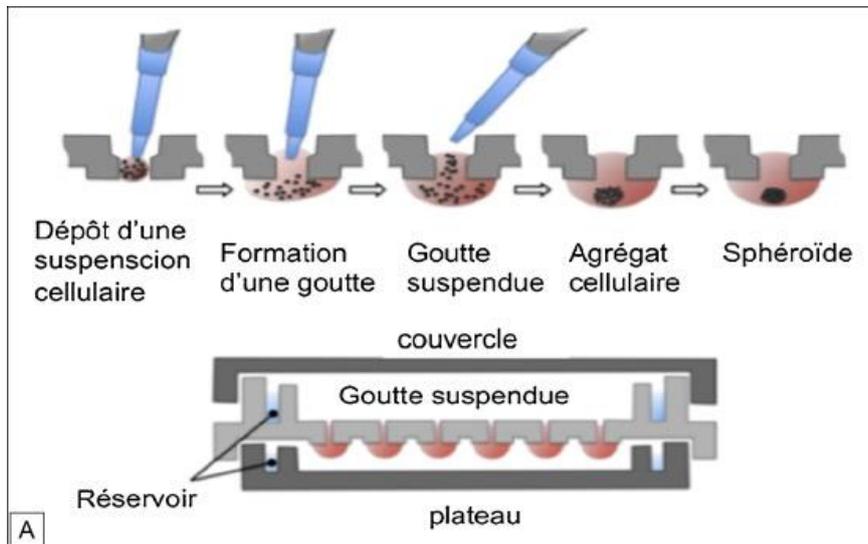


Figure 28: Formation d'une structure 3D par le système de goutte suspendue (Tostivint, 2017)

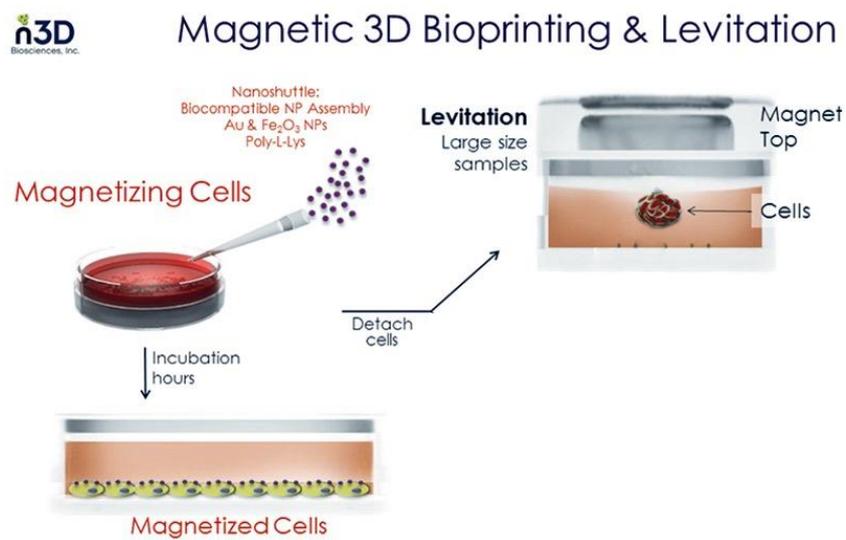


Figure 29: Formation de structure 3D par aimantation des cellules (Greiner©)

i. La goutte suspendue

La technique de la goutte suspendue utilise uniquement la gravité. Pour ce faire, deux méthodes sont utilisées : l'utilisation de boîte de Pétri ou de microplaque 96 puits. Grâce à cette méthode, les cellules s'agrègent spontanément (Hoarau-Vechot, 2018) (Figure 28).

Boîte de Pétri : des gouttes de milieu de culture comprenant les cellules d'intérêt sont disposées directement sur la face interne du couvercle de la boîte. Dans la boîte de Pétri, de l'eau distillée ou du PBS (phosphate-buffered saline) est ajouté afin de garder les gouttelettes dans un environnement humide. Le couvercle avec les gouttelettes est ensuite retourné pour fermer la boîte.

Plaque 96 puits : la plaque est composée de puits sans fond afin d'y déposer une goutte de milieu de culture comprenant les cellules d'intérêt. La goutte est maintenue par les bords du puits. De l'eau distillée ou du PBS est contenu tout autour de la plaque afin de garder l'environnement humide.

ii. Puits à faible adhérence

Dans une plaque de culture, les cellules n'arrivent pas à adhérer à la paroi des puits, ces derniers sont traités par un revêtement anti-adhésion composé de poly-2-hydroxyéthylméthacrylate. Ces puits sont de forme plane ou en U permettant ainsi aux cellules de s'agréger naturellement (Vinci, 2012).

iii. Lévitiation

La lévitation demande un prétraitement des cellules avec des microbilles magnétiques. Ces cellules liées aux microbilles sont incorporées dans des plaques de culture et exposées à un aimant situé sous le couvercle (Figure 29). Ces cellules s'agrègent au niveau de l'interface air-liquide formant ainsi un sphéroïde en lévitation (Haisler, 2013) (Turker, 2018). La structure 3D forme progressivement une matrice extracellulaire intrinsèque, avec une production de collagène, de fibronectine et de laminine (Jaganathan, 2014) (Lee, 2015).

iv. Système microfluidique

Les cellules sont cultivées dans des chambres micrométriques. Le milieu est infusé en continu (Bathia, 2014) (Wu, 2010). Cette méthode permet de contrôler avec précision le microenvironnement permettant d'étudier les interactions cellules-cellules mais également entre différents tissus (An, 2014) (Figure 30).

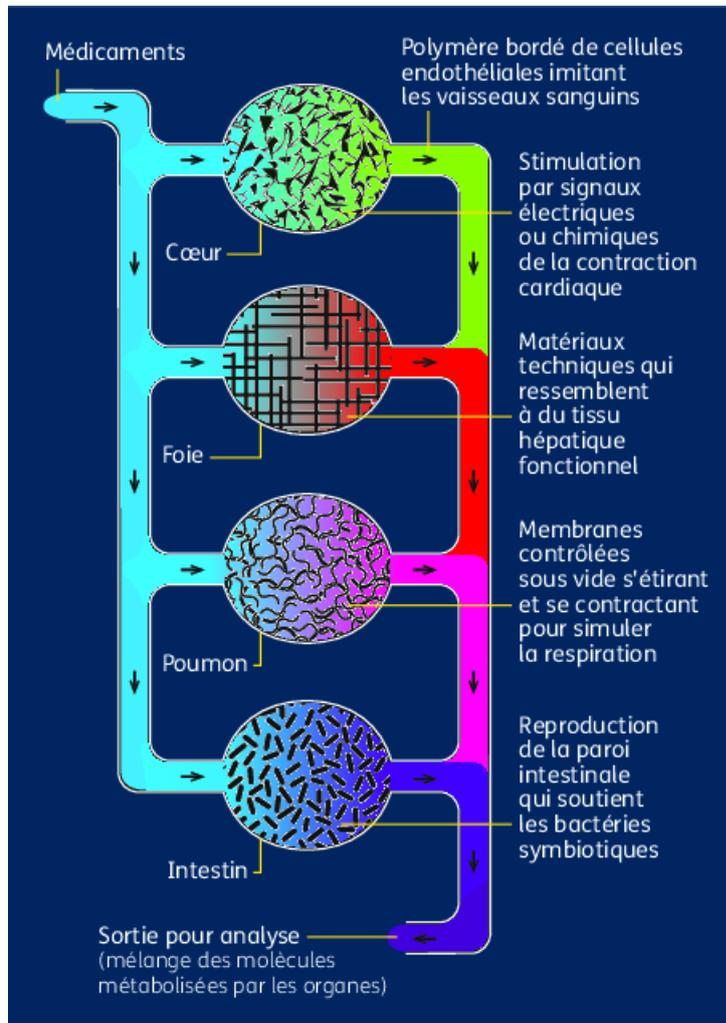


Figure 30: L'intérêt du système microfluidique dans l'étude des médicaments (Industrie Techno)

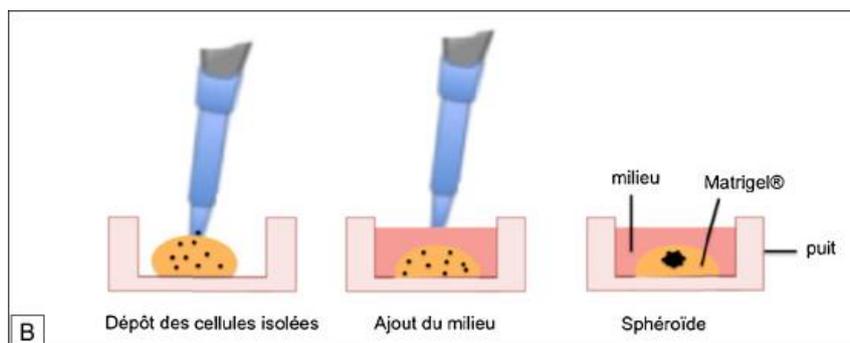


Figure 31: Formation de structure 3D encapsulée d'un hydrogel

v. Mise en place d'un « scaffold »

Le « scaffold » sert d'échafaudage, de support pour les cellules afin qu'elles prolifèrent. Le « scaffold » est en adéquation avec le tissu d'intérêt, il reproduit la structure du tissu d'intérêt afin d'avoir un modèle 3D cellulaire ayant la même fonction que le tissu étudié. Le « scaffold » doit être biocompatible et biodégradable (O'Brien, 2011)). Le « scaffold » peut être en métal, en verre, en céramique, en polymère synthétique ou en polymère d'origine naturelle (Vats, 2003).

vi. Hydrogel

L'hydrogel est utilisé comme matrice ayant une origine naturelle ou synthétique, appelé matrigel. (Figure 31). L'hydrogel mime le rôle de la matrice extracellulaire où une gouttelette comprenant une suspension de cellules est encapsulée dans une enveloppe d'hydrogel. Cette technique favorise les interactions cellule-matrice extracellulaire induisant des modifications de l'organisation et de la fonction cellulaire (Nath, 2016).

vii. Analyse des structure 3D

Pour étudier les marqueurs cellulaires, il est possible d'utiliser la cytométrie en flux afin d'analyser un grand nombre de structure 3D (Beaumont, 2015). De plus, pour analyser la localisation des marqueurs cellulaires, le microscope confocal permet d'analyser en « Z stack », c'est-à-dire que le microscope peut faire des coupes virtuelles du sphéroïde. Cependant, la pénétration du faisceau lumineux est faible, car le laser ne peut pénétrer que sur une distance de quelques microns. D'où l'intérêt d'utiliser un microscope biphotonique (microscope par excitation à deux photons) qui « coupe » virtuellement sur toute la profondeur du sphéroïde, sans limite de distance de pénétration.

Pour mesurer la viabilité cellulaire au sein de la structure 3D, deux tests colorimétriques sont réalisables. Le test au sel de tétrazolium (MTT) qui provoque un précipité violet au sein de la mitochondrie des cellules vivantes. La quantité de précipité est proportionnelle en nombre de cellules vivantes. Cette technique est un test de viabilité cellulaire (Costa, 2016).

Le test de la mesure de la lactate déshydrogénase qui est une enzyme libérée dans le surnageant lorsque la cellule subit des dommages de la membrane plasmique. Ainsi la lactate déshydrogénase est mesurée dans le surnageant. Plus la quantité de lactate déshydrogénase est élevée, plus la mortalité cellulaire est élevée. Cette technique est un test de mortalité cellulaire (Costa, 2016).

2.5. Limites du modèle 3D

Cependant, cette technique a également ses limites. Les modèles de culture cellulaire en 3D ont un coût plus élevé que les traditionnels modèles de cultures 2D mais nécessitent également plus de temps. Ils demandent un expérimentateur confirmé ou du temps pour comprendre le mécanisme de cette technique. Étant donné que la reproductibilité est plus difficile à obtenir, il est primordial de choisir le bon modèle de formation 3D.

Hypothèses et objectifs

Hypothèses

Pour le projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact des facteurs non-immuns, les immunosuppresseurs, et plus particulièrement au Tacrolimus et à l'Évérolimus immunosuppresseurs les plus utilisés en transplantation. Le rôle du TAC et de l'EVE dans les cellules immunes est bien documenté. Cependant, leur impact sur les cellules non immunes n'est pas totalement élucidé. Afin de mimer plus fidèlement la diffusion de ces immunosuppresseurs dans notre modèle pulmonaire de cellules épithéliales bronchiques humaines, la mise en place d'un modèle 3D nous a semblé utile.

Ainsi, nous avons fait les hypothèses suivantes :

- 1) Certains immunosuppresseurs, comme le TAC et l'EVE favoriseraient le CLAD et tout particulièrement la BO par un effet direct sur les cellules épithéliales bronchiques en induisant une TEM.
- 2) La TEM pourrait être amplifiée en cas d'infection ou dans un environnement pro-inflammatoire
- 3) L'approche 3D mimerait plus fidèlement la diffusion des IS à travers un épithélium bronchique.

Les objectifs

Les objectifs du projet sont :

- 1) Étudier, en culture classique 2D, l'effet du Tacrolimus en présence ou non de cytokines et/ou de MPs pro-inflammatoires sur la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules BEAS-2B (lignée épithéliale bronchique humaine).
- 2) Étudier, en culture classique 2D, l'effet de l'Évérolimus en présence ou non de cytokines et/ou de MPs inflammatoires sur la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules BEAS-2B.
- 3) Développer un modèle de culture cellulaire 3D de cellules BEAS-2B fonctionnelles. Afin d'étudier l'effet du TAC et de l'EVE dans des conditions plus physiologiques en particulier

concernant les conditions hypoxiques rencontrées en clinique humaine lors de la transplantation pulmonaire.

Pour mettre en évidence la TEM des cellules BEAS-2B nous avons étudié l'aspect morphologique des cellules, l'expression du phénotype épithélial et/ou mésenchymateux, les modifications fonctionnelles ainsi que les différentes voies intracellulaires impliquées dans ce processus.

*Partie 1 : Effets du Tacrolimus
et Everolimus dans la transition
épithélio-mésenchymateuse des cellules
épithéliales bronchiques humaines*

Contexte

La LTx est le seul traitement curatif pour des patients sélectionnés présentant une insuffisance respiratoire chronique grave. La médiane de survie des patients greffés est de 6,7 ans et atteint 8,9 ans après la première année de greffe (Bos, 2020). Durant la vie d'un greffé, le greffon subit des agressions comme des épisodes de rejet ou d'infections mettant à mal l'intégrité du greffon pulmonaire. Les multiples agressions peuvent aboutir à une dysfonction chronique du greffon pulmonaire, ou « chronic lung allograft dysfunction » (CLAD). Le CLAD a une forte prévalence ; 50% à 5 ans et atteint 75% à 10 ans (Benden, 2017). Le CLAD est défini par deux pathologies bien distinctes : le syndrome restrictif du greffon pulmonaire, appelé « Restrictive Allograft Syndrome » (RAS) et une pathologie obstructive, la bronchiolite oblitérante (BO), dont la traduction clinique est le syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS).

La BO se caractérise par un remodelage anormal de l'épithélium pulmonaire, provoquant au fil du temps un épaississement de la paroi bronchique avec une infiltration lymphocytaire et un dépôt de matrice extracellulaire. Ces phénomènes provoquent une oblitération partielle ou complète de la bronchiole qui est progressive et irréversible (Pain, 2014). Un des mécanismes impliqués dans la BO peut-être la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Lors d'épisodes de rejets ou d'infections, le greffon subit une inflammation locale, qui avec le temps devient chronique. Cette inflammation chronique favorise une TEM excessive et contribue ainsi à la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (Kalluri, 2009). La TEM se caractérise par des modifications de la morphologie cellulaire de l'épithélium avec une diminution de l'expression des protéines épithéliales au profit d'une surexpression de protéines mésenchymateuses (Lamouille, 2014). Cette TEM engendre une perte de la fonction barrière de l'épithélium pulmonaire avec l'acquisition d'une propriété migratoire (Lamouille, 2014). Des études sur des modèles cellulaires et animaux suggèrent qu'après LTx, les cellules épithéliales bronchiques subissent une TEM en réponse au TGF- β , molécule présente lors d'inflammation et qui joue un rôle pro-inflammatoire (Willis, 2007). Ces cellules épithéliales acquièrent des propriétés de myofibroblastes, produisant de la matrice extracellulaire dont le dépôt dans la lumière bronchique aboutit à une fibrose oblitérant la bronchiole.

Cependant, certains patients ne développent pas ou très peu de rejet aigu ou d'infection. Il se peut que d'autres facteurs puissent être incriminés tel que l'utilisation des immunosuppresseurs (IS). Tous les patients greffés d'organe solide ont un traitement IS afin que l'organisme tolère le greffon. Cette immunosuppression permet de contrôler les rejets aigus et chroniques pour

que les patients puissent bénéficier, le plus longtemps possible, de la fonction de leur greffon. Nous connaissons les effets de ces molécules sur le système immunitaire (prévention du rejet de greffe, majoration du risque infectieux), et les effets indésirables notamment la néphrotoxicité. Il a été démontré que dans le rein, des cellules rénales soumises à une stimulation par du Tacrolimus, perdent leur caractère épithélial et acquièrent un caractère mésenchymateux. L'action délétère des inhibiteurs des calcineurines favorisant la TEM et la fibrose est documentée en transplantation rénale (Bennett, 2016). Le rôle potentiel du TAC comme inducteur de TEM au niveau des cellules épithéliales bronchiques n'est pas connu. Cependant les résultats du laboratoire indiquent un effet cellulaire pro sénescence et pro apoptotique du TAC dans les modèles cellulaires endocrines ou exocrines (Constatinescu et al. 2016) et un impact sur la dysfonction cellulaire. En revanche, le rôle de l'EVE est bien plus controversé. L'EVE n'aurait pas le même effet dans chaque organe (Han, 2018). En effet, dans la fibrose idiopathique pulmonaire, l'EVE serait anti-fibrotique inhibant l'activation de la voie Smad par le TGF- β . A l'inverse, l'EVE engendre une TEM des cellules hépatiques après transplantation hépatique (Masola, 2015).

Enfin, le stress inflammatoire est également susceptible de favoriser la génération de MPs leucocytaires circulantes aux propriétés pro-coagulantes et pro-inflammatoires, susceptibles de favoriser la TEM.

Matériels et méthodes

Pour étudier l'effet des IS sur le greffon pulmonaire, une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) a été utilisée dans un modèle 2D. Pour mimer un environnement pro-inflammatoire, des MPs pro-inflammatoires issus de monocytes humains stimulés par LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisés. L'analyse des modifications morphologiques des cellules BEAS-2B a été réalisée par microscopie optique et l'aspect fonctionnel des cellules a été étudié par un « scratch-test ». La cytotoxicité des IS a été mesurée par cytométrie. L'étude de l'expression des marqueurs épithéliaux / mésenchymateux ainsi que les voies de signalisation intracellulaires activées ont été analysées par Western blot et immunofluorescence.

Résultats

Le Tacrolimus à 10 μ M à l'Everolimus à 0,1nM induit un effet sur les cellules épithéliales bronchiques. Ces IS modifient la morphologie cellulaire ; les cellules sont plus allongées, fusiformes avec une délimitation cellulaire moins nette. La combinaison TAC + MPs et EVE + MPs pro-inflammatoires se traduit par un aspect phénotypique de fibroblaste.

Le TAC et l'EVE induisent une modification significative de l'expression des protéines membranaires avec une diminution significative de l'expression du marqueur épithélial (E-cadhérine) et une augmentation significative de l'expression du marqueur mésenchymateux (Vimentine) des BEAS-2B par rapport aux cellules non stimulées. La combinaison avec les MPs provoque le même résultat phénotypique.

Quant à l'analyse fonctionnelle par « scratch test », lorsque les cellules sont stimulées avec le TAC, l'EVE ou par la combinaison avec les MPs, le comblement de brèche est plus important après 72h par rapport aux cellules non stimulées.

Pour étudier cette hypothèse les cellules stimulées par le Tacrolimus ont été traitées par un inhibiteur de la voie SMAD, le BMP7, afin de bloquer la TEM en présence de Tacrolimus. Les cellules, en présence de TAC et de BMP7, gardent leur phénotype épithélial. Le BMP7 préserve l'état des cellules épithéliales bronchiques. Le BMP7 prévient également la capacité épithéliale où la capacité migratoire est faible. Ainsi, le TAC utilise la voie canonique du TGF- β : la voie SMAD2-3.

Cependant, plus la concentration d'Everolimus augmente, plus les cellules gardent leur phénotype épithélial. L'Everolimus induit une TEM à faible concentration et perd cet effet à plus forte concentration.

Conclusion

Les traitements immunosuppresseurs, bien que très efficaces contre le rejet de greffe, joueraient un rôle dans la TEM, mécanisme impliqué dans la BO. Le TAC joue un rôle dans la TEM des cellules épithéliales bronchiques humaines. L'EVE à faible concentration, induit une TEM. Cependant, à forte concentration, l'EVE n'induit pas de TEM sur les cellules bronchiques. Ainsi le TAC jouerait un rôle pro-fibrosant alors que l'EVE jouerait un rôle antifibrosant à plus forte concentration.

Effects of immunosuppressive drugs and membrane microparticles on epithelial mesenchymal transition of bronchial epithelial cells in lung transplantation

Gracyasz M¹, Renaud-Picard B^{1,3,4}, Olland A^{1,3,4}, El-Ghazouani F¹, Sbat N¹, Peluso J², Kessler L^{1,3},
Toti F¹, Kessler R^{1,3,4}

¹: INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), CRBS (Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg), Strasbourg, France

²: Ebiocyt Platform, UPS1401 Pharmacy faculty, Strasbourg, France

³: Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴: Groupe de transplantation pulmonaire de Strasbourg,

Corresponding author:

Pr. Romain KESSLER
Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg
Pôle de pneumologie
1 place De l'Hôpital
67091 Strasbourg
E-mail: Romain.Kessler@chru-strasbourg.fr

Abstract

Introduction. Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is characterized by an abnormal remodeling of the bronchial epithelium causing fibrotic obliteration of the bronchiole lumen and occurring in 50% of lung transplanted patients after 5 years. One possible mechanism involved is epithelial-mesenchymal transition (EMT). This EMT could be favored by non-allo-immune factors such as infections but also immunosuppressive drugs, known to impact wound healing especially Tacrolimus (TAC) and Everolimus (EVE).

Methods. Bronchial epithelial BEAS-2B cells were submitted to TAC (1-20 μ M), EVE (0.1nM – 1 μ M) and/or to pro-inflammatory microparticles (MPs) (30nM) for 72h. Pro-inflammatory MPs were harvested from LPS of *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated monocytes THP1, washed and concentrated. Cells were used to test TAC, EVE and MPs. Cellular morphology was analyzed by optical and confocal microscopy. Identification and quantitative analysis of epithelial and mesenchymal membrane proteins were performed by Western blot assay. Migratory cell capacity was assessed by the “scratch-test”.

Results. Cells treated by TAC and EVE acquired a modified cellular morphology with a spindle-shaped mesenchymal profile compared to a normal rounded, epithelial appearance of control cells. We observed a significant down-regulation of E-cadherin with TAC_{10 μ M} and EVE_{0,1nM} compared to untreated cells ($p < 0.0001$) and ($p < 0.001$) respectively, and a significant up-regulation in vimentin with TAC_{10 μ M} and EVE_{0,1nM} compared to untreated cells ($p = 0.0005$) and ($p < 0.05$) respectively.

The gap was filled to 40%, to 42% and 37% in presence of 10 μ M of TAC, 0,1nM of EVE and Mps pro-inflammatory respectively compared to untreated cells with 8% of filling. The combination of MP_{1ps}+TAC_{10 μ M} and MP_{1ps}+EVE_{0,1nM} induced 44% and 43% filling respectively.

Conclusion. In vitro, TAC or EVE combined to pro-inflammatory MPs induced EMT in 2D bronchial epithelial cell cultures.

Introduction

Lung transplantation is currently the only effective treatment for patients with end-stage chronic respiratory failure. Admittedly, the median survival of patients is 6.7 years and reaches 8.9 years after the first year of transplant (Bos, 2020). However long-term survival and health-related quality of life are hampered by the occurrence of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) which develops with time. Its prevalence increases to 50% at 5 years and 75% at 10 years (Benden, 2017). CLAD has different subtypes, mainly bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), and restrictive allograft syndrome (RAS). CLAD pathology is characterized by abnormal remodeling of the bronchial or alveolar epithelium, causing over time thickening of the bronchial wall leading to obstruction of the small airways or parenchymal collagen infiltration (Pain, 2014) and lung volume restriction. Obstructions of airway lumen and lung collagen infiltration are associated with lymphocytic infiltrates, presence of myofibroblasts accompanied by bronchiolar and interstitial fibrosis, (Le Pavec, 2013). Different studies have addressed the role of cells (dendritic cells, macrophages, T and B cells) cell-membrane particles (exosomes, microparticles...), antibodies (anti-HLA antibodies...), cytokines (interleukins...), checkpoint molecules in CLAD. How interactions between these entities result in CLAD remains partially unknown. Suspected mechanisms involve epithelial-mesenchymal transition (EMT) and/or local fibrogenesis (Zhang, 2017). Chronic allograft dysfunction has probably many shared mechanisms whatever the solid organ transplant considered.

In the context of chronic inflammation, EMT becomes excessive and contributes to the transformation of epithelial cells into mesenchymal cells (Kalluri, 2009). EMT is characterized by changes in cell morphology, a decrease in the expression of epithelial proteins (E-cadherin, β -catenin), in favor of overexpression of proteins typical of mesenchymal cells (vimentin, α -SMA) (Lamouille, 2014). EMT is accompanied by changes in the functional properties of cells, including loss of epithelial barrier function and the acquisition of contractile and migratory properties (Lamouille, 2014). In human kidney transplantation for example, strong staining for vimentin in tubular cells is predictive of late renal graft dysfunction (XuDubois, 2014). In addition, the overexpression of mesenchymal markers is well correlated with the diagnosis of humoral rejection and its prognosis (XuDubois, 2016). Studies in cell or animal models (Borthwick, 2009 and 2013) suggest that after lung transplantation, bronchial epithelial

cells undergo EMT in response to TGF- β . This is the main cause of the expansion of myofibroblasts seen in BOS (Willis, 2007).

Currently, no treatment is effective for CLAD. The evolution of this pathology can be responsible for a major deterioration in the patient's respiratory function, leading in some cases to death. A second transplant is sometimes performed and is the only effective treatment (Takeshi, 2011). Immune and non-immune factors have been implicated in the occurrence of CLAD such as primary graft dysfunction, broncho-pulmonary infections (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*), air pollution and smoking, gastro-esophageal reflux, cellular and humoral rejection. All these conditions may induce bronchial or alveolar epithelial injuries (Borthwick, 2011). Within the laboratory, a study of bronchoalveolar lavage fluid of transplant patients with a pulmonary infection was carried out; our results showed a high concentration of leukocytes-derived proinflammatory microparticles (MPs), (Renaud-Picard, 2017)

Immunosuppressive drugs are used in solid organ transplantation to control for immediate and long-term rejection. Current immunosuppressive regimens include induction therapy with bolus corticosteroids and basiliximab and maintenance immunosuppression with a triple combination of low dose corticosteroids, a calcineurin inhibitor and a cell-cycle inhibitor. Anti-mTOR compounds are increasingly used in lung transplantation as alternative drugs in case of intolerance or major side effects of calcineurin or cell-cycle inhibitors. The most largely used calcineurin-inhibitor is Tacrolimus (TAC), which carries several side effects, such as opportunistic infections, diabetes mellitus, headache, hyperglycemia, hyperkalemia, mental status changes, nephrotoxicity, and tremor. It is also possible that tacrolimus effect of preventing CLAD is counterbalanced by promoting EMT, and fibrosis. This paradoxical outcome has been documented in kidney transplantation (Borthwick, 2009). Similarly, Bennet et al. (Bennett, 2016), demonstrated that Tacrolimus induces EMT in renal tubular cells. Conversely, inhibition of EMT may attenuate renal fibrosis by inhibition of the Wnt/b-catenin signaling pathway. (Hu, 2020) (Li, 2021). The same effect has been established with mammalian target of rapamycin inhibitors (mTORi), such as Everolimus (EVE), which induces EMT in liver cells (Masola, 2015). EMT could be a shared mechanism explaining both TAC's and EVE's nephrotoxicity and chronic allograft dysfunction in lung transplant or other solid organ recipients.

In the present study, we hypothesize that TAC and/or EVE are capable of inducing EMT in bronchial epithelial cells with or without an inflammatory environment using different

cytokines or leucocyte-derived microparticles. Thus, study is based on morphological and functional analysis of bronchial epithelial cells in different conditions of culture, and on identification and quantification of TEM protein markers. We were also interested in determining intracellular pathways implicated in TAC or EVE induced EMT.

Materials and methods

1. Cell cultures

a. THP-1 monocytes

THP-1 monocytes were used to obtain membrane microparticles. THP-1 are human monocytic cells from patients with acute myeloid leukemia, obtained from the ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA). THP-1 monocytes were grown in suspension in RPMI 1640 medium (P04-16500, Pan Biotech[®]) with 2.5g/L of glucose and 2mM of glutamine, supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 0.2% β -mercaptoethanol and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were seeded at a concentration of 3×10^5 cells/ml, cultured at 37°C, in a humid atmosphere and with 5% CO₂. The culture medium was changed every two-three day.

b. BEAS-2B

The human line BEAS-2B comes from a healthy human bronchial epithelium. Cells are immortalized by infection with the adenovirus 12-SV40 (American Type Cell Culture). BEAS-2B cells were cultured on a support suitable to adherent cells and cultivated in RPMI 1640 medium (P04-18047, Pan Biotech[®]) containing 2 mM of glutamine and 4.5 g/L of glucose, 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS. The cells were seeded at the concentration of 2×10^5 cells/ml and cultured at 37°C, in a humid atmosphere and with 5% CO₂. The passaging of these cells was carried out every two or three days and cells were detached by careful proteolysis using a solution of trypsin EDTA (EDTA 200 mg/L, trypsin 170,000 U/L).

2. Cellular viability

The viability of cells was studied by cytometry (Guava[®]) by analyzing standard markers of apoptosis (propidium iodide and FITC Annexine V). The cell recovery and marker incubation procedure were followed according to the protocol of the Ebiocyt platform UPS 1401 of Strasbourg university. Cell viability was established when cells were annexin V and propidium iodide negative.

3. Production of TPH-1 monocytes membrane microparticles

a. Procurement and isolation of MPs

THP-1 cells were stimulated or not by 10 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS) from *P. Aeruginosa* at 37°C to produce an infectious stress. After 24h of stimulation, cells were separated from their supernatant by twice centrifugation for 15 minutes, at 350g, and at room temperature. Then, supernatant was centrifuged twice for 1h, at 14.000g and at 4°C. The pellet of MPs was re suspended in HBSS solution (without calcium, magnesium, and phenol red) and stored at 4°C for 1 month maximum.

b. Dosage of MPs

The dosage of MPs is an indirect method based on an enzymatic reaction which uses the capacity of MPs, in the presence of phosphatidylserine (PS), to form an enzymatic complex which generates thrombin from prothrombin. The thrombin produced is measured by a colorimetric assay using a chromogenic substrate which releases a colored product measured by optical density using a spectrophotometer. (Hugel, 2004).

The MPs linked to annexin V are immobilized on a microplate containing streptavidin (Roche, France).

The prothrombinase complex composed of the factors FXa (enzyme), and FVa (cofactor) and as well as its substrate factor II (FII, prothrombin) are added. In the presence of calcium, PS catalyzes the proteolysis of pro-thrombin to thrombin by the enzyme FXa.

The thrombin generated is proportional to the concentration of PS present in the sample and is measured using a chromogenic substrate pNAPEP 0216 which releases a yellow-colored product after cleavage by thrombin.

4. Cell Treatment

BEAS-2B cells were treated with Tacrolimus (tlrl-fk5, Invivogen[®]) or Everolimus (tlkrl-eve, Invivogen[®]) diluted in DMSO 100%, at increasing concentration from 1 to 20 μ M and from 0,1nM to 1 μ M respectively. DMSO was present at less than 0.05% in the medium. The concentrations of Tacrolimus 10 μ M and Everolimus 0.1nM were chosen after examination of dose response curves. MPs of monocytes were used at 30nM. To allow comparisons with a positive control, cells were treated with TGF- β (T7039 Sigma[®]) and TNF- α (T0157, Sigma[®]) at 10ng/mL and 20ng/mL respectively.

5. Bone morphological protein 7

BMP7 (Bone morphogenetic protein 7) belongs to TGF- β superfamily. Its action is, among others, to inhibit the effects of TGF- β . BMP7 opposes the fibrogenic activity of TGF- β (Sun, 2018). BMP7 blocks the canonical TGF- β pathway by activating the SMAD1/5 complex, competitively binding to SMAD4. Thus, the SMAD1/5/4 complex is formed to be translocated into the nucleus (Piscione, 2018) counteract fibrosis, HGF reduces the level of TGF- β , thereby restoring epithelial markers such as E-cadherin and decreasing the amount of MMP9. BMP7 acts as an endogenous TGF- β -induced EMT antagonist, restores E-cadherin by Smad5 pathway (Kalluri, 2003). BMP7 (SRP6157, Sigma[®]) was used to block the canonical pathway of TGF- β at increasing concentrations (10- 250 ng/mL), and the 250ng/mL was retained.

6. Cell migration assay

Cells undergoing an EMT acquire new migratory properties, which can be assessed by the “scratch-test”. BEAS-2B cells were seeded at a density of 500 000 cells in a 6-wells plate to obtain a confluent cell monolayer after 24h of incubation. We created then an artificial gap (mimicking a wound) using the tip of a sterile 1mL pipette in each well. We captured images at the beginning and at regular time intervals (24, 48 and 72h) during cell migration to close the scratch, and compared the images to quantify the migration rate of the BEAS-2B cells.

7. Western blot

Total proteins were extracted at the end of the incubation period. Cells were lysed in RIPA buffer (50mM Tris, 150mM NaCl pH 8, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% protease inhibitors and 0.5% phosphatase inhibitors). The lysate was centrifuged (25 000 g, 30 min, 4°C) and the supernatant containing the proteins was harvested. Protein lysate supernatants were stored at -20 ° C.

Protein assay was carried out with the modified Lowry dosage. Proteins were separated in denaturing conditions by electrophoresis on SDS-PAGE gel at 10%, at 70V for 30 minutes and migration at 100V for 1h30.

Then, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham GE Healthcare, USA) at 200mA for 2h in ice. After transfer, to block non-specific sites, the membrane was immersed for 1h into a blocking buffer solution. The membrane was incubated with shaking, at 4°C, with the primary antibody (anti-E-cadherin antibody 1/1000 (ab1416, Abcam[®]), anti-Vimentin antibody 1/1000 (ab20346, Abcam[®]) and anti- β -tubulin antibody 1/10000 (ab151318, Abcam[®]). After an overnight incubation, the membrane was incubated for 1h at room

temperature with shaking with a secondary antibody coupled to peroxidase (anti-mouse IgG HRP-linked antibody, 1/10000 for the three antibodies). The labeling was revealed by chemiluminescence technique using the LAS 4000 apparatus. The expression of the proteins of interest was normalized with respect to β -tubulin, a maintenance protein, under the form of a ratio.

8. Immunofluorescence confocal microscopy

To highlight protein markers involved in EMT, immunofluorescence allows viewing the proteins' localization. BEAS-2B were cultured in millicell EZ plates, at a density of 10 000 cells per well. After stimulation with TAC and BMP7, cells were fixed with paraformaldehyde 4% for 10 minutes. Then, to block non-specific sites, cells were incubated with a blocking buffer for 1h at room temperature. Thereafter cells were incubated with primary antibodies anti-E-cadherin (dilution 1/200, ab1415, Abcam[®]) and anti-vimentin (dilution 1/1000, ab151318, Abcam[®]) overnight. Cells were then incubated for 2h in the dark, with secondary antibodies anti-rabbit Alexa 488 and anti-mouse Alexa 633. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to discriminate and count fixed cells.

9. Statistical analysis

Effect of Tacrolimus, Everolimus, MPs and BMP7 on human bronchial epithelial cells were carried out 3 times (n = 3). The data are represented by their average (+/- standard errors). Statistical analysis of quantitative data was based on Anova test and T-Test using GraphPad Prism 5.0 software. A p-value lower than 0.05 was considered to indicate statistical significance. (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Results

I. Cells undergo morphological changes in presence of TAC or EVE

Optimal concentrations of TAC and EVE for detecting EMT were obtained by a concentration-response curve by measuring changes on the expression profile of protein markers and looking for associated morphological changes.

a. Morphological modifications of BEAS-2B cells in presence of immunosuppressive drugs

Because BEAS-2B have a continuous growth with a doubling of the population every 24 hours, the kinetics of morphologic changes were analyzed at different time points (0, 24, 48 and 72 hours, but only 72 hours is represented), the last time being that which BEAS-2B are at confluence under our basal culture conditions. The cells were stimulated according to the experimental protocol described in the “materials and methods” section.

At 72 hours, BEAS-2B cell morphology was not significantly modified after incubation with TAC (1 and 5 μ M) (Figure 1 C-D) or EVE (1, 10, 100 and 1000nM) (Figure 1 H-I-J-K) compared to baseline conditions: the cells were cuboidal and well delimited. There was a clear morphologic alteration for TAC concentrations greater than or equal to 10 μ M (Figure 1 E-F): cells were more elongated, spindle-shaped and their delineation was less clear. On the contrary, for EVE, morphological changes were obvious for the lowest concentration i.e. 0.1nM (Figure 1 G). And the more the concentrations of EVE increased, the more the epithelial morphology was maintained. These morphological changes tended towards the same appearance as cells stimulated by pro-inflammatory cytokines adopting a fibroblastic phenotype (Figure 1 B).

b. Functional “wound healing” effect of immunosuppressive drugs on BEAS-2B cells cultures (“scratch test”)

EMT causes loss of epithelial character characterized by loss of adhesion to the basement membrane and the development of migratory capacity. The functional change was measured by a gap filling kinetics assay in BEAS-2B cell layers. The area of the gap was measured at 72 hours and then subtracted from the area measured at T=0h to graphically represent the filling of the breach.

After 72 hours of culture with TAC, the gap was not significantly filled at low concentrations of 1 and 5 μM of TAC (Figure 2 C-D). Only a TAC concentration greater than or equal to 10 μM favored gap filling as did the incubation with cytokines representing our positive control (Figure 2 E-F-B).

After 72 hours, the gap was filled to 28% by the untreated cells, to 16% and 26% in the presence of 1 μM of TAC and 5 μM respectively and to 54% and 48% in the presence of 10 μM and 20 μM of TAC while cytokines promoted filling of 60% of the surface (Figure 2 A-B-C-D-E-F).

After 72 hours of culture with EVE, concentrations greater than 0,1nM didn't promote gap filling. Only the lowest concentration of EVE (0.1nM) significantly induced a gap filling (Figure 2 G).

After 72 hours, in the presence of 1nM, 10nM, 100nM and 1 μM of EVE, the gap was filled at 38%, 33%, 31% and 32% respectively (Figure 2 H-I-J-K). Conversely, there was a 59% filling with 0.1nM of EVE as in the presence of cytokines with 60% of filling (Figure 2 G-B).

Thus, lower TAC concentrations ($< 5\mu\text{M}$) and higher concentrations of EVE ($> 1\text{nM}$) didn't induce migration of BEAS-2B in the "scratch-test" (Figure 3). TAC at 10 μM and EVE at 0.1nM induced a modification of epithelial cells losing their epithelial characteristics in favor of a mesenchymal profile with the acquisition of migratory properties characterized by gap filling in the scratch test

c. Expression of epithelial and mesenchymal membrane proteins:

Because EMT results in altered expression of membrane proteins, expression of the epithelial protein E-cadherin and the mesenchymal protein Vimentin were investigated by western blot assay.

Measurements of the expression of the two proteins by BEAS-2B cells in the presence of TAC 1 μM and 5 μM and EVE from 1nM to 1 μM showed no significant variation compared to cells without TAC or EVE (Figure 4).

However, the expression profile was modified by treatment at 10 μM of TAC and 0.1nM of EVE. The expression of E-cadherin was significantly reduced with TAC at 10 μM compared to unstimulated cells ($p < 0.0001$) or compared to TAC at 5 μM ($p = 0.0005$) (Figure 4 A).

Similarly, the expression of E-cadherin was significantly reduced with EVE at 0,1nM compared to untreated cells ($p<0.001$) or to EVE at 1nM ($p<0.01$) (Figure 4 B).

Vimentin expression by BEAS-2B was significantly increased in response to TAC at 10 μ M compared to untreated cells ($p=0,0005$) (Figure 4 A). Likewise, in the presence of EVE at 0.1nM, the expression of vimentin was also significantly increased compared to untreated cells ($p<0.05$) or EVE 1nM ($p>0.05$) (Figure 4 B). Cells stimulated with TAC 10 μ M, or EVE 0.1 nM followed the same expression profile as the positive control represented by cytokine stimulation.

II. TAC and EVE don't cause cell apoptosis

Epithelial cells, faced with pharmaceutical modulators, are activated, and can transform into mesenchymal cells by EMT or undergo apoptosis. To verify the effect of TAC and EVE, BEAS-2B cells were analyzed by cytometry using the Ebiocyt UPS 1401 platform in Strasbourg, France. To obtain the half maximal effective concentration (EC50), TAC and EVE were added at concentrations of 1 μ M to 50 μ M and 0.1nM to 100 μ M respectively.

TAC concentrations of 1 to 20 μ M didn't induce apoptosis. At 30 μ M, 40 μ M and 50 μ M, 57%, 84% and 85% of cells entered apoptosis respectively (Figure 5). From 30 μ M, more than 50% of cells were apoptotic.

EVE concentrations from 0.1nM to 20 μ M didn't induce apoptosis. At 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M and 100 μ M, 36%, 40%, 42% and 80% of cells were apoptotic respectively. At 100 μ M, more than 50% of cells were dead cells. In presence of pro-inflammatory cytokines, 10% of cells were dead (Figure 5).

Thus, at 10 μ M of TAC and 0.1nM of EVE, cells were viable and didn't undergo premature death. Moreover, in our model, pro-inflammatory cytokines didn't induce apoptosis as well.

Concentrations of 10 μ M of TAC and 0.1nM of EVE were used for the remainder of the study.

III. BMP7 : EMT blocking effector

Our data raise the question of mechanisms underlying the induction of EMT by TAC or EVE. The TGF- β receptor is a receptor with serine-threonine kinase activity. Binding of TGF- β to this heteromer is necessary to initiate transphosphorylation of TGF- β -RI by TGF- β -RII and

downstream intracellular signaling. Into the cell, FKBP12 peptide binds to the cytoplasmic phosphorylation site of TGF- β -RI, inhibiting activation of the receptor in the absence of its ligand (Aghadasi, 2000). However, the affinity of FKBP12 for TAC is sufficient to cause by competition the dissociation of FKBP12 from the TGF- β receptor and the formation of a stable complex (Okadome, 1996). Thus, TAC would promote constitutive activation of the receptor which would no longer be controlled by the signal attenuation mechanisms induced by TGF- β . Thus, TAC may promote EMT of human bronchial epithelial cells, in inflammatory conditions. TAC could therefore be an indirect inducer of EMT leading to BO.

To demonstrate that TAC uses the canonical TGF- β pathway to induce EMT, a modulator of the BMP family was used. BMP7 blocks the canonical pathway by activating the SMAD 1/5 complex, with competitively binds to SMAD4, thus the SMAD1/5/4 complex is formed to be translocated into nucleus (Piscione, 2018). BMP7 doesn't block activation of the SMAD2-3 complex but blocks the SMAD2-3-4 complex so that it's not translocated into the nucleus to activate genes involved in EMT (Sun, 2018).

a. Maintenance of cell morphology in presence of BMP7

Following the previous model, a concentration-response curve was established. Increasing concentrations of BMP7 were added, from 10 to 250ng/mL in presence or absence of TAC. After 72 hours of stimulation, BEAS-2B cell morphology incubated with TAC_{10 μ M}+BMP7 10ng/mL and TAC_{10 μ M}+BMP7 50ng/mL was significantly modified: cells were elongated and spindle-shaped, tending to the same morphological profile as the cells stimulated only with TAC_{10 μ M} (Figure 6 F-G). When cells were incubated with 100ng/mL of BMP7, they had a double profile, some cells were well spindle shaped, others looked well delimited (Figure 6 H). On the other hand, when cells were cultured in presence of TAC_{10 μ M}+BMP7 250ng/mL or BMP7 alone (At 10 and 250ng/mL), cells were fusiform, well-delimited (Figure 6 D-E-I). BMP7 is concentration dependent. In the presence of TAC_{10 μ M}+BMP7 250ng/mL, cells remained "epithelial" in morphology (Figure 6 I). BMP7 maintained morphological integrity of BEAS-2B cells cultured in presence of TAC.

After 72 hours of culture with only 10ng/mL or 250ng/mL of BMP7, the gap was not significantly filled (Figure 7 D-E). However, cells stimulated with TAC_{10 μ M}+10ng/mL/+50ng/mL/+100ng/mL of BMP7 was significantly filled like cells stimulated with TAC_{10 μ M}

(Figure 7 C-F-G-H). Only a $TAC_{10\mu M}+250ng/mL$ BMP7 favored gap filling as did the incubation with cytokines or $TAC_{10\mu M}$ (Figure 2 B-C-I).

b. Functionality of BEAS-2B cells maintained in presence of BMP7

After 72 hours, the gap was filled to 12% by the untreated cells, to 16% and 17% in the presence of BMP7 10ng/mL and BMP7 250ng/mL respectively and to 70%, 42%, 36% and 13% in the presence of $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 10ng/mL, $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 50ng/mL, $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 100ng/mL and $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 250ng/mL respectively while cytokines promoted filling of 70% on the surface (Figure 7 A -C-D-E-F).

Thus, with $TAC_{10\mu M}$, BMP7 at 250ng/mL maintained the epithelial functional phenotype of BEAS-2B cells (Figure 8).

c. Maintain of epithelial membrane proteins

By analyzing the epithelial and mesenchymal proteins of cells, the expression of the two markers in the presence of TAC or $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 10ng/mL was similar. In contrast, the expression profile was like untreated cells when the cells were cultured in the presence of $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 250ng/mL or BMP7 alone (Figure 9). The expression of E-cadherin was significantly reduced in the presence of $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 10ng/mL compared to untreated cells ($p<0.05$) (Figure 9 A). Conversely, the expression of vimentin was significantly increased in the presence of $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 10ng/mL compared to untreated cells ($p<0.01$) (Figure 9 B).

The higher the concentrations of BMP7, the more the expression of the markers tended towards a profile of untreated BEAS-2B cells. The expression of E-cadherin with $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 50g/mL, $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 100g/mL and $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 250ng/mL increased significantly compared to cells stimulated by $TAC_{10\mu M}$ ($p<0,01$), ($p<0.0001$) and ($p<0.001$) respectively (Figure 9 A).

Vimentin expression significantly with $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 50g/mL, $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 100g/mL and $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 250ng/mL decreased compared to cells stimulated by $TAC_{10\mu M}$ ($p<0.05$), ($p<0.01$) and ($p<0.01$) (Figure 9B).

To visualize these markers, cells were analyzed by confocal microscopy (Figure 10). The expression of E-cadherin was significantly reduced in the presence of TAC compared to the untreated cell ($p<0.0001$), whereas it significantly increased in the presence of $TAC_{10\mu M}+BMP7$ 250ng/mL compared to $TAC_{10\mu M}$ alone ($p<0.001$). Vimentin expression significantly increased

in the presence of TAC_{10μM} compared to untreated cells (p<0.001) whereas it significantly reduced in the presence of TAC+BMP7 250ng/mL compared to TAC_{10μM} alone (p<0.001). Thus, from analysis of transition protein markers, BMP7 at 250ng/mL maintained the epithelial phenotype of bronchial epithelial BEAS-2B cells.

To understand why BMP7 blocks EMT even in the presence of TAC, the SMAD pathway was analyzed through 2 markers: Smad2 and Smad2P (Figure 11). The expression profile of Smad2 was similar for each condition. When the SMAD pathway is activated, SMAD2 is phosphorylated by TGF-β receptor. Smad2P expression was significantly increased in the presence of TAC_{10μM} compared to untreated cells (p<0.01). This expression of membrane proteins was like the one seen with pro-inflammatory cytokines TGF-β and TNF-α (p<0.01). In addition, when TAC_{10μM} was in presence of BMP7, there was no significant difference in the expression of Smad2P compared to TAC_{10μM} alone. Thus, TAC_{10μM} induced EMT through the TGF-β pathway, and BMP7 blocked this EMT by inhibiting the Smad2/3/4 complex.

IV. Synergistic effect of immunosuppressive drugs in a pro-inflammatory environment

In our work, the intercellular communication model induced by the MP_{Ips} of THP-1 on BEAS-2B allows the study of paracrine interactions between monocytes and bronchial epithelial cells mimicking the condition of leukocytes at the bronchial epithelium.

At 72 hours, the cell morphology of BEAS-2B stimulated by MP_{Ips}, TAC_{10μM}, EVE_{0.1nM} and cytokines applied separately was significantly modified: cells were significantly more elongated with a less clear cell delineation (Figure 12 A-B-D-E-F). The combination with MP_{Ips} and immunosuppressive drugs resulted in a morphological appearance very close to that obtained by treatment of cytokines used as a positive control for EMT (Figure 12 G-H).

The gap area filled in the presence of TAC_{10μM}+MP_{Ips} or EVE_{0.1nM}+MP_{Ips} resembled to the gap filling by only TAC_{10μM} or EVE_{0.1nM}, including a similar degree of migration (Figure 13). At 72 hours, the untreated cells covered the gap at 8% (Figure 13 A). In the presence of MP_{Ips}, TAC_{10μM} or EVE_{0.1nM}, the degree of recovery was respectively 37%, 40% and 42%. The combination of MP_{Ips}+TAC_{10μM} and MP_{Ips}+EVE_{0.1nM} induced 44% and 43% filling respectively (Figure 14).

Discussion

EMT of bronchial or alveolar epithelial cells is a process which has been implicated in chronic lung allograft dysfunction, in response to different allo-immune or non -alloimmune aggressions of the epithelium. Immunosuppressive drugs such as TAC, mycophenolate mofetil, steroids and mTOR are fundamental to control rejection by a regular day-by day treatment. However, alongside several well-known side effects, they could also act as CLAD-promoting factors. Therefore, we determined the conditions of modulation of EMT by different agents: Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, Everolimus an mTOR inhibitor, both used in lung transplantation, monocyte-derived pro-inflammatory microparticles or pro-inflammatory cytokines whose circulating concentrations are elevated during episodes of infection or rejection. We evaluated induced-EMT by morphological changes in bronchial epithelial cells, measurement of two markers of EMT, E-cadherin, an epithelial membrane protein which disappears with EMT and vimentin, a mesenchymal membrane protein which appears with EMT, but also after activation of the TGF- β canonical pathway.

In our model, only concentrations of TAC greater than or equal to 10 μ M and the lowest concentration of EVE (0.1nM) were able to induce EMT as shown by 1) cell morphology changes, from a well-defined cuboidal shape to an ill-defined spindle shape comparable to cytokine induced EMT. 2) a switch of membrane protein expression with a significant decrease in the expression of E-cadherin and a significant increase in vimentin and 3) a migratory capacity mimicking “wound healing” higher than that of untreated cells detected after 72 hours of stimulation.

Unlike TAC, the more the concentration of EVE increases, the more the EMT process is inhibited. mTOR plays a role in cell proliferation but also on the mechanism of carcinogenesis and more particularly EMT. EVE blocks mTOR by binding to FKBP12. At high concentrations, EVE blocks mTOR, thus inhibiting the phenomenon of EMT. In our hands, at low concentration, EVE had a pro-EMT effect and at high concentration an anti-EMT action (Han, 2018). Our results in BEAS-2B cell culture conditions therefore highly suggest that Tacrolimus, and Everolimus (at low concentration) and monocyte-derived MPLs stimulate epithelial-mesenchymal transition. EMT inhibition by BMP7 revealed that TAC induces EMT of bronchial epithelial cells by activating the canonical TGF- β pathway, i.e. the SMAD pathway.

However, at low concentration, EVE plays a pro-EMT role probably by modulating a SMAD-independent pathway.

Moreover, TAC, by binding competitively to FKBP12, allows constitutive activation of TGF- β -receptor to activate the canonical pathway, the SMAD pathway to induce EMT. Thanks to BMP7 at 250ng/mL, the epithelial character of BEAS-2B can be maintained by inhibition of EMT and it can be supposed that bronchial collagen deposition could be avoided.

The graphical representation (figures 3, 8, 14) also indicates that the EMT response in our model is not only concentration-dependent but also time-dependent, because the analysis of parameters at different times demonstrates a kinetics in which epithelial cells transformed over time by little into mesenchymal cells. A 24h time frame wouldn't have been long enough to assess EMT. Conversely, a time too long would have harmed the quality of cultured cells. The results of the study support our initial hypothesis and suggest that TAC as well as EVE contribute to EMT of bronchial epithelial cells and potentiate the inducing effects of inflammatory mediators present in lung transplants.

However, a study (Felton, 2010) using rat bronchial cells has shown that TAC, unlike azathioprine or cyclosporine, does not induce morphological changes or the expression of specific markers. However, no concentration-response curve was developed in this study and TAC was added at a single concentration of 5 μ M which in our study was found to be ineffective in inducing EMT. In our study, EVE induced EMT at a low concentration. Paradoxically, other studies carried out on primary pulmonary cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis demonstrated that EVE induces EMT at high concentrations: it seems that there is a U-shaped relationship, with a relationship with the concentration of EVE and EMT effect (Xu, 2015) (Tomei, 2016). However, these cells are in a pro-inflammatory environment. Thus, it would be interesting add EVE at high concentration in presence of TGF- β .

During transplantation, a variety of pathological situations (primary graft dysfunction, infections, rejection episodes...) can induce hypoxia and oxidative stress in lung transplants, leading to the synthesis of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), a transcription factor involved in hypoxia adaptation but also in profibrotic changes and immune/inflammatory reactions. Adaptation to hypoxia mediated by HIF-1 consists of recruitment of angiogenic precursors and inflammatory cells (Guo, 2015), and increasing vasopermeability. Hypoxia and oxidative stress can take part in inflammation, epithelial-mesenchymal transition, and extracellular matrix

deposition mediated by HIF-1 via interacting with classical NF- κ B and TGF- β signaling pathways. Thus HIF-1 may be involved in the pathogenesis of BO (Semenza, 2016).

The BEAS-2B cell line is composed of classical epithelial cells (Ke, 1988) (Reddel, 1988), but these cells have a low resistance to the maintenance of the epithelium. This weakness may be due to the formation of tight junctions which are not as strong as for other cells lines (Stewart, 2012) (Malm, 2018). It is therefore possible that BEAS-2B cells are more susceptible to EMT than other epithelial cells (primary bronchial cells

One major side effect of immunosuppressive drugs like calcineurin inhibitors or mTOR inhibitors is nephrotoxicity. Nephrotoxicity is characterized by acute reversible and/or chronic partly irreversible nephrotoxicity (El Hennawy, 2021). Acute renal toxicity is the result of vasoconstriction of glomerular arterioles (English, 1987) by activation of the renin-angiotensin system, toxic tubulopathy and in some cases thrombotic microangiopathy-hemolytic-uremic syndrome leading to renal ischemia. Chronic nephrotoxicity is characterized by chronic vascular damages of afferent arterioles with glomerular sclerosis, interstitial fibrosis, and tubular atrophy. These lesions are the result of ischemia of renal tissue inducing oxidative stress. Tissue hypoxia and oxidative stress generate cell apoptosis, cause inflammation, and lead to EMT of renal tubular cells causing fibrosis, an irreversible status. We postulate that mechanisms of calcineurin inhibitor nephrotoxicity have similarities with TAC-induced bronchial epithelial EMT.

Immunosuppressive treatments in solid organ transplantation are associated with increased incidence of various cancers. The high intensity of immunosuppression and the increased stimulation of oncoviruses are important factors, which increase the risk of developing cancers in solid organ transplantation patients. Calcineurin inhibitors are known to increase tumor development and growth (Lichtenberg, 2017) and to activate the canonical TGF β pathway. Anti m-TOR compounds have anti-tumor activity (Saber-Moghaddam, 2019) by blocking the cell cycle as well as inhibiting VEGF. Knowing that, according to our work, TAC could promote tumor cell activation via EMT. In contrast, the effect of EVE could be more ambiguous.

Several points can limit the scope of our results. TAC and EVE have only been added at one time point to the culture medium over several days, whereas the dosage of TAC or EVE on patients indicates daily intake, to maintain a constant tissue concentration. However, in our

single-cell system, the effects are concentration-dependent and the clearance mechanisms present in a whole body are abolished. The contribution of EMT as a major source of myofibroblasts infiltrating the airways after lung transplantation remains a matter of debate. Indeed, recent studies using lineage-tracing tools identified recipient-derived myeloid progenitors expressing the macrophage marker CD68 as a relevant contributing system to fibrosis in an animal model of post-transplant obliterans bronchiolitis. In this model only rare epithelial-to-mesenchymal transition phenomena were observed (Di Campli, 2021). This important question of the origin of myofibroblasts or fibroblasts in the pathogeny of BOS is further discussed in the editorial paper (Ask, 2021) reviewing the above-mentioned article of Di Campli and colleagues.

This work is part of the project to study the effects of IS in the process of EMT and signaling pathways involved in CLAD. We constituted a local cohort at Strasbourg University Hospital (NCT02458274) aiming to study the effects on EMT of epithelial cells in culture, of membrane MPs isolated from circulating blood or from bronchoalveolar fluid of lung transplant patients with or without BOS. We plan also to study the effects of immunosuppressive drugs and membrane microparticles in organoids obtained by 3D cultures.

In summary we provide first leads and a better understanding of the role of EMT in chronic lung allograft dysfunction and identify the signaling pathways involved in EMT of bronchial epithelial cells. We propose that immunosuppressive drugs (TAC or EVE) impair healing of bronchial epithelium occurring after alloimmune or non-alloimmune (inflammatory or ischemic) injuries. Our results should encourage optimizing the immunosuppressive treatment by a better balance between the beneficial effects of preventing chronic rejection and adverse effects related to their pro-fibrotic effects. The optimization could involve a better adjustment of IS doses, and/or a better combination of IS treatment. The research of active treatment on bronchial remodeling is also warranted.

References

1. Ask K, Vierhout M, Dvorkin-Gheva A, Shi W. Mononuclear phagocytic system and fibrosis: back to the future? *Eur Respir J* 2021;57(3):2004466.
2. Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, Dawson TM, Dawson VL, Snyder S. FKBP12, the 12 kDa FK-506 binding protein, is a physiological regulator of the cell cycle *PNAS*, 2000. 98(5):2425-2430
3. Benden C, Houghton M, Leonard S and Huber LC. Therapy option for chronic lung allograft dysfunction-bronchiolitis obliterans syndrome following first-line immunosuppressive strategies: a systematic review. *J Heart Lung transplant* 2017; 36(9):921-933
4. Bennett J, Cassidy H, Slattery C, Ryan MP and McMorrow T. Tacrolimus modulates TGF-beta signaling to induce epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells. *J Clin Med* 2016; 5(5):50
5. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodeling after human lung transplantation. *Thorax* 2009; 64:770-777
6. Borthwick LA, Corris PA, Mahida R, Walker A, Gardner A, Suwara M, Johnson GE, Moisey EJ, Brodle M, Ward C, Perry JD, De Soyza, Mann DA, Fischer AJ. TNF-alpha from classically activated macrophages accentuates epithelial to mesenchymal transition on obliterative bronchiolitis. *AM J Transplant* 2013; 13(3):62-133
7. Borthwick LA, Sunny SS, Oliphant V. *Pseudomonas aeruginosa* accentuates epithelial to mesenchymal transition in the airway. *Eur. Respir. J* 2011; 32:1237-1247
8. Bos S, Vos R, Raemdonck E, Verleden GM. Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020?. *Curr Opin Organ transplant* 2020; 25(3):268-273
9. Bridle KR, Popa C, Morgan ML. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl* 2009; 15:1315–1324
10. Di Campli MP, Azouz A, Assabban A, Scaillet J, Splittgerber M, Van Keymeulen A, Libert F, Remmelink M, Le Moine A, Lemaitre P, Goriely S. The mononuclear phagocyte system contributes to fibrosis in post-transplant obliterans bronchiolitis. *Eur Respir J*. 2021 Mar 11;57(3):2000344
11. El Hennawy HM, Faifi ASA, El Nazer W, Mahedy A, Kamal A, Al Faifi IS, Abdulmalik H, Safar O, Zaitoun MF, Fahmy AE. Calcineurin Inhibitors Nephrotoxicity Prevention Strategies With Stress on Belatacept-Based Rescue Immunotherapy: *Rev Curr Evid Transplant Proc* 2021
12. Felton VM, Inge LJ, Willis BC, Bremner RM and Smith MA. Immunosuppression-induced bronchial epithelial-mesenchymal transition: A potential contributor to obliterative bronchiolitis, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(2):523-530
13. Guo L, Xu JM, Liu L, Liu SM and Zhu R. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is involved in bleomycin-induced lung fibrosis, *Biomed Res Int* 2015; 10:23791
14. Han Q, Lin L, Zhao B, Wang N, Lin X. Inhibition of mTOR ameliorated bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 540(4):839-845
15. Hu D, Zhang D, Liu B, Liu Y, Zhou Y, Yu Y, Shen L, Long C, Zhang D, Liu X, Lin T, He D, Xu T, Timashev P, Butnaru D, Zhang Y, Wei G. Human ucMSCs seeded in a decellularized kidney scaffold attenuate renal fibrosis by reducing epithelial-mesenchymal transition via the TGF- β /Smad signaling pathway. *Pediatr Res* 2020; 88(2):192-201.
16. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial mesenchymal transition. *J. Clin. Invest* 2009; 119:1420-1428

17. Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI, Miyashita M, McMenamin M, Lechner JF, Harris CC. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Diff* 1988; 38:60–66
18. Kim M, Martin ST, Townsend K, Gabardi S. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacoth* 2014; 34(7):733-744.
19. Korfhagen TR, Le Cras TD, Davidson CR et al. Rapamycin prevents transforming growth factor- α -induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41:562–572
20. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3): 178-196
21. Le Pavec J, Dorfmüller P, Perros F, Mercier O, Fadel E. Bronchiolite oblitérante post-transplantation pulmonaire. *La lettre du pneumologue* 2013
22. Li X, Lu P, Shao XF, Jiang T, Liu F, Li G. Klotho Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition In Vitro via Wnt/ β -Catenin Pathway and Attenuates Chronic Allograft Dysfunction in a Rat Renal Transplant Model. *Ann Transplant* 2021 ;26:e930066
23. Lichtenberg S, Rahamimov R, Green H, Fox BD, Mor E, Gafter U, Chagnac A, Rozen-Zvi B. The incidence of post-transplant cancer among kidney transplant recipients is associated with the level of tacrolimus exposure during the first year after transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2017; 73(7):819-826
24. Malm SW, Amouzougan EA and Klinecki WT. Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line, *Toxicol In Vitro* 2018; 50:383-390
25. Masola V, Amedeo Carraro, Gianluigi Zaza, Gloria Bellin, Umberto Montin, Paola Violi, Antonio Lupo and Umberto Tedeschi. Epithelial to mesenchymal transition in the liver filed: the double face of Everolimus in vitro. *BMC Gastro* 2015; 15:118
26. Mohri T, Kameshita I, Suzuki S, Hioki K, Tokunaga R, Takatani S. Rapid adhesion and spread of non-adherent colon cancer Colo201 cells induced by the protein kinase inhibitors, K252a and KT5720 and suppression of the adhesion by the immunosup- pressants FK506 and cyclosporin A. *Cell Struct Funct* 1998 ; 23,5:255-64
27. Morel O, Hugel B, Jesel L, Lanza F, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, Cazenave JP, Freyssinet JM, Toti F. Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus. *Thromb. Haemost* 2004; 91(2):345-353
28. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363(15):1451-1462.
29. Okadome T, oeda E, Saitoh M, Ichijo H, Moses HL, Miyazono K and Kawabata M. Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor- β type I receptor *in vivo*. *Comm*1996; 36:21687-90
30. Piscione T, Phan T, Rosenblum N. BMP7 controls colleting tubule cells, proliferation and apoptosis via smad1-dependant and independent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(1):19-33
31. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 1988; 48:1904–9
32. Saber-Moghaddam N, Nomani H, Sahebkar A, Johnston TP, Mohammadpour AH. Thechange of immunosuppressive regimen from calcineurin inhibitors to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and its effect on malignancy following heart transplantation. *Int Immunopharmacol* 2019 ;69:150-158

33. Semenza GL. Targeting hypoxia-inducible factor 1 to stimulate tissue vascularization, *J Investig Med* 2016; 64(2):361-363
34. Shihab FS, Bennett WM, Yi H et al. Effect of cyclosporine and sirolimus on the expression of connective tissue growth factor in rat experimental chronic nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2006; 26:400–407
35. Simon N, Zini R, Morin C. et coll. Prednisolone and azathioprine worsen the ciclosporine A-induced oxidative phosphorylation decrease of kidney mitochondria. *Life Sci* 1997; 61 : 659-66.
36. Stewart CE, Torr EE, Mohd Jamili NH, Bosquillon C, Sayers I. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. *J Allergy* 2012; 2012:1–11
37. Sun Y, Fu J, Xue X, Yang H, Wu L. BMP7 regulates lung fibroblast proliferation in newborn rats with bronchopulmonary dysplasia. *Mol Med Rep* 2018; 17(5):6277-6284
38. Takeshi N, Vyachesav P, David LP, John AB and Patricia W. Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome. Springer 2011; 33:135–156
39. Thaunat O and Morelon E. Immunosuppression et cancers : effet pro et antitumoral des traitements immunosuppresseurs, *Le courrier de la transplantation* 2003, 3(2) :87-92
40. Tomei P, Masola V, Granata S, Bellin G, Carratù P, Ficial M, Ventura VA, Onisto M, Resta O, Gambaro G, Chilosi M, Lupo A, Zaza G. Everolimus-induced the dosage does matter in transplantation. *J Nephrol* 2016; 29(6):881-891.
41. Willis C and Borok Z. TGF- β induced EMT: mechanisms and implication for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3):525-534
42. Xu X, Dai H, Geng J, Wan X, Huang X, Li F, Jiang D and Wang C. Rapamycin increases CCN2 expression of lung fibroblasts via phosphoinositide-3kinase, *Lab Inves* 2015; 95:846-85
43. Xudubois YC, Galichon P, Brocheriou I, Baugey E, Morichon R, Jouanneau C, Ouali N, Rondeau E, Hertig A. Expression of the transcriptional regulator snail1 in kidney transplants displaying epithelial to mesenchymal transition features. *Nephrol Dia Transplant* 2014; 29(11):213-644
44. Xudubois YC, Peltier J, Brocheriou I, Suberbielle-Boissel C, Djamali A, Reese S, Mooney N, Keuylian Z, Lion J, Ouali N, Levy PP, Jouanneau C, Rondeau E, Hertig A. Markers of endothelial to mesenchymal transition: evidence for antibody endothelium interaction during antibody mediated rejection in kidney recipients. *J AM Soc Nephro* 2016; 27(1):32432
45. Zhang C, Niu Y, Yu L, Lv W, Abuduwufuer A, Cao A and Hu J. The role of epithelial-mesenchymal transition in the post-lung transplantation bronchiolitis obliterans. *J Cardiothorac Surg* 2017; 12(1):119

Acknowledgments

We would like to thank the “Air Liquide foundation” which partly funded this study. Air Liquide Foundation, 75 quai d’Orsey, Paris, France.

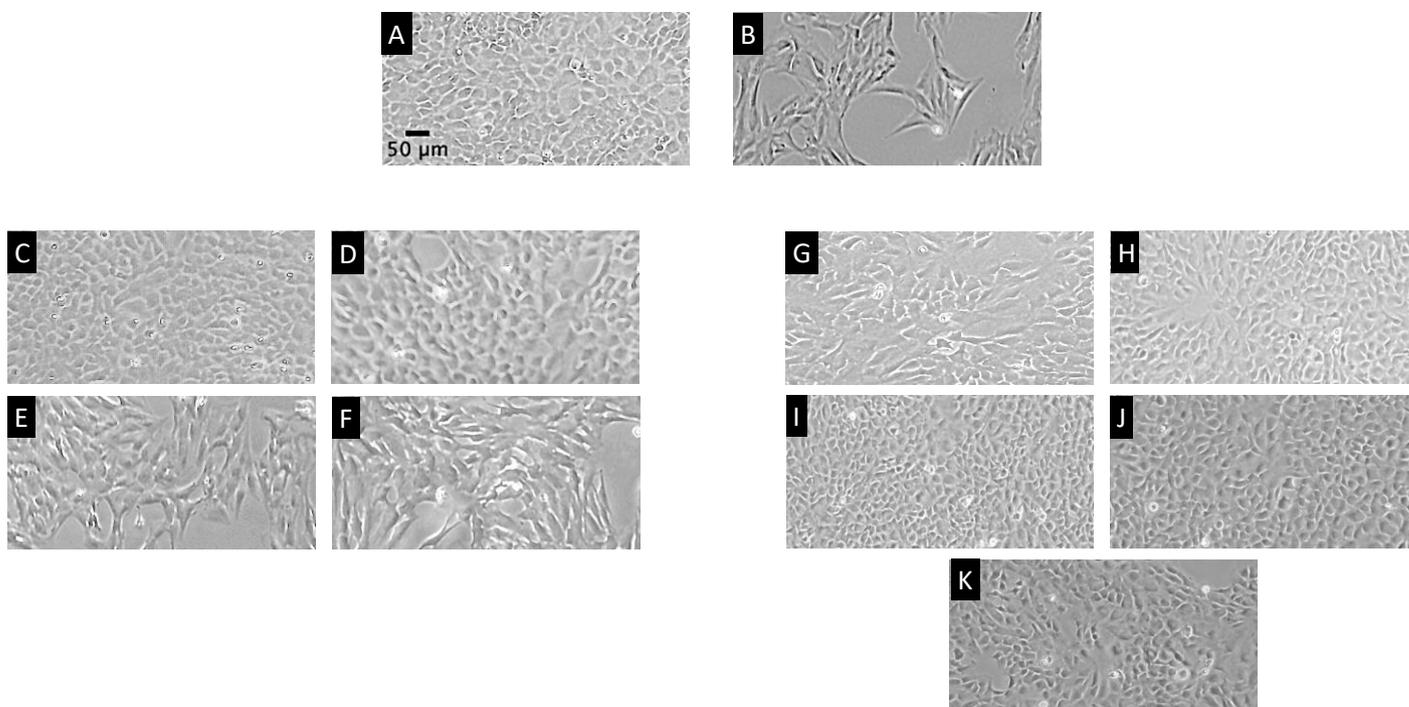


Figure 1: Cell morphology of BEAS-2B with TAC and EVE at different concentration by optical microscopy.

Cells were analyzed after 72 hours of stimulation. A: Untreated cells, B: TGF- β + TNF- α (inductor of EM), C: TAC 1 μ M, D: TAC 5 μ M, E: TAC 10 μ M, F: TAC 20 μ M and G: EVE 0,1nM, H: EVE 1nM, I: EVE 10nM, J: EVE 100nM, K: EVE 1 μ M.

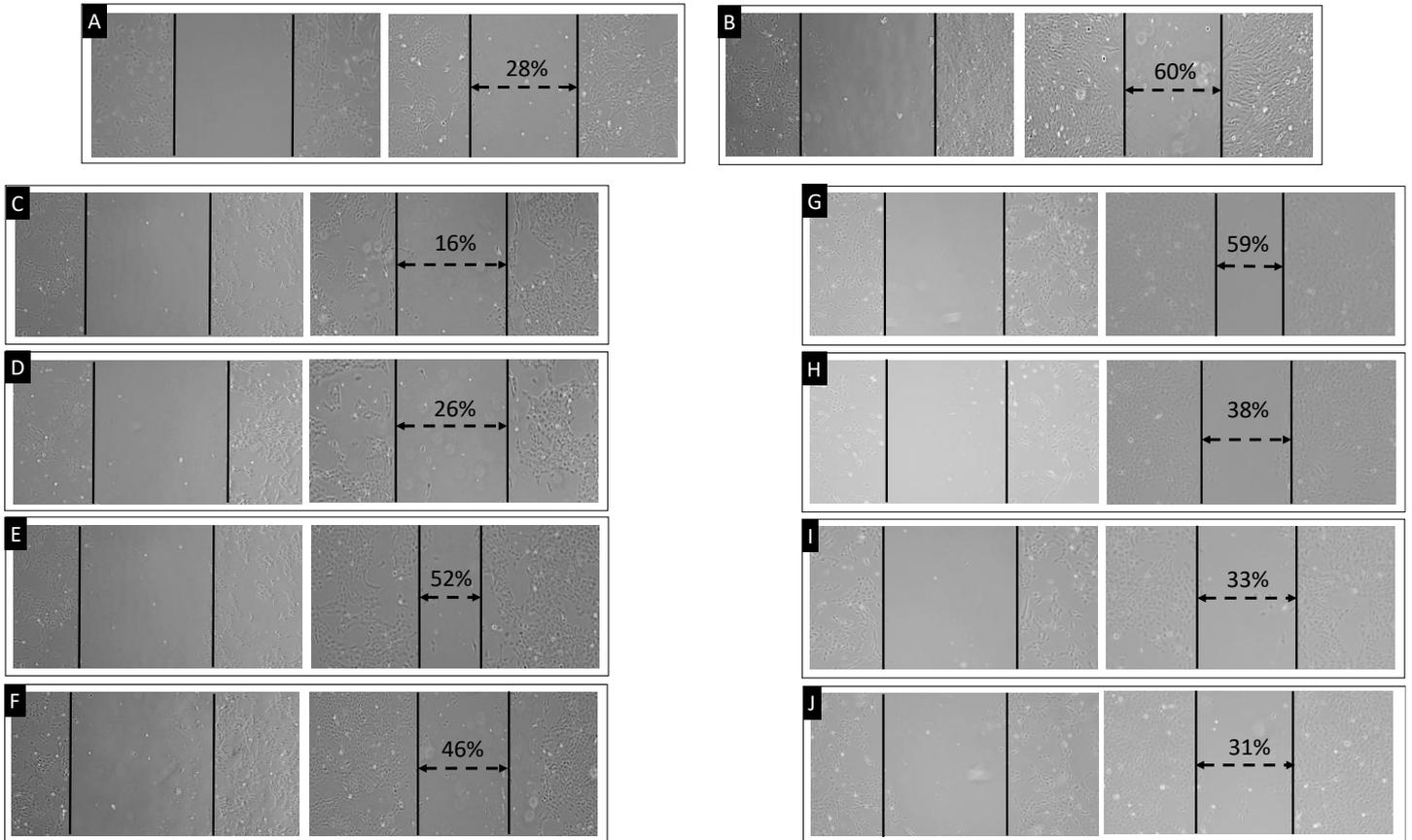


Figure 2: Gap filling by scratch test, observation with an optical microscope at 2 times: 0h and 72h.

A: untreated cells, B: $TGF-\beta+TNF-\alpha$, C: TAC $1\mu M$, D: TAC $5\mu M$, E: TAC $10\mu M$, F: TAC $20\mu M$, G: EVE $0,1nM$, H: EVE $1nM$, I: EVE $10nM$, J: EVE $100nM$, K: EVE $1\mu M$.

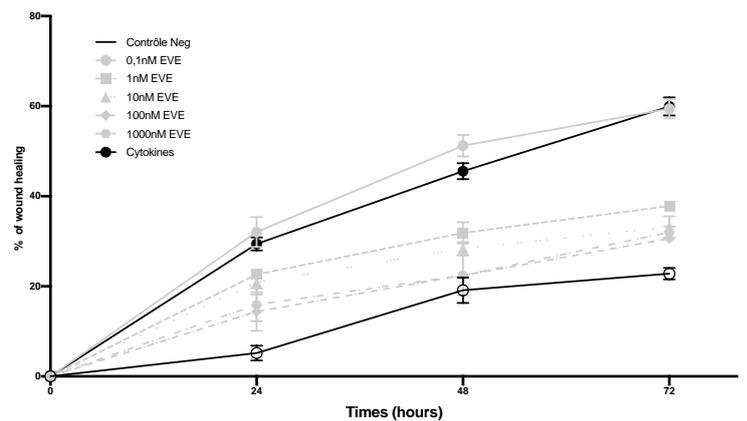
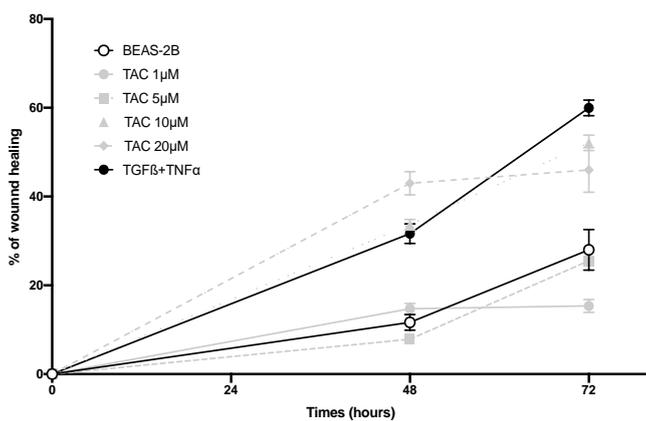


Figure3: Impact of TAC treatments on the kinetics of gap filling in the BEAS-2B cell layer.

The kinetics are carried out by scratch-test and the filling was calculated by the difference between the area of the gap at $T=0h$ and the area of this same gap at 72h. A: gap filling kinetics of increasing concentrations of TAC, B: gap filling kinetics of increasing concentrations of EVE.

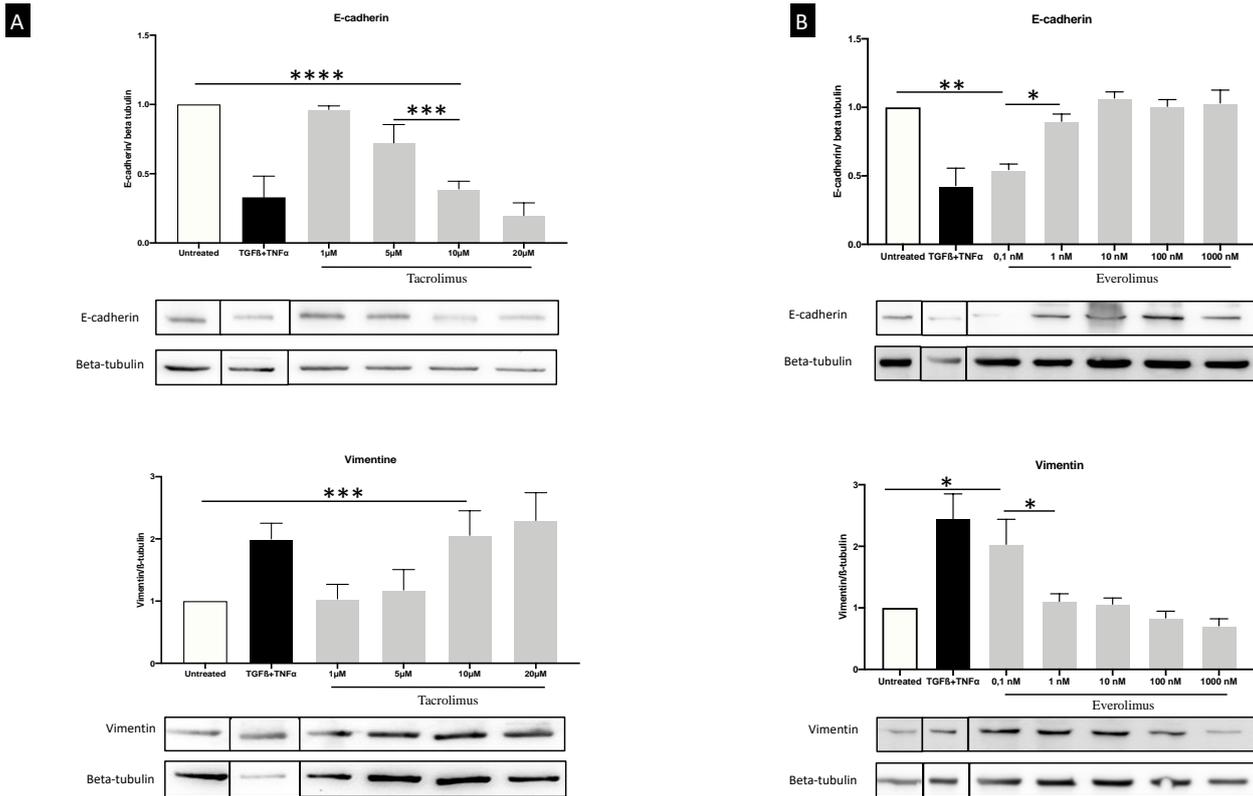


Figure 4: Impact of TAC and EVE on the expression of epithelial and mesenchymal markers by BEAS-2B cells.

The expression of Vimentin and E-cadherin was studied after 72h incubation with TAC and EVE at different concentrations, with cytokines (TGF- β + TNF- α) and unstimulated cells. Degree of expression is expressed by the ratio of optical density of the protein of interest and that of β -tubulin measured in the sample: (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)

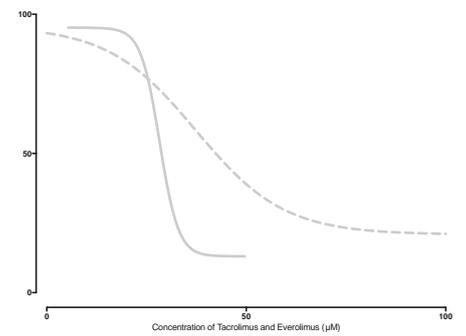
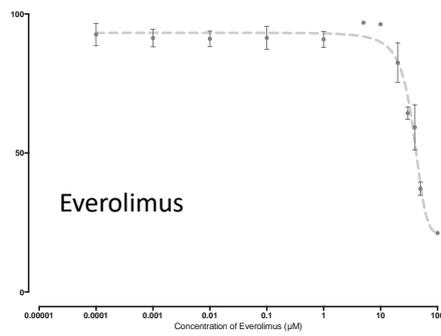
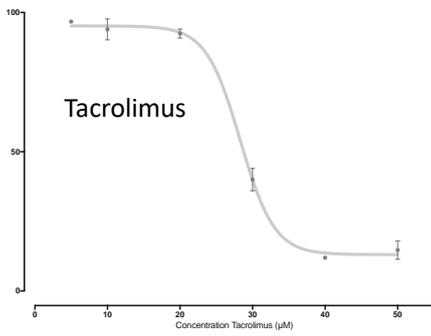
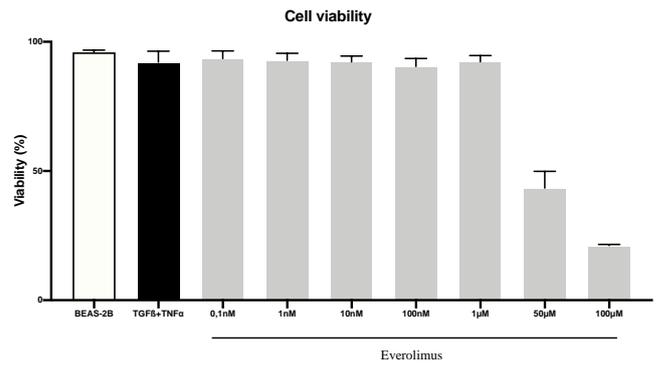
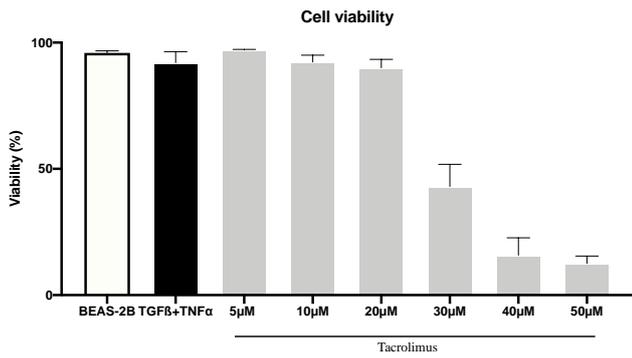


Figure 5: Impact of immunosuppressive drugs toxicity defined by EC50.

TAC and EVE induce a toxicity from 30μM and 50μM respectively. TAC induces a toxicity more important than EVE

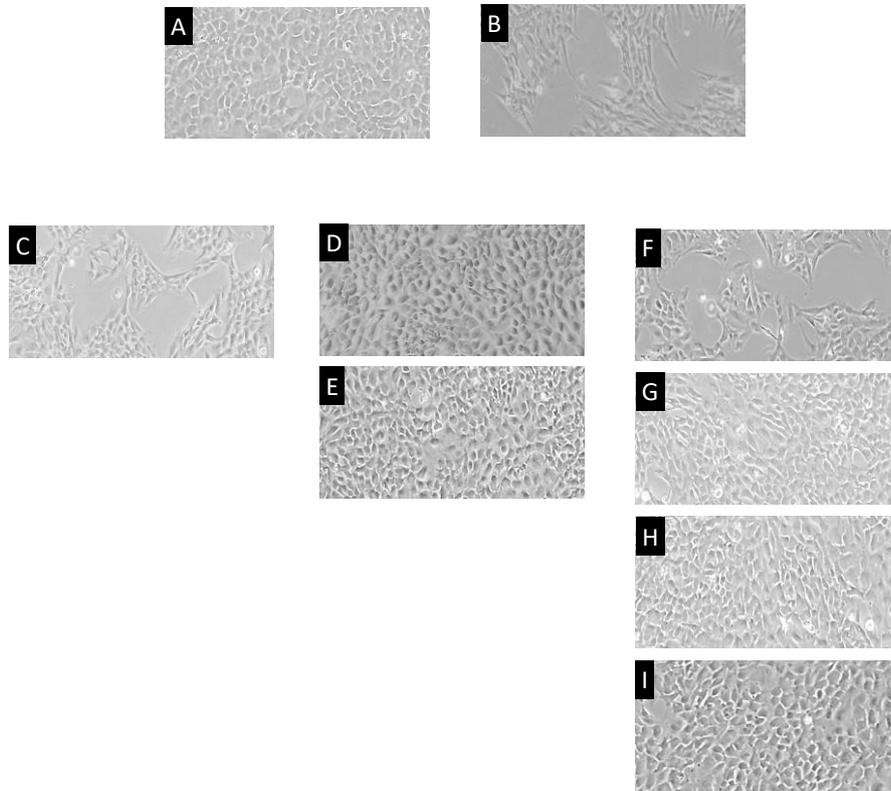


Figure 6: Cell morphology of BEAS-2B with 10 μ M TAC and at different concentration of BMP7 by optical microscopy. Cells were analyzed after 72 hours of stimulation. A: Untreated cells, B: TGF- β +TNF- α (inductor of EMT), C: TAC 10 μ M, D: BMP7 10ng/mL, E: BMP7 250ng/mL, F: TAC + BMP7 10ng/mL, G: TAC + BMP7 50ng/mL, H: TAC + BMP7 100ng/mL, I: TAC + BMP7 250ng/mL

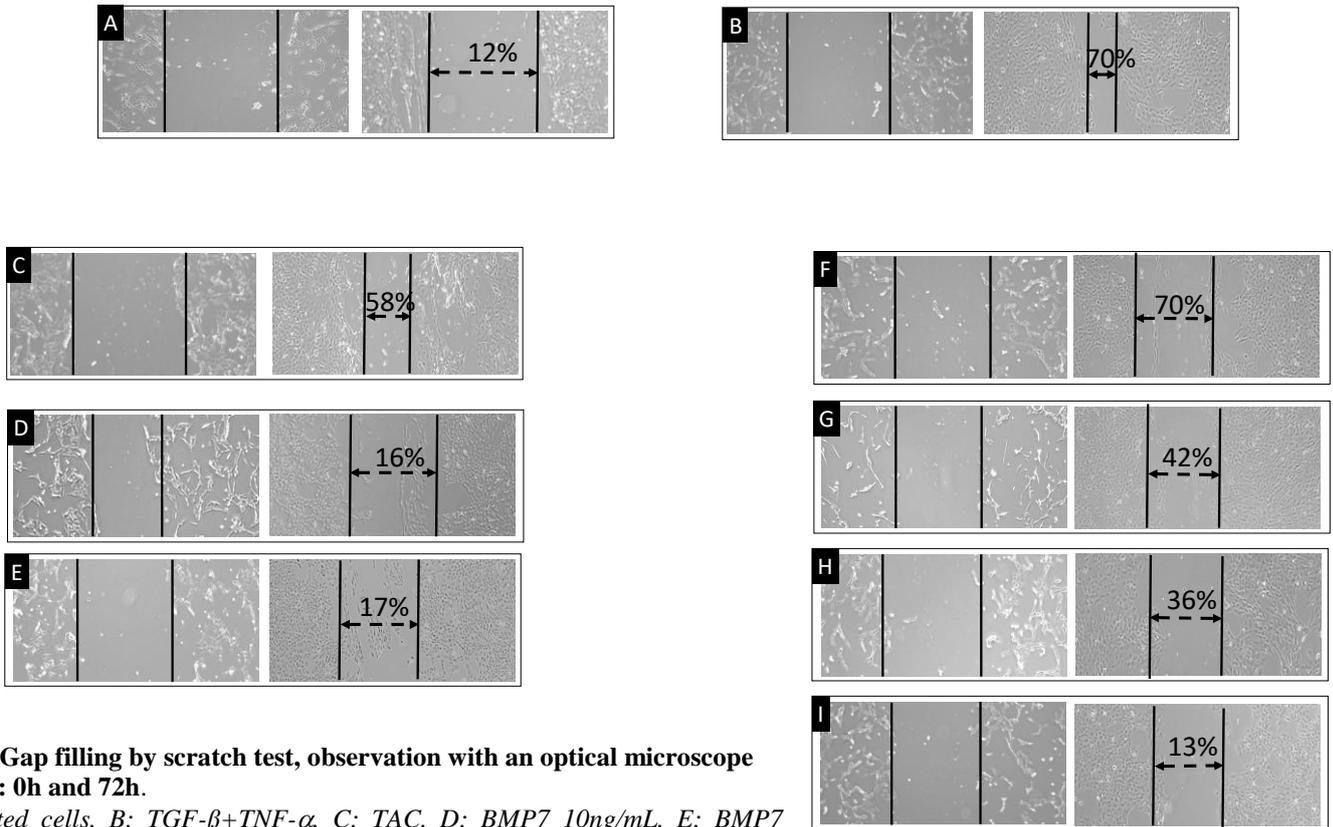


Figure 7: Gap filling by scratch test, observation with an optical microscope at 2 times: 0h and 72h.

A: untreated cells, B: TGF- β +TNF- α , C: TAC, D: BMP7 10ng/mL, E: BMP7 250ng/mL, F: TAC+BMP7 10ng/mL, G: TAC+BMP7 50ng/mL, H: TAC+BMP7 100ng/mL, I: TAC+BMP7 250ng/mL.

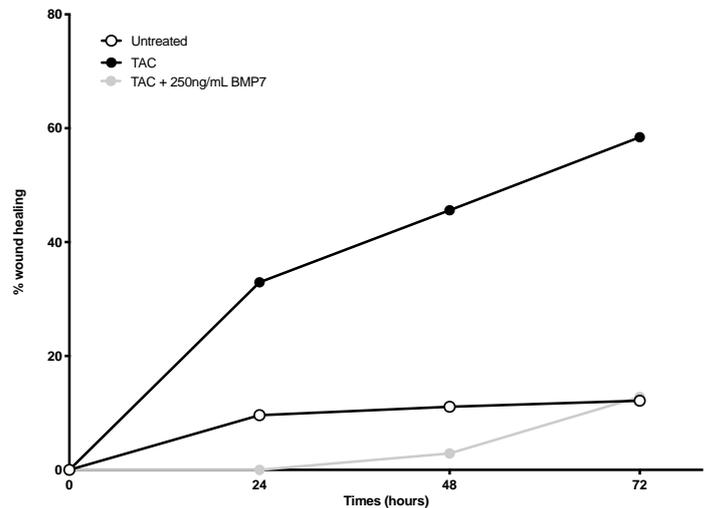
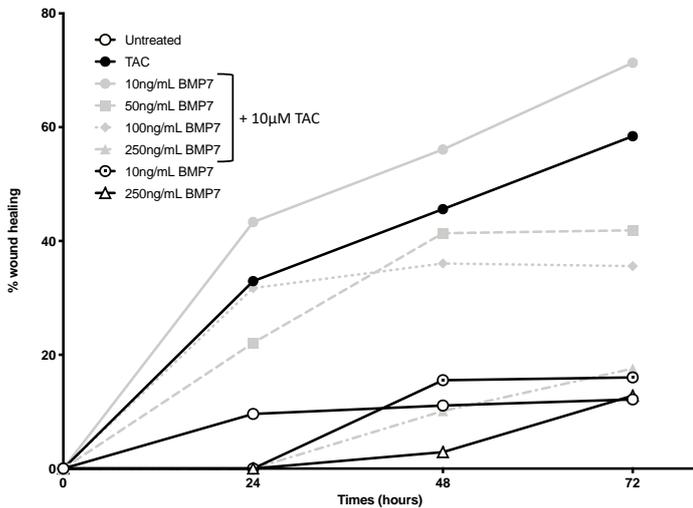


Figure 8: Impact of BMP7 on the kinetics of gap filling in the BEAS-2B cell layer.

The kinetics are carried out by scratch-test and the filling was calculated by the difference between the area of the gap at T=0h and the area of this same gap at 72h: gap filling kinetics of increasing concentrations of BMP7

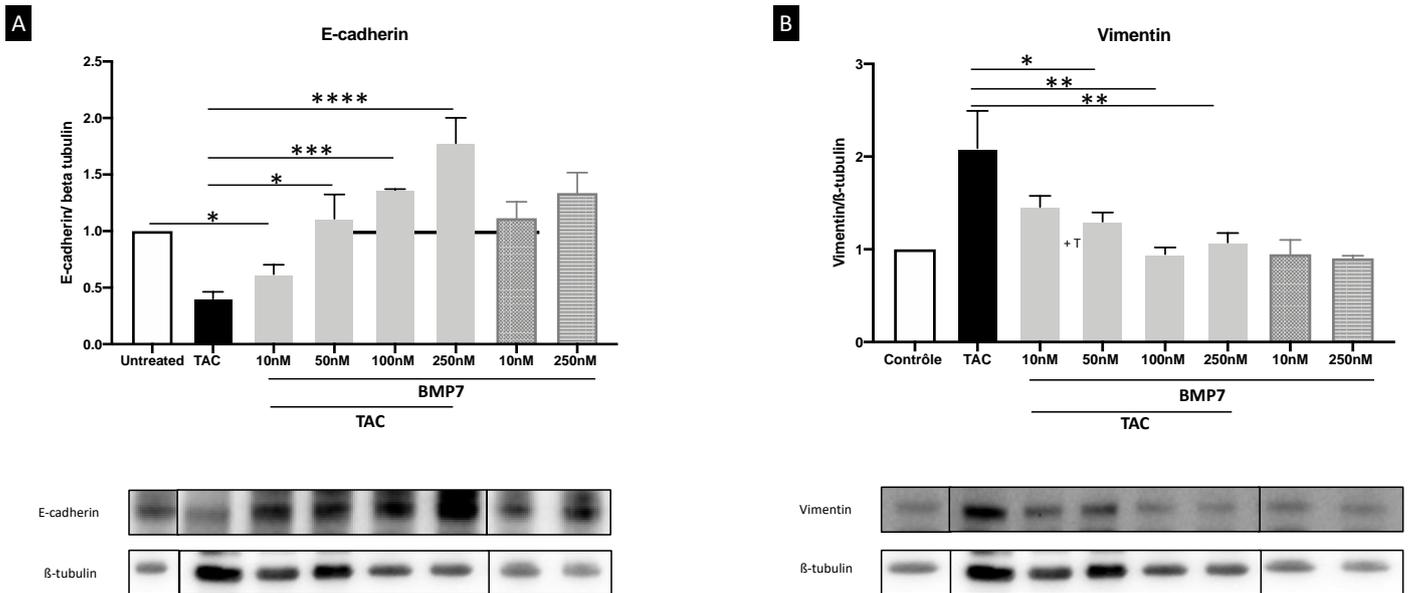


Figure 9: Impact of BMP7 on the expression of epithelial and mesenchymal markers by BEAS-2B cells.

The expression of Vimentin and E-cadherin was studied after 72h incubation with TAC and different concentrations of BMP7 and unstimulated cells. Degree of expression is expressed by the ratio of optical density of the protein of interest and that of β -tubulin measured in the sample: (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)

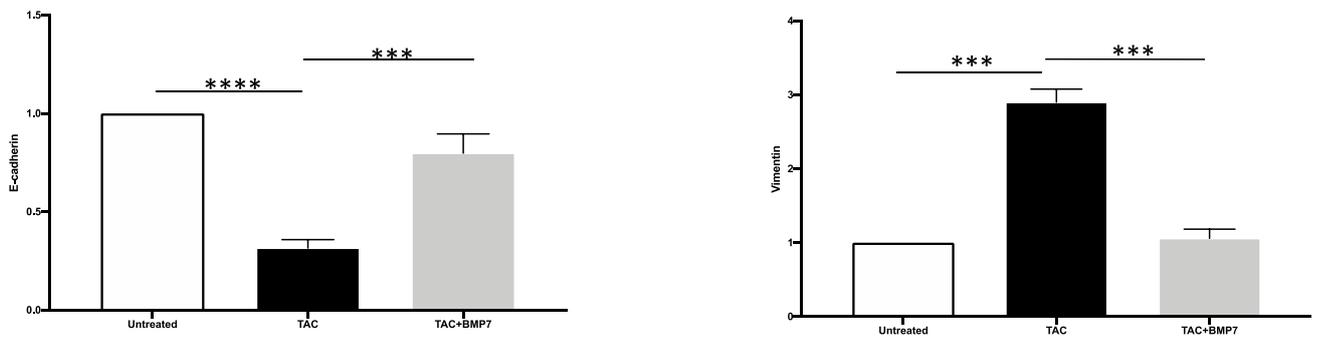
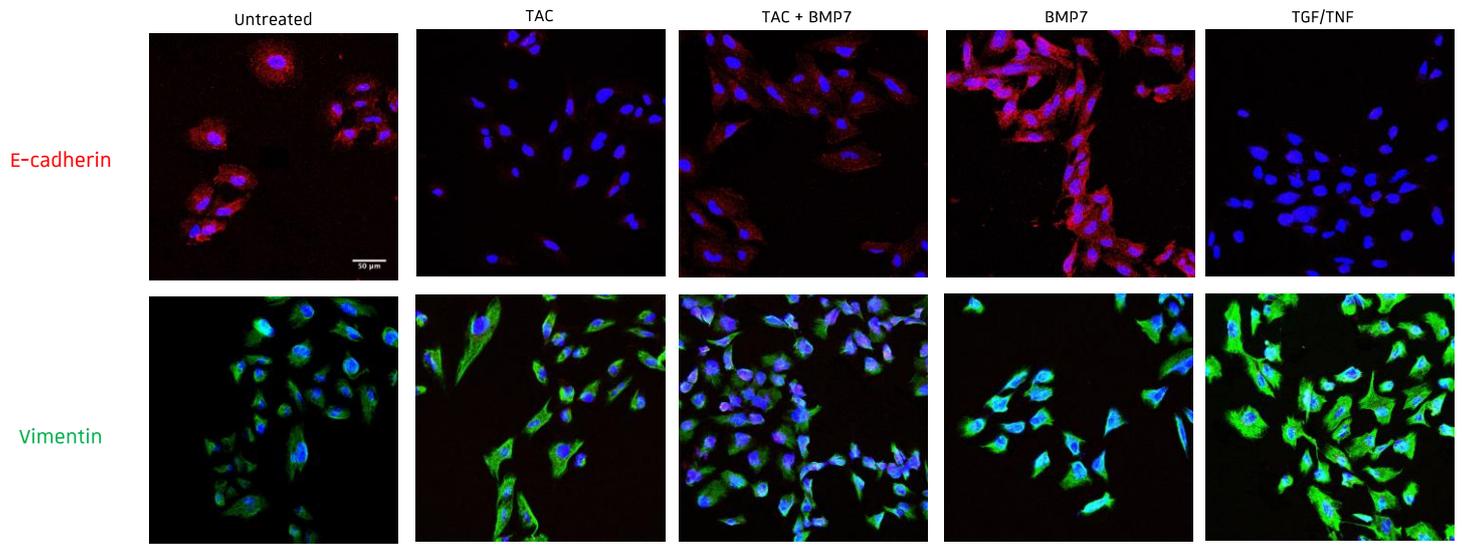


Figure 10: Impact of BMP7 on the expression of epithelial and mesenchymal markers by BEAS-2B cells.

The expression of Vimentin and E-cadherin was studied after 72h incubation with TAC and different concentrations of BMP7 and with cytokines ($TGF-\beta + TNF-\alpha$) and unstimulated cells. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)

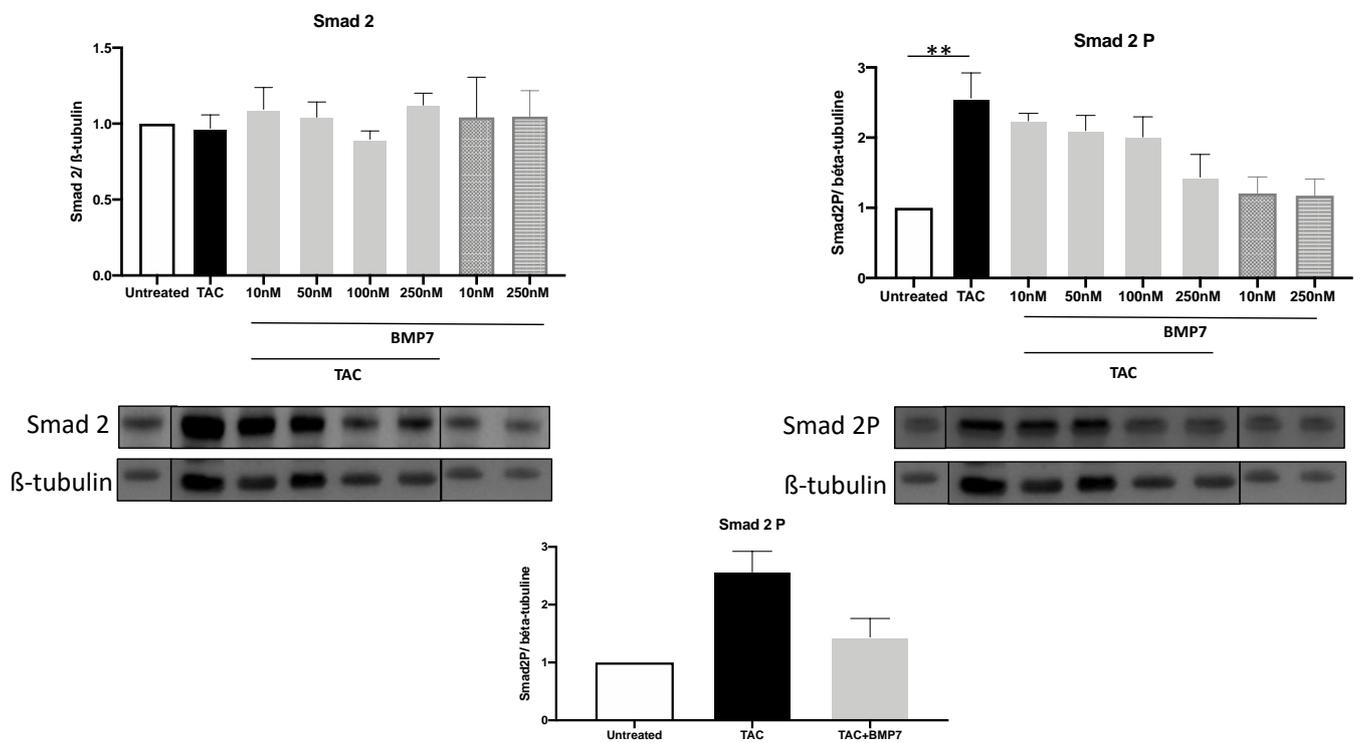


Figure 11: Impact of TAC and BMP7 on SMAD pathway activation.

The expression of SMAD2 and SMAD2P was studied after 72h incubation with TAC and different concentrations of BMP7 and with cytokines ($TGF-\beta$ + $TNF-\alpha$) and unstimulated cells. Degree of expression is expressed by the ratio of optical density of the protein of interest and that of β -tubulin measured in the sample: (**: $p < 0,01$)

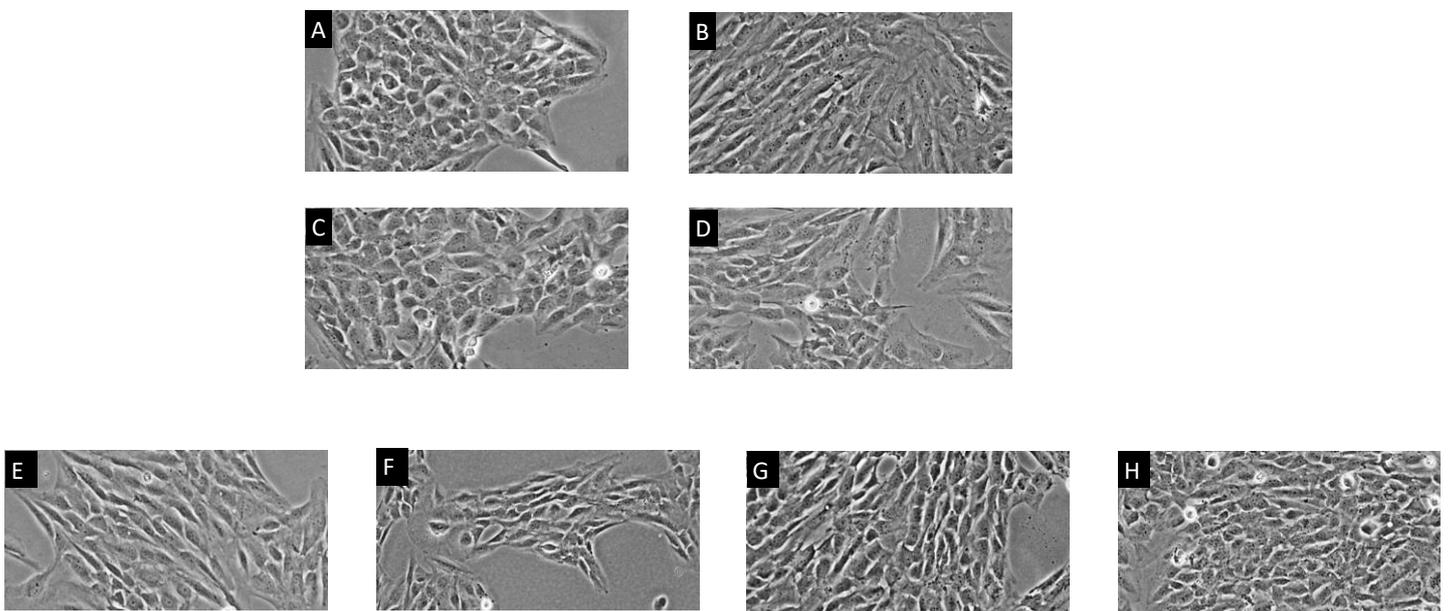


Figure 12: Cell morphology of BEAS-2B with TAC, EVE and MPs by optical microscopy.

Cells were analyzed after 72 hours of stimulation. A: Untreated cells, B: TGF- β +TNF- α (inductor of EMT), C: TAC MPctl (non-pro-inflammatory), D: MPLps, E: TAC, F: EVE, G: MPLps+TAC, H: MPLps+EVE

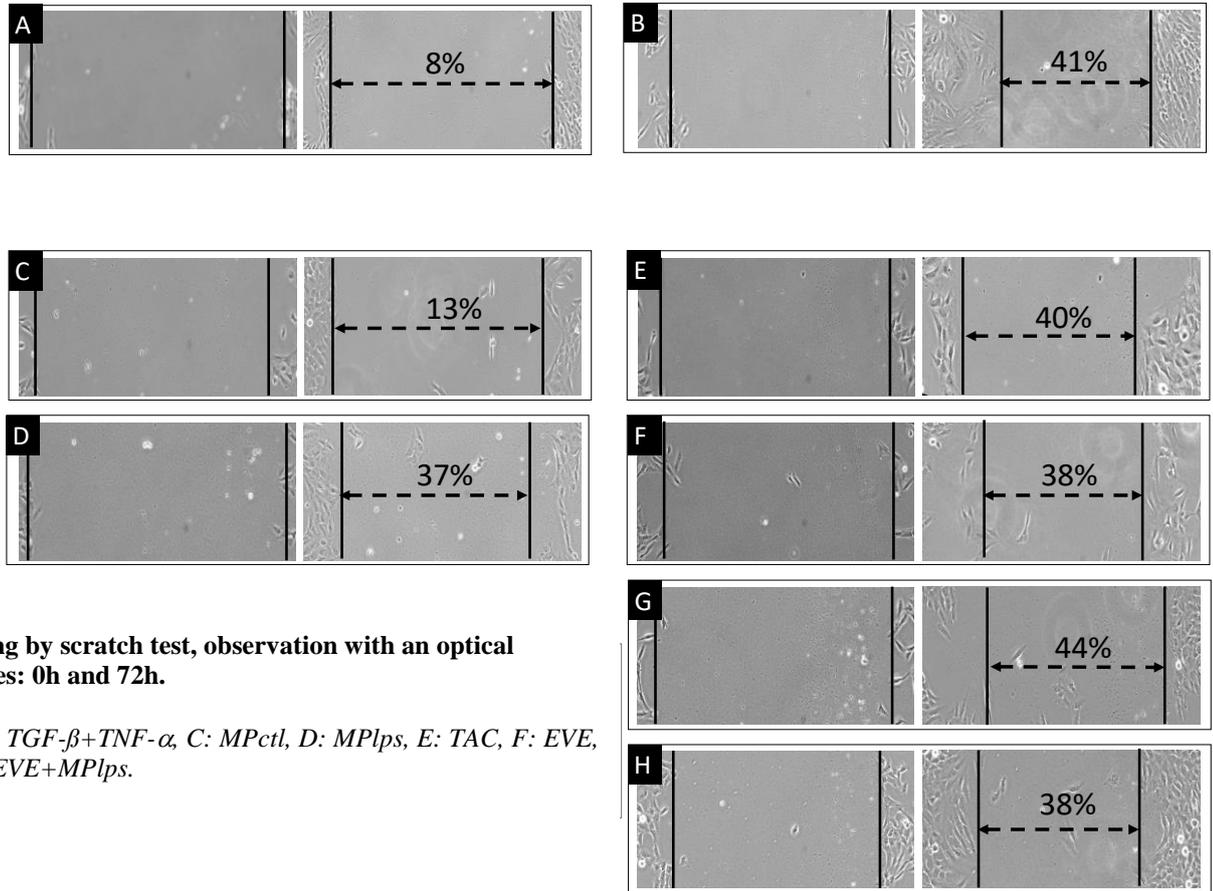


Figure 13: Gap filling by scratch test, observation with an optical microscope at 2 times: 0h and 72h.

A: untreated cells, B: $TGF-\beta+TNF-\alpha$, C: MPctl, D: MPLps, E: TAC, F: EVE, G: TAC+MPLps, H: EVE+MPLps.

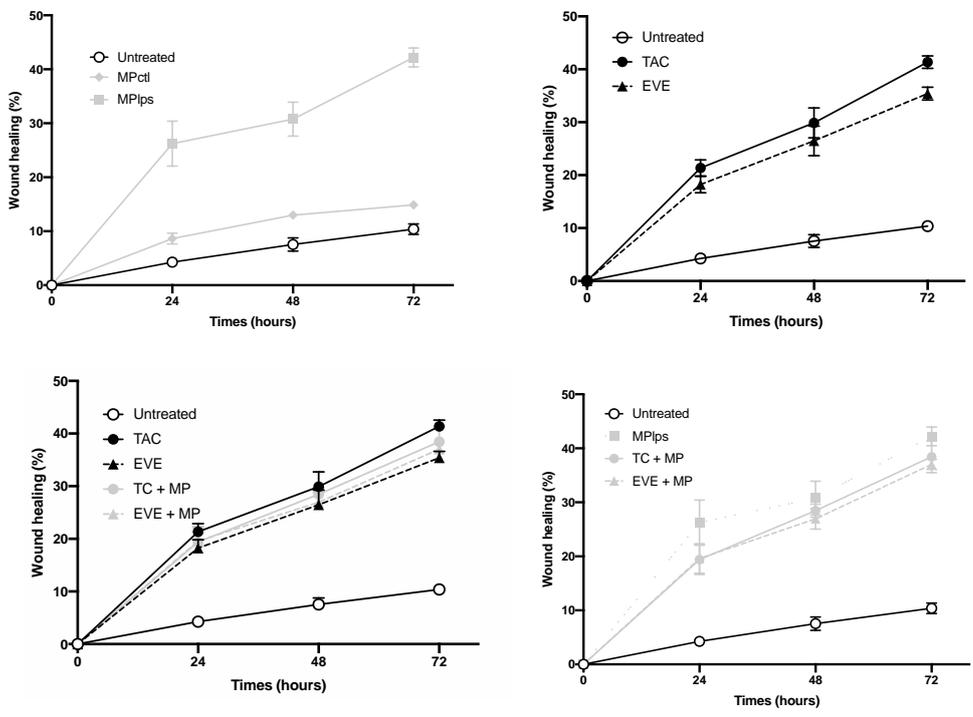


Figure 14: Impact of TAC, EVE and MPs on the kinetics of gap filling in the BEAS-2B cell layer.

The kinetics are carried out by scratch-test and the filling was calculated by the difference between the area of the gap at $T=0h$ and the area of this same gap at 72h: gap filling kinetics of combination of TAC / EVE and MPs.

Conclusion

Nous avons étudié les effets du TAC et de l'EVE sur les cellules épithéliales bronchiques, les BEAS-2B, dans un modèle de culture cellulaire 2D. Nous avons démontré que le TAC, l'EVE et les MPs pro-inflammatoires peuvent, dans certaines conditions, induire une transition épithélio-mésenchymateuse sans provoquer d'apoptose significative.

Le TAC et l'EVE sont tous les deux des macrolides qui diffusent à travers la membrane cellulaire et se lient à FKBP12. Sachant que le TAC utilise la voie SMAD, une étude de cette même voie a été faite pour l'EVE. Il s'avère que l'EVE induit une TEM sans utiliser la voie canonique du TGF- β . Ainsi, les traitements immunosuppresseurs, bien que très efficace contre le rejet de greffe, joueraient un rôle dans la TEM, mécanisme impliqué dans la BO.

*Partie 2 : Mise en place d'un
modèle 3D cellulaire*

Introduction

Afin de mimer plus fidèlement la diffusion des molécules immunosuppressives, un modèle 3D reproductible et à haut rendement est nécessaire. Ce modèle 3D est crucial pour comprendre l'effet du TAC et de l'EVE qui diffusent par voie basale en thérapeutique et seulement par voie apicale dans les modèles de culture cellulaire 2D. Ce modèle 3D s'appuie sur l'utilisation d'aimants. Les cellules BEAS-2B sont liées à des microbilles magnétiques par interaction électrostatique. Les cellules magnétisées sont ensuite transférées dans des plaques de culture où le couvercle est composé d'aimants. Un sphéroïde en lévitation se forme, autrement dit, le sphéroïde ne se situe pas au fond du puits mais à l'interface air-eau ce qui maximise l'apport en oxygène.

Objectifs

L'objectif est de mettre en place un modèle 3D de cellules BEAS-2B fonctionnelles, reproduisant la structure bronchiolaire dans le but de développer des approches pharmacologiques pour analyser l'impact des molécules immunosuppressives.

Matériels et méthodes

Cultures cellulaires 2D de BEAS-2B

La lignée humaine BEAS-2B est issue d'un épithélium bronchique humain sain et a été immortalisée par transformation avec l'adénovirus 12-SV40 (American Type Cell Culture). Les cellules BEAS-2B sont cultivées sur un support adapté aux cellules adhérentes et cultivées en milieu RPMI 1640 (P04-18047), Pan Biotech ©) contenant 2mM de glutamine et 4,5g/L de glucose, 1% pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sontensemencées à la concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules/mL et cultivées à 37°C, en atmosphère humide et avec 5% de CO₂. Le repiquage de ces cellules est réalisé tous les deux ou trois jours et les cellules sont détachées par protéolyse à l'aide d'une solution de trypsine EDTA (EDTA 200mg/mL, trypsine 170 000 U/L)

Développement du modèle 3D

Le modèle 3D permet de respecter fidèlement les interactions cellulaires ainsi que la diffusion des médicaments à travers la cellule par le côté basal. Pour réaliser ce modèle 3D composé de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B), nous avons utilisé au laboratoire la technique des microbilles magnétiques de Grenier[©]. Les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits pour cellules adhérentes. Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, 1µL de microbilles magnétiques pour 10 000 cellules est ajouté. Les cellules en présence de microbilles sont incubées à 37° pendant plusieurs heures. Les cellules sont trypsinisées avec une méthode courante et centrifugées à 550g, 5 minutes à température ambiante. La structure est réalisée en lévitation. Ensemencement de 10 000, 50 000 et 100 000 cellules dans une plaque 24 puits non adhérente recouverte avec une plaque aimantée. Le changement de milieu se fait tous les 2-3jours. La formation 3D est réalisée en suspension pendant 7 jours pour obtenir une structure solide comprenant des interactions cellulaires.

Immunofluorescence

Pour mettre en évidence les marqueurs protéiques des sphéroïdes, l'immunofluorescence permet de visualiser la location des protéines.

Après formation, les sphéroïdes sont fixés dans du paraphormaldéhyde 4% pendant une heure à température ambiante. Pour bloquer les sites aspécifiques, les cellules sont incubées avec un tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont d'abord incubées avec des anticorps primaires E-cadhérine (dilution 1/200, ab1415, Abcam[©]) et vimentine (dilution 1/1000, ab151318, Abcam[©]) pendant une nuit. Puis, les cellules sont incubées pendant deux heures dans l'obscurité avec des anticorps secondaires « anti-rabbit » Alexa 488 et « anti-mouse » Alexa 633. Le DAPI est utilisé pour discriminer les cellules et l'observation se fait au microscope confocal.

Résultats

Liaisons cellules-microbilles magnétiques

Afin de former des sphéroïdes, les BEAS-2B doivent être liées aux microbilles magnétiques. Les microbilles, <50nm, sont composées d'or, d'oxyde de fer et de Poly-L-Lysine (PLL) chargées négativement (Souza, 2010). Après incubation des BEAS-2B dans la plaque 24 puits, les microbilles sont rajoutées. Les microbilles se fixent de manière aspécifique aux membranes des cellules via PLL avec environ 50pg/cellule. C'est une fixation électrostatique permise par l'interaction de PLL des microbilles chargées négativement et de la membrane plasmique chargée positivement. Lorsque les cellules ont fixé les microbilles, ils apparaissent au microscope optique sous forme de « hotspots » noirs sur les cellules (Figure 1). Ces « hotspots » sont l'accumulation de microbilles fixées sur les cellules. Les microbilles n'induisent aucun stress cellulaire ce qui permet aux cellules de garder leur phénotype basal (Haisler, 2013), (Tseng, 2013).

Culture de sphéroïdes

Pour récupérer les cellules adhérentes liées aux microbilles, un détachement classique de cellules est réalisé. Après centrifugation le culot est brun foncé, contrairement aux cellules seules où le culot est blanc (Figure 2). Le culot brun montre là encore, la fixation des microbilles sur les cellules. Après avoir récupéré ces cellules, elles sont transférées dans des plaques 24 puits non adhérentes. La plaque est fermée avec un couvercle aimanté de 24 aimants, comprenant ainsi un aimant par puits. Les cellules sont donc en lévitation dans le milieu ce qui permet d'avoir une oxygénation optimale pour les cellules. Une fois fixées, les microbilles restent sur la membrane cellulaire pendant 7 – 8 jours. Ensuite, elles se détachent et restent dans la culture cellulaire ce qui confère aux sphéroïdes de garder leurs pouvoir magnétique.

Analyse morphologique des sphéroïdes

Au microscope optique, les sphéroïdes à 10 000, 50 000 et 100 000 cellules sont sphériques de taille homogène (Figure 3) (Figure4). Les sphéroïdes de 10 000 cellules, 50 000 cellules et 100

000 cellules ont un diamètre moyen de 250 μ m, 520 μ m et 620 μ m respectivement (Figure 5). Le diamètre des sphéroïdes n'est pas proportionnel au nombre de cellules, cela est sans doute dû à une organisation 3D bien structurée et dense.

Au microscope confocal, le diamètre moyen des cellules est le même qu'en microscopie optique. Ainsi les sphéroïdes ont gardé leur intégrité de structure lors de la préparation des échantillons. Après marquage de la E-cadhérine (marqueur épithélial) et Vimentine (marqueur mésenchymateux), il en découle que les sphéroïdes sont sphériques avec une localisation des marqueurs bien spécifiques. A 10 000 cellules, la E-cadhérine est présente au centre du sphéroïde, avec un large pourtour marqué par la vimentine. A 50 000 cellules, la vimentine est localisée en périphérie et la E-cadhérine au centre. Il y a une diminution de la vimentine et une augmentation de la E-cadhérine à 50 000 cellules par rapport à 10 000 cellules. A 100 000 cellules, la vimentine est exprimée uniquement en périphérie latérale des sphéroïdes et la E-cadhérine est fortement exprimée. Il y a une diminution de la vimentine et une forte augmentation de la E-cadhérine à 100 000 cellules par rapport à 50 000 et 10 000 cellules.

Conclusion

Les résultats démontrent la capacité des cellules BEAS-2B à former un micro-tissu permettant de reproduire une structure 3D, proche de la structure bronchiolaire. Différents temps et différentes concentrations de cellules ont été utilisés : à partir de 24h, il y a formation d'un sphéroïde unique par puit. L'analyse en microscopie optique démontre que les cellules ont bien formé des sphéroïdes. De plus, il y a une forte expression de la E-cadhérine pour les sphéroïdes de 100 000 cellules. Ils expriment fortement des marqueurs épithéliaux de jonction cellulaire (E-cadhérine) et peu de marqueur mésenchymateux (Vimentine). Ces résultats sont comparables avec une culture cellulaire 2D, démontrant ainsi l'intégrité cellulaire du sphéroïde. Une concentration faible de cellules engendre un stress cellulaire favorisant un phénotype mésenchymateux du sphéroïde. En parallèle, en culture 2D, lorsque les cellules BEAS-2B sont trop peu nombreuses, elles subissent également un stress. Grâce au modèle 3D, une étude plus représentative de la diffusion des immunosuppresseurs dans les cellules pourra être menée afin d'analyser si les résultats du modèle 3D corroborent les résultats du modèle 2D.

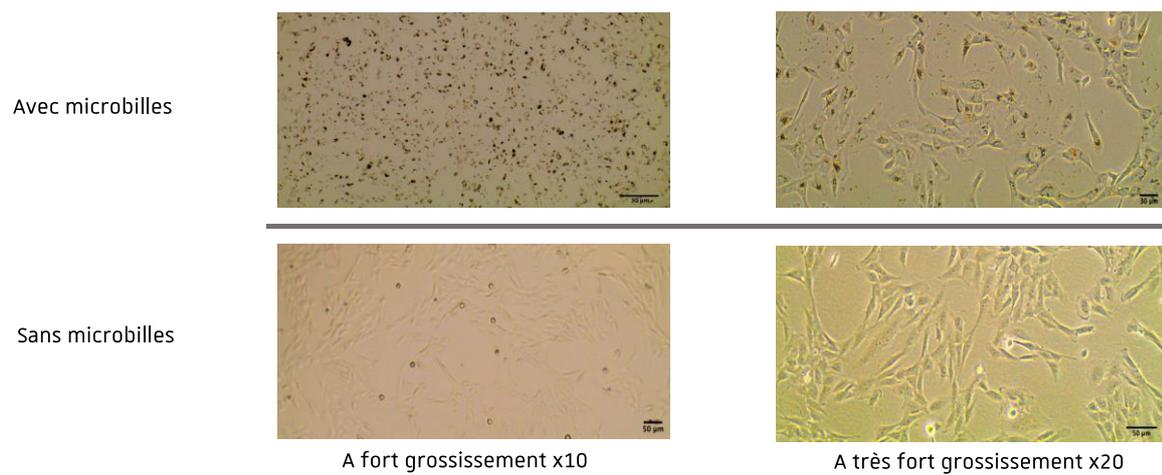


Figure 1 : Discrimination des interactions des microbilles magnétiques avec les cellules BEAS-2B

En présence de microbilles, les cellules possèdent des « spots » noirs observables au microscope optique. Lorsqu'il n'y a que des cellules, aucun spot n'apparaît.

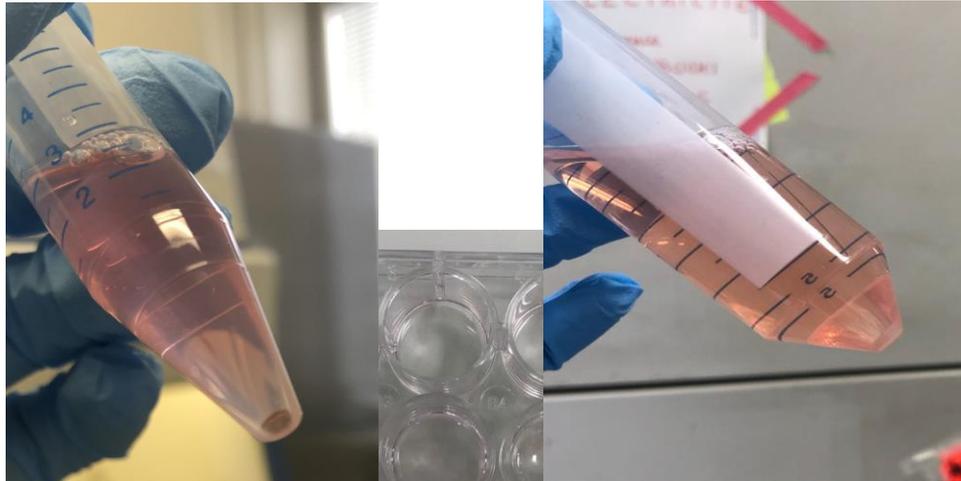


Figure 2 : Cellules liées aux microbilles magnétiques

Après centrifugation des cellules BEAS-2B :

- *A gauche : le culot est noir, dû à l'accumulation de microbilles liées aux cellules au fond du tube*
- *A droite : le culot est blanc, couleur de la concentration de cellules seules*



Figure 3 : Observation à l'œil nu des sphéroïdes après 7 jours d'incubation

Figure 4 : Formation de sphéroïdes de cellules BEAS-2B après 7 jours d'incubation

A : Sphéroïdes de 10 000 cellules, diamètre 200 μ m

B : Sphéroïdes de 50 000 cellules, diamètre 460 μ m

C : Sphéroïdes de 100 000 cellules, diamètre 600 μ m

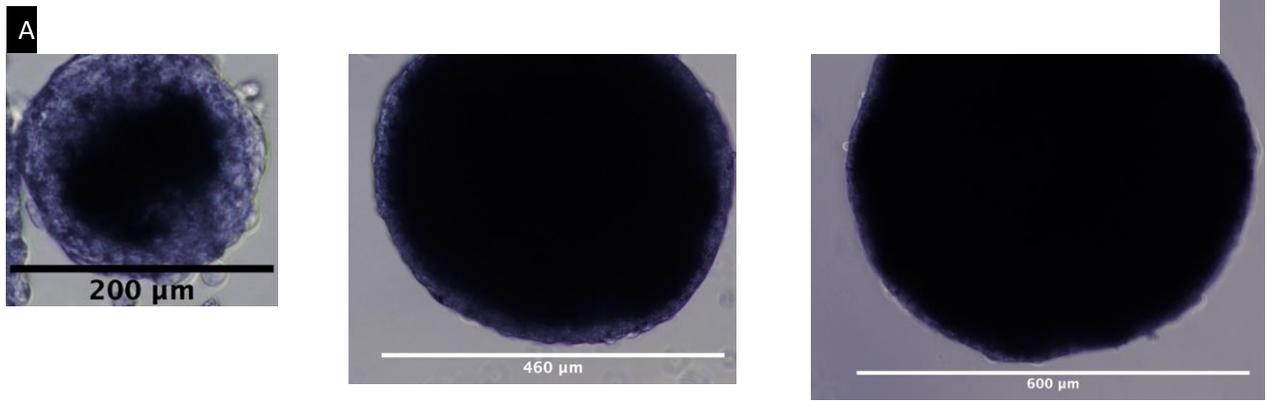
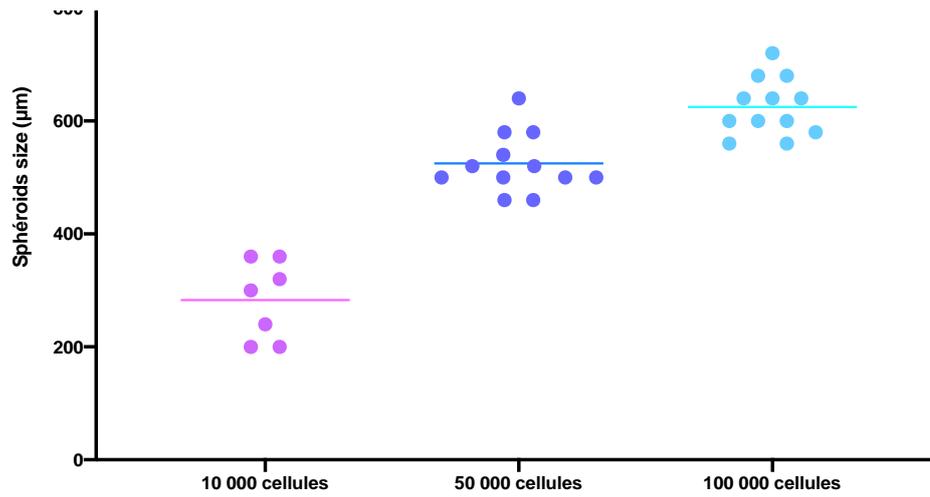


Figure 5 : Représentation graphique de la distribution des tailles des sphéroïdes en fonction du nombre de cellules.



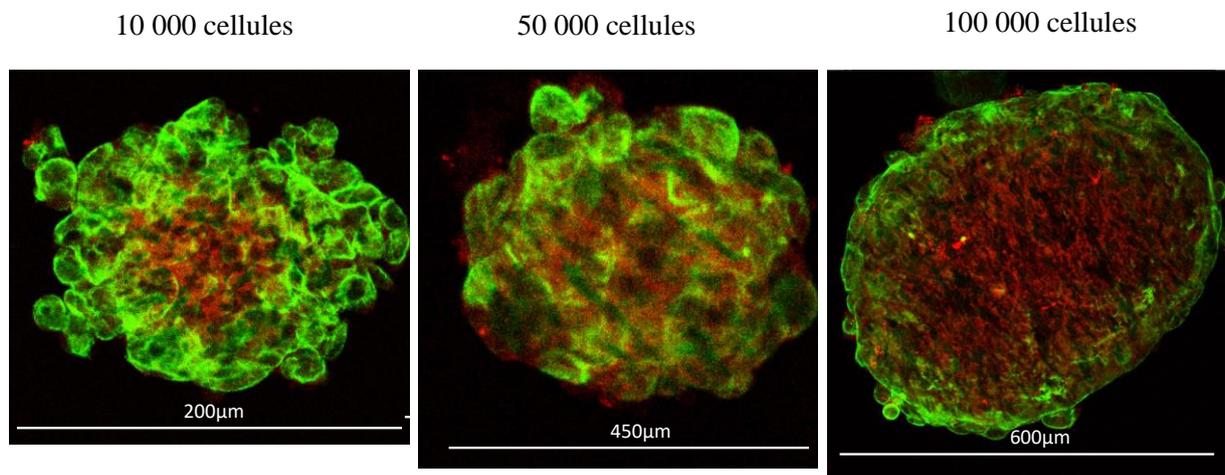


Figure 6 : Formation des sphéroïdes après 7 jours d'incubation

Les sphéroïdes à 10 000 cellules, 50 000 cellules et 100 000 cellules sont marqués en vert pour la vimentine et en rouge pour la E-cadhérine.

Conclusion générale

Les maladies respiratoires sont la troisième cause de décès dans le monde, précédée par les tumeurs et les maladies cardiovasculaires (Santé public France, 2017). La transplantation

pulmonaire est le seul traitement curatif pour les patients sélectionnés ayant une insuffisance respiratoire chronique terminale. Les indications de greffe pulmonaire sont principalement la BPCO, la fibrose idiopathique pulmonaire ou encore la mucoviscidose.

On dénombre 283 transplantations pulmonaire en 2020. Cependant le nombre de greffe pulmonaire diminue depuis 2017 où il était à son apogée ; 376 greffes (d'après l'agence de biomédecine).

Les indications de transplantation pulmonaire augmentent avec le temps. La survie s'est nettement améliorée (Weigt, 2013). Cependant, la LTx est un véritable défi immunologique. La compatibilité du système sanguin ABO ainsi que le système HLA est fondamentale dans le but d'éviter le rejet du greffon pulmonaire.

Après la greffe, les patients peuvent être sujets à différents risques. Le risque de rejet hyper-aigu est un risque qui n'existe presque plus, puisque lors de la greffe un cross-match est réalisé (Al-Rabia, 2009). Le rejet aigu est un rejet épisodique qui se matérialise par des épisodes d'inflammation du greffon (Tejani, 2001). Le rejet chronique, quant à lui, induit une inflammation à bas bruit qui évolue progressivement et qui est un phénomène irréversible (Junior, 2015).

Le rejet chronique s'accompagne d'une dysfonction du greffon. Cette dysfonction peut être restrictive, le RAS « restrictive allograft syndrom » ou oblitérante, la BO qui est majoritaire (Misumi, 2020). A 5 ans, 50% des patients greffés ont développé une BO.

Cette BO est en lien avec différents facteurs de risque telles que l'ischémie-reperfusion, phénomène de haut stress cellulaire, engendrant une inflammation locale, activant l'immunité innée et adaptative (Kalogeris, 2017) et les infections. Les poumons sont de véritables barrières physiques contre les pathogènes de l'environnement extérieur, cependant, les IS favorisent les infections. Lorsque l'immunosuppression est trop excessive, le risque infectieux est très grand et à l'inverse si l'immunosuppression est faible il y a un fort risque de rejet. Ainsi il y a un équilibre à trouver des IS dans le temps afin d'éviter les rejets tout en limitant le risque infectieux (Nakajima, 2011).

Un des mécanismes impliqués dans la BO est la TEM. L'épithélium pulmonaire subi un remodelage cellulaire, un réarrangement du cytosquelette permettant un changement

phénotypique. Ces cellules épithéliales peuvent se transformer en cellules fibroblastiques ou myofibroblastiques. Ces dernières ne joueront plus leur rôle de barrière protectrice. Les cellules subissent une perte d'adhésion cellulaire, avec recrutement de cellules inflammatoires provoquant des lésions du tissu, détruisant ainsi le tissu sain (Jolly, 2018). La TEM est un processus inflammatoire recrutant des facteurs de croissance pour assurer la pérennité du mécanisme (Gonzales, 2014).

Le poumon subi une première inflammation au moment de la greffe : les cellules subissent une hypoxie dû au manque de vascularisation. En condition hypoxique, HIF-1 active l'angiogénèse et recrute ainsi des cellules inflammatoires (Semenza 2016). Le phénomène s'estompe mais les épisodes de rejets aigus qui sont également des épisodes inflammatoires altèrent davantage encore l'épithélium pulmonaire.

L'accumulation des lésions dues aux différentes causes favorise la dysfonction chronique du greffon.

L'inflammation permet le recrutement des cellules immunes, qui, elles mêmes subissent un stress. Ces cellules peuvent libérer ainsi des MPs. Les MPs sont de véritables navettes biologiques transportant de l'information génétique mais également phénotypique. Ces MPs joueraient un rôle important dans le transfert de l'information de la cellule émettrice à la zone cible. Ces MPs peuvent être également utilisées en tant que biomarqueurs (Nieri, 2016).

L'accumulation des lésions physiques de l'épithélium pulmonaire favorise la BO mais qu'en est-il des IS ? Les IS diminuent l'efficacité du système immunitaire dans le but de tolérer le greffon chez l'hôte. Il existe différentes classes d'IS afin de bloquer les différentes voies activées. Les inhibiteurs de calcineurine bloquent la prolifération des LT en inhibant la production d'IL-12, cytokines autocrines. Les IS antiprolifératifs comme le MMF bloquent la synthèse de purines. Les inhibiteurs de mTOR bloquent le cycle cellulaire. Les corticoïdes diminuent la réponse immunitaire.

Les effets sur les cellules immunes de ces IS son très documentés, leurs effets sur les cellules non-immunes est peu étudié, d'où l'intérêt pour le TAC et l'EVE, IS les plus utilisés en transplantation.

Le TAC et l'EVE sont des macrolides se liant à FKBP12. Lorsque TAC se lie à FKBP12, le complexe bloque l'activation de la calcineurine en fermant les canaux calciques du réticulum endoplasmique lisse. L'EVE bloque mTOR en bloquant le site de phosphorylation P70S6K. EVE est un inhibiteur allostérique de mTOR (Kurdi, 2016).

Ainsi, que se passe-t-il dans les cellules non-immunes ? FKBP12 est également impliqué dans l'inhibition de l'activation constitutive du récepteur TGF- β 1.

Ainsi, nous nous sommes demandé quels sont les effets du TAC et de l'EVE sur les cellules épithéliales bronchiques en culture.

Le TAC à 10 μ M et EVE à 0,1nM induisent une modification cellulaire où les cellules épithéliales se transforment en cellules fibroblastiques. De même, les cellules expriment des marqueurs mésenchymateux spécifiques des fibroblastes. Elles acquièrent une capacité migratoire. En présence de 250ng/mL de BMP7, inhibiteur naturel de la voie TGF- β , BMP7 maintient les caractères épithéliaux des cellules épithéliales bronchiques humaines en présence de TAC.

En conclusion, le TAC et EVE favorisent la TEM des cellules épithéliales bronchiques où le TAC utilise la voie canonique du TGF- β .

Notre étude sur les IS a été menée sur un modèle cellulaire 2D, avec ainsi une modulation pharmacologique apicale. Or le TAC et l'EVE, en clinique humaine, diffusent par la voie basale des cellules d'où l'intérêt de développer un modèle 3D. Le modèle 3D qui est le plus intéressant pour notre étude est l'utilisation d'aimants. Les cellules sont liées à des microbilles magnétiques par la force électrostatique. Ces cellules liées à ces microbilles seront soumises à un puissant aimant permettant de regrouper les cellules pour initier la formation de sphéroïdes. Les BEAS-2B forment des sphéroïdes. Les sphéroïdes à 100 000 cellules ont les mêmes caractéristiques phénotypiques que les cellules en 2D. Pour avoir une bonne survie cellulaire, les cellules doivent être en nombre suffisant.

Pour conclure, le modèle 3D est pertinent pour l'étude des modulations pharmacologiques. Ce modèle apportera une forte valeur ajoutée aux études fondamentales *in vitro*, car le 3D mime

davantage l'organisation fonctionnelle de l'organe cible. Ce modèle pourra ensuite être transposé pour d'autres organes solides.

Discussion / Perspective

Dans la BO, l'environnement est intensément inflammatoire où il est préférable de bloquer toutes les voies impliquées dans la fibrose et pas seulement la voie canonique du TGF- β . Ainsi l'utilisation d'antifibrosants pour la fibrose idiopathique pulmonaire pourrait être intéressante dans le cas de la BO : le Nintédanib.

Nintédanib (NTD) inhibe les protéines tyrosine kinases. NTD bloque le site qui se lie à l'ATP dans le domaine kinase du récepteur de VEGF, FGF, PDGF (dissolution des jonctions adhérentes, localisation nucléaire de la β -caténine et CSF) (Bellamri, 2019). NTD inhibe l'activation des cascades de signalisation induite par le récepteur de FGF et le récepteur de PDGF jouant un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation des fibroblastes (Benden, 2017). Le NTD prévient le développement du processus inflammatoire dans la fibrose. Il prévient l'expression de cytokines pro-inflammatoires tel que TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Bellamri, 2019).

CFS1 se lie au récepteur CFS1 et active différentes voies intracellulaires comme PI3K, induisant la différenciation des monocytes en macrophages et favorise leur adhésion, leur expansion et leur mobilité. CFS1 stimule la production de molécules pro-inflammatoires contribuant à la fibrose pulmonaire. Il s'est avéré que le tissu murin CFS^{-/-} présente moins d'infiltrat macrophagique et moins de dépôt de collagène : donc moins de fibrose (Baran, 2007). NTD altère le phénomène des macrophages principalement par inhibition de l'activation du récepteur 1 de CFS, inhibant ainsi les voies intercellulaires PI3K/AkT et MAPK/ERK. NTD exerce des effets anti-inflammatoires bloquant l'expression de l'IL-1 β , IL8, IL10, contribuant à la fibrose (Bellamri, 2019).

D'autres antifibrosants peuvent être utilisés dans la BO telle que la Pirféridone. La Pirféridone a des propriétés anti-fibrotiques et anti-inflammatoires, inhibant la synthèse de TGF- β et la synthèse de TNF- α : anti-fibrosant et anti-inflammatoire (Benden, 2017).

Pirféridone est un agent antibiotique utilisé dans la fibrose pulmonaire idiopathique. Pirféridone inhibe la prolifération des fibroblastes dépendant des facteurs de croissance, inhibe l'activation et la prolifération des LT (Margolin, 2002) et inhibe la fonction et l'activation des CD (Zhou, 2005).

D'après Clinical trial.gov, un essai clinique sur la Pirféridone est en cours afin d'analyser l'antifibrosants dans la BO : clinical trial III, Pirféridone de la BOS (NCT 02262299).

Pour bloquer TGF- β , plusieurs stratégies sont possibles : anticorps neutralisant (Soleimani, 2020), siRNA, récepteur de TGF- β -II soluble et inhibiteur du récepteur. Cibler directement TGF- β n'est pas satisfaisant car il est impliqué dans de multiples fonctions comme dans la régulation du système immunitaire (Mao 2019). L'utilisation d'un agoniste d'un inhibiteur endogène de TGF- β , le NR4A1, inhibant la fibrose pulmonaire peut être un outil intéressant (Nieto, 2016). La stratégie thérapeutique basée sur l'analyse des miRNA pourrait être utile dans la prévention et le traitement des complications après LTx et pourrait améliorer à long terme le taux de survie post-transplantation. TGF- β est d'abord produit par les cellules inflammatoires tel que les macrophages.

L'équipe de Dong s'est intéressée au miRNA et leur impact dans la BO. Pour se faire, ils ont pratiqué des greffes trachéales orthotopiques de souris. Il s'avère que le miR-27a-3p est très régulé à la hausse après transplantation trachéale. Ce miRNA se lie au SMAD 3, ainsi SMAD

3 n'est plus disponible pour se lier à SMAD 2, donc ce complexe ne pénètre pas dans le noyau. Ce miRNA inhibe la TEM des cellules épithéliales pulmonaires de la souris. La BO peut se transformer en fibrose pulmonaire ou en cancer médié par miR27. Le phénomène inflammatoire de la BO régule à la baisse le miR-27a-3p, augmentant la disponibilité de SMAD 3, permettant ainsi l'activation des gènes impliqués dans la TEM maintenant une inflammation conduisant à la fibrose pulmonaire. (Dong, 2019). TGF- β induit la transcription de miRNA, comme miR21, ayant un effet pro-fibrotique. C'est SMAD 3 qui active la transcription des miRNA (Mao, 2019).

Il s'avère que les patients développant une BO ont une surexpression de KL-6 : mucine, biomarqueur sensible aux maladies interstitielles, faiblement exprimé par les cellules bronchiques saines. KL-6 n'est pas augmenté lors d'infections ni de rejet aigu. Ainsi KL-6 pourrait être un marqueur prédictif pour le diagnostic de la BO (Bessa, 2018).

L'amygadine inhibe la fibrose tissulaire. L'amygadine a une activité immunosuppressive, anti-inflammatoire et immunomodulatrice.

Le traitement à l'amygadine atténue la fibrose hépatique en inhibant la voie canonique du TGF- β . Cette molécule diminue le niveau des ARNm de TGF- β diminue ainsi la phosphorylation de SMAD2/3, ainsi la molécule peut inhiber la TEM en inhibant l'expression de TGF- β et inhibe la phosphorylation SMAD2/3 (Wang, 2018).

Le TAC affecte également les miRNA impliqués dans le processus de fibrose et inflammation (Naesens, 2009) tel que miRNA-21-5p, miR-199a-5p et miR-214-3p. Un miRNA est un ARN non codant, qui s'hybride en 3'UTR de l'ARNm cible induisant son inhibition et sa dégradation (Friedman, 2009). Dans le rein, le TAC induit l'augmentation des miRNA pro-inflammatoires via la voie du TGF- β (Vandenbusshe, 2018).

La TEM peut être contrôlé par les miRNA. miR29b et miR30a réversent la TEM et répriment Snail (Ru, 2012) (Zhang, 2012). Mir1 et miR200b répriment l'expression de Snail et Slug (Liu, 2012). miR34 réprime Snail (Siemens, 2011) et miR200 et miR205 répriment ZEB1 et 2 (Gregory, 2008). Le TGF active miR491-5p qui réprime l'expression de PAR3 engendrant une

déstabilisation des jonctions. TGF- β active également miR200, miR205 qui réprime nectine 1, miR 155 qui réprime RHO et miR24 qui réprime NET1- δ .

Sirtuin 6 est une déacétylase dépendant de la nicotinamide adénine dinucléotide prévient la fibrose dans le foie, rein et cœur. SIRT6 est localisé dans le nucléus, joue un rôle dans la stabilité génomique et le métabolisme cellulaire. SIRT6 régule le processus de TEM de MWCNT des cellules BEAS-2B en inhibant SMAD 2. Ainsi SIRT6 prévient la TEM des BEAS-2B par TGF- β (Chen, 2019).

Dans la greffe de trachée murin, la protéine HMGB1 (high-mobility group box-1), protéine nucléaire est surexprimée chez les souris ayant subi une transplantation de trachée avant même l'obstruction luminal fibreuse. Cette protéine est impliquée dans différentes pathologies inflammatoires. Il s'avère que l'anticorps neutralisant HMGB-1 diminue le rapport IFN γ /IL-10, ainsi le blocage de la protéine inhibe la production pro-inflammatoire (Takamori, 2019)

Les MPs ont un effet protecteur des MPs : les neutrophiles seraient capables de libérer des puissant effecteur anti-inflammatoires, diminuant la réponse inflammatoire des macrophages au LPS (Morell, 2011)

Il existe également la transition endothélio-mésenchymateux (EndMT) provoquant des maladies cardiovasculaires aigu et chronique. EndMT régule la transformation des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses, pouvant engendrer de l'athérosclérose.

L'EndMT contribue à la formation de myofibroblastes. L'EndMT est également impliqué dans l'hypertension pulmonaire, causant ainsi une prolifération anormale des cellules musculaires lisses, avec expression de protéines de la matrice extracellulaire. Dans ce contexte-là, TGF- β promeut le remodelage vasculaire par SMAD dépendant mais également indépendant.

Le modèle 3D ouvre la perspective à de nouvelles études : la coculture. Il est possible de mettre en présence plusieurs types cellules afin que les cellules se réarrangent dans leur environnement spatial où les cellules forment une structure 3D mimant l'architecture du tissu d'origine. De plus, il est possible de déposer un sphéroïde sur un tapis cellulaire, sur des cellules endothéliales afin d'analyser l'angiogenèse. C'est une technique très utilisée dans l'explication de la revascularisation de l'îlot après greffe d'îlots pancréatique. Dans le poumon, un modèle 3D a été créé pour analyser l'effet du TGF- β sur des cellules pulmonaires. Dans ce modèle 3D, TGF-beta active les fibroblastes pour une réponse de réparation normal. Cependant si le TGF-

β augmente, cela peut induire une maladie inflammatoire chronique conduisant à la persistance des myofibroblastes. Pour tester cet effet, une coculture de 20 000 cellules de EpCAM avec 20 000 fibroblastes a été réalisé. Il s'avère que le TGF-beta altère l'expression de facteurs sécrétés dans le microenvironnement de la sphéroïdes qui contribue à la fonctionnalité de la croissance de l'organoïde (Ng-Blichfeld, 2019).

Communications

Impact of Tacrolimus in epithelial-mesenchymal transition in chronic graft dysfunction after lung transplantation – Toulouse



Impact du Tacrolimus dans la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la dysfonction chronique du greffon après transplantation pulmonaire



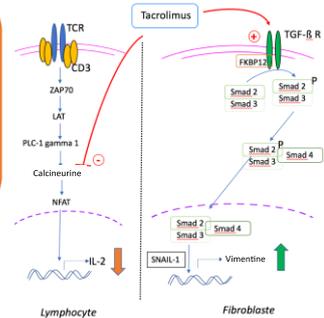
M. Gracysz¹, F. Toti¹, L. Kessler^{1,2}, R. Kessler^{1,2}, B. Renaud Picard^{1,2}.
¹INSERM 1260 Nanomédecine Régénérative, Strasbourg ²Fédération de Médecine Translationnelles de Strasbourg, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Introduction

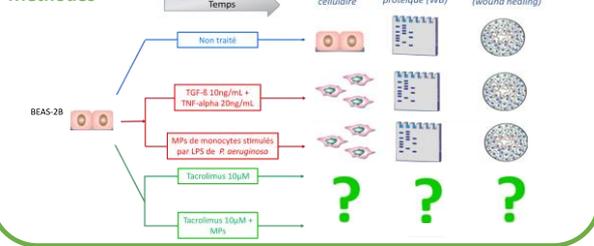
Au cours de la transplantation pulmonaire, l'épithélium bronchique est soumis à des agressions pouvant induire une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) aboutissant à la bronchiolite oblitérante. Les microparticules (MPs) sont des fragments de membranes émises par les cellules en réponse à un stress. Nous faisons l'hypothèse que les traitements immunosuppresseurs connus pour leur toxicité générale peuvent induire une TEM en association avec les MPs.

Objetif

Etudier l'effet du Tacrolimus (TC) seul et/ou combiné à des MPs monocytaires sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B).



Méthodes



Résultats

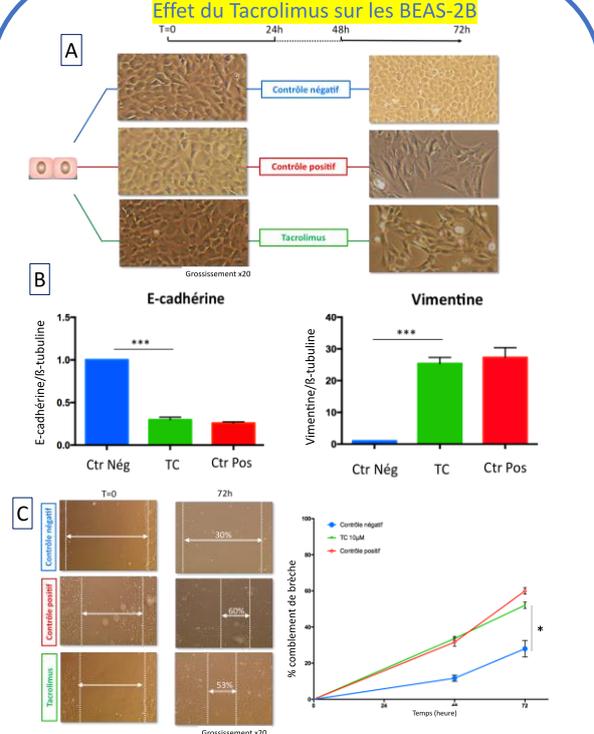


Figure 1: (A) Morphologie cellulaire des BEAS-2B en présence de TC à 10µM. (B) Courbe concentration-réponse du changement de l'expression de la E-cadherine et Vimentine en réponse au TC. (C) Cinétique de comblement de brèche en présence de TC.

Effet du Tacrolimus en présence de MPs sur les BEAS-2B

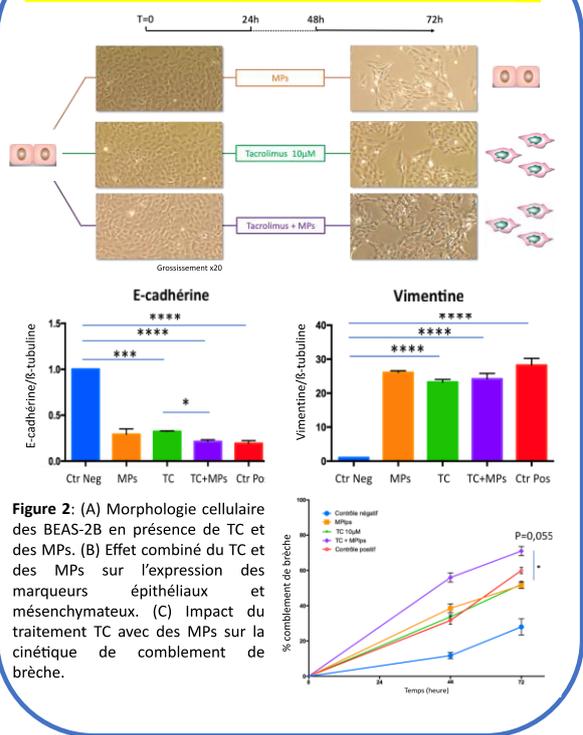


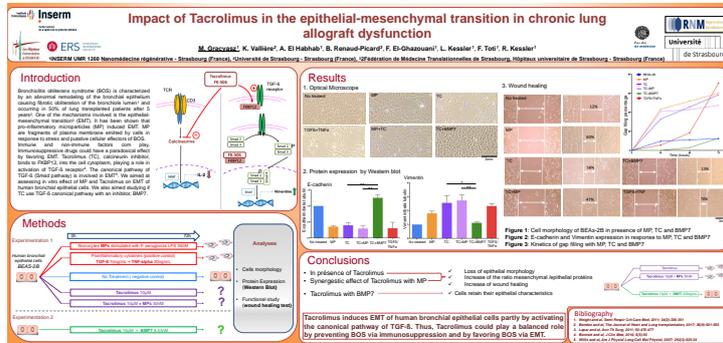
Figure 2: (A) Morphologie cellulaire des BEAS-2B en présence de TC et des MPs. (B) Effet combiné du TC et des MPs sur l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. (C) Impact du traitement TC avec des MPs sur la cinétique de comblement de brèche.

Conclusion

- Le Tacrolimus induit:
- Des modifications morphologiques
 - Un changement phénotypique
 - L'acquisition d'une propriété migratoire

Le Tacrolimus et les MPs de monocytes stimulés par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* pourraient jouer un rôle potentialisateur dans la TEM, elle-même impliquée dans la bronchiolite oblitérante après transplantation pulmonaire

Impact of Tacrolimus in the epithelial-mesenchymal transition in chronic lung allograft dysfunction – Madrid



Introduction

Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is characterized by an abnormal remodeling of the bronchial epithelium causing fibrotic obliteration of the bronchiole lumen¹ and occurring in 50% of lung transplanted patients after 5 years². One of the mechanisms involved is the epithelial-mesenchymal transition³ (EMT). It has been shown that pro-inflammatory microparticles (MP) induced EMT. MP are fragments of plasma membrane emitted by cells in response to stress and putative cellular effectors of BOS. Immune and non-immune factors com play. Immunosuppressive drugs could have a paradoxical effect by favoring EMT. Tacrolimus (TC), calcineurin inhibitor, binds to FKBP12, into the cell cytoplasm, playing a role in activation of TGF-β receptor⁴. The canonical pathway of TGF-β (Smad pathway) is involved in EMT⁵. We aimed at assessing in vitro effect of MP and Tacrolimus on EMT of human bronchial epithelial cells. We also aimed studying if TC use TGF-β canonical pathway with an inhibitor, BMP7.

Methods

Experimentation 1

Human bronchial epithelial cells BEAS-2B

0h → 72h

- Monocytes MPs stimulated with P. aeruginosa LPS 30nM
- Proinflammatory cytokines (positive control) TGF-β 10ng/mL + TNF-alpha 20ng/mL
- No Treatment (negative control)
- Tacrolimus 10μM
- Tacrolimus 10μM + MPs 30nM

Experimentation 2

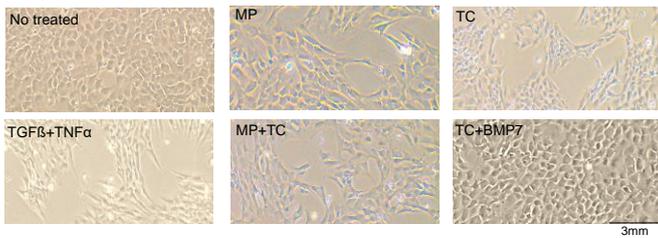
- Tacrolimus 10μM + BMP7 8,33nM

Analyses

- Cells morphology
- Protein Expression (Western Blot)
- Functional study (wound healing test)

Results

1. Optical Microscope



3. Wound healing

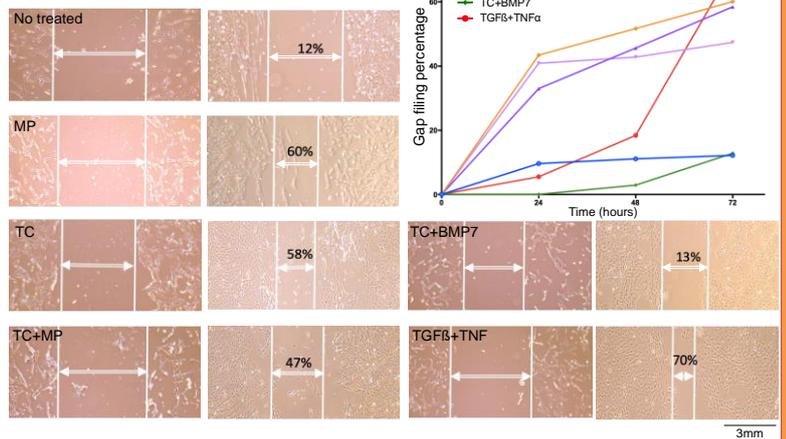
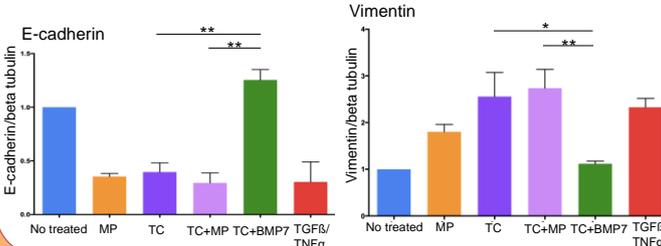


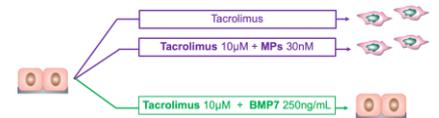
Figure 1: Cell morphology of BEAs-2B in presence of MP, TC and BMP7
Figure 2: E-cadherin and Vimentin expression in response to MP, TC and BMP7
Figure 3: Kinetics of gap filling with MP, TC and BMP7

2. Protein expression by Western blot



Conclusions

- In présence of Tacrolimus → ✓ Loss of epithelial morphology
- Synergistic effect of Tacrolimus with MP → ✓ Increase of the ratio mesenchymal /epithelial protéins
- Tacrolimus with BMP7 → ✓ Cells retain their epithelial characteristics



Tacrolimus induces EMT of human bronchial epithelial cells partly by activating the canonical pathway of TGF-β. Thus, Tacrolimus could play a balanced role by preventing BOS via immunosuppression and by favoring BOS via EMT.

Bibliography

- Weight and al, *Semi Respir Crit Care Med*, 2011; 34(3):336-351
- Benden and al, *The Journal of Heart and Lung transplantation*, 2017; 36(9):921-933
- Lapar and al, *Ann Th Surg*, 2011; 92:470-477
- Bennett and al, *J Clin Med*, 2016; 5(5):50
- Willis and al, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007; 293(3):525-34

Bibliographie

1. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p99
2. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p100
3. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p101
4. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p179
5. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p180
6. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p181
7. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p183
8. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier, 2013, p185
9. Agence de biomédecine (27/10/2021) <https://www.dondorganes.fr>
10. Agence de biomédecine (27/10/2021) <https://www.agence-biomedecine.fr/Protocole-des-conditions-a-respecter-pour-realiser-des-prelevements-d-organes>
11. Agence de biomédecine. (1/11/2021). <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-cardio-pulmonaire-et-pulmonaire-0>
12. Agence de biomédecine (1/11/2021). <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-cardio-pulmonaire-et-pulmonaire-0>
13. Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, Dawson TM, Dawson VL and Snyder Sh. FKBP12, the 12kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 98(5):2425-2430
14. Ahmadi A, Najafi M, Farhood B and Mortezaee K. Transforming growth factor- β signaling tumorigenesis and targeting for cancer therapy, *J Cell Physiol*, 2018, 234(8): 12173-12187
15. Akhtar MZ, Sutherland AI, Huang H, Ploeg RJ and Pugh CW. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities, *Am J Transplant*, 2014;14(7):1481-7
16. Al rabia MW. Complement and hyper rejection, *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2009, 20(3):362-369

17. An D, Kim K, Kim J. Microfluidic system based high throughput drug screening system for curcumin/TRAIL combinational chemotherapy in human prostate cancer PC3 cells, *Biomol Ther*, 2014, 22(4): 355–362
18. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a break-through in vivo, *Int. J. Mol. Sci*, 2015, 16(3):5517–5527
19. Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W, Hathwar V and Neuringer IP. Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model, *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(3):417-422
20. Augustine JJ, Knauss TC, Schulak JA, Bodziak KA, Siegel C, Hricik DE. Comparative effects of sirolimus and mycophenolate mofetil on erythropoiesis in kidney transplant patients, *Am J Transplant*, 2004, 4(12):2001–6
21. Bakouboula B, Morel O, Faller AL, Freyssinet M and Toti F. Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation, *Front Biosci*, 2011, 16:2499-514
22. Baran CP, Opalek JM, McMaken S, Newland CA, O'Brien JM, Hunter MG, Bringardner BD, Monick MM, Brigstock DR, Stromberg PC, Hunninghake GW and Marsh CB. Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2007, 176:78–89
23. Basic-Jukic N, Kes P, Bubic-Filipi L, Vranjican Z. Rhabdomyolysis, and acute kidney injury secondary to concomitant use of fluvastatin and rapamycin in a renal transplant recipient, *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(6):2036
24. Beaumont KA, Anfosso A, Ahmed F, Weninger W, Haass NK. Imaging and flow cytometry-based analysis of cell position and the cell cycle in 3D melanoma spheroids, *J Vis Exp*, 2015, 10(6):e53486
25. Bellamri N, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Wollin L, Jouneau S and Vernhet L. Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib, *Int Immunopharmacol*, 2019, 72:112-123
26. Berglund F, Pina P and Herrera CJ. Right ventricle in heart failure with preserved ejection fraction, *Heart*, 2020, 106(23):1798-1804
27. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips, *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8) :760–772
28. Bizargity P, Liu K, Wang L, et al. Inhibitory effects of pirfenidone on dendritic cells and lung allograft rejection, *Transplantation*, 2012, 94:114-22
29. Bos S, Vos R, Van Raemdonck DE and Verleden GM. Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020?, *Curr Opin Organ Transplant*, 2020, 25(3):268-273
30. Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC and Lynch JP. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy, *Proc Am Thorac Soc*, 2009, 6(1):108-121
31. Benden C, Haughton M, Leonard S and Huber LC. Therapy options for chronic lung allograft dysfunction-bronchiolitis obliterans syndrome following first-line immunosuppressive strategies: a systematic review, *J Heart Lung transplant*, 2017, 36(9):921-933
32. Bennett J, Cassidy H, slattery C, Ryann MP and McMorrow T. Tacrolimus modulates TGF- β signaling to induce epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells, *J Clin Med*, 2016, 5(5): 50

33. Bessa V, Bonella F, Ohshimo S, Weinreich G, Kleibrink B, Costadel U, Aigner C, Kamler M, Taube C and Sommerwerck U. Changes in serum KL-6 levels are associated with the development of chronic lung allograft dysfunction in lung transplant recipients, *Transpl Immunol*, 2019, 52:49-44
34. Boots JMM. Is Tacrolimus superior to ciclosporin microemulsion in preventing long-term acute renal transplant rejection?, *Nat Clin Pract Nephrol*, 2005, 1(1):16-17
35. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, Johnson GE, Gorowiec MR, Ward C, JL Lordan, Corris PA, Kirby JA and Fisher AJ. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation, *Thorax*, 2009; 64(9):770-777
36. Borthwick LA, Sunny SS, Oliphant V, Perry J, Brodlie M, Johnson GE, Ward C, Gould K, Corris PA, De Soyza and Fisher AJ. Pseudomonas aeruginosa accentuates epithelial-to-mesenchymal transition in the airway, *Eur Respir J*, 2011, 37(5):1237-1247
37. Bos S, De Sadeleer LJ, Vanstapel A, Beckmans H, Sacreas A, Yserbyt J, Wuyts WA and Vos R. Antifibrotic drugs in lung transplantation and chronic lung allograft dysfunction: a review, *Europeann Respiratory Review*, 2021, 30 (160):210050
38. Bozzini S, Pandolfi L, Vertui V, Frangipane V, Violatto M, De Luigi A, D'Amato M, Morosini M, Bigini P, Salmona M and Meloni F. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by neutrophil extracellular traps (NETs) as possible molecular mechanism in CLAD, *J Heart Lung Transplant*, 2021,40(4):S151
39. Bridle KR, Popa C, Morgan ML et al. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways, *Liver Transpl*, 2009, 15:1315–1324
40. Bregenzer ME, Davis C, Horst E, Mehta P, Novak CM, Raghavan S, Snyder CS and Mehta G. Physiologic patient derived 3D spheroids for anti-neoplastic drug screening to target cancer stem cells, *J Vis Exp*, 2019, 149
41. Calvert BA and Firth ALR. Application of iPSC to modelling of respiratory diseases, *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1237:1-16
42. Cameron AM, Steiner JP, Roskams Aj, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. Calcineurin Associated with the Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺, *Cell*, 1995, 83:463-472
43. Carillo S. *Histologie de l'appareil respiratoire : voies aériennes profondes de l'appareil broncho-pulmonaire*, Montpellier, 2004
44. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P and Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticules up-regulates inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells, *J of Immun*, 2006, 177:1975-1980
45. Chambers DC, Kush KK, Cherikh WS, Goldfarb S, Hayer D, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, Meiser B, Rossano JW and Stehlik J. The international thoracic organ transplant registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-fifth adult heart transplantation report-2018; focus theme: multiorgan transplantation, *J Heart Lung Transplant*, 2018, 37(10):1155-1168
46. Chambers DC, Zuckermann A, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D, Hsich E, Khush KK, Potena L, Sadavarte A, Singh TP and Stehlik J. The international Thoracic Organ transplant registry of the international society for heart and lung transplantation: 37th adult lung transplantation report – 2020; focus on deceased donor characteristics, *The journal of Heart and Lung Transplantation*, 2021, 39(10):1003-1015
47. Chapman JR, Valentine H, Albanell J, Arns WA, Campistol JM, Eisen H, et al. Proliferation signal inhibitors in transplantation: questions at the cutting edge of everolimus therapy, *Transplant Proc*, 2007, 39:2937–50

48. Chen P, Tian K, Tu W, Zhang Q, Han L and Zhou X. Sirtuin 6 inhibits MWCNTs-induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via inactivating TGF- β 1/Smad 2 signaling pathway, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 374:1-10
49. Ciolczyk-Wierzbicka D, Gil D, Zarzycka M and Laidler P. mTOR inhibitor everolimus reduces invasiveness of melanoma cells, *Human Cell*, 2020, 33:88-97
50. Coleman JA, Quazi F, Molday RS. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport, *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(3): p. 555-74
51. Consilio (27/10/2021) <https://www.concilio.com/pneumologie-examens-trouble-ventilatoire-obstructif-restrictif>
52. Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosin M, Yala E, Zobairi F, Leclercq A, Stoian G, Mitrea IL, Prevost G, Toti F, Kessler L. Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis, *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 2014, 13(2):219-226
53. Constantinescu AA, Abbas M, Kassem M, Gleizes C, Kreutter G, Schini-Kerth V, Mitrea IL, Toti F and Kessler L. Differential influence of Tacrolimus and Sirolimus on mitochondrial-dependent signaling for apoptosis in pancreatic cells, *Mol Cell Biochem*, 2016, 418(1-2):91-102
54. Cosner D, Zeng X and Zhang PL. Proximal tubular injury in medullary rays is an early sign of acute tacrolimus nephrotoxicity, *J Transplant*, 2015: 142521
55. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis, *Biotechnol. Adv*, 2016, 34(8): 1427–1441
56. Costa JS, Ferreira E, Leal R, Bota N, Romaozinho C, Sousa V, Marinho C, Santos L, Macario F, Alves R, Pratas J, Campos M and Figueiredo A. Polyomavirus nephropathy: Ten-year experience, *Transplant Proc*, 2017, 49(4):803-808
57. Cottin V, Crestani B, Cadranel J, Cordier JF, Marchand-Adam S, Prévot G, Wallart B, Bergot E, Camus P, Dalphin JC, Dromer C, Gomez E, Israel-Biet D, Jouneau S, Kessler R, Marquette CH, Reynaud-Gaubert M, Aguilaniu B, Bonnet D, Carré P, Danel C, Faivre JB, Ferretti G, Just N, Lebargy F, Philippe B, Terrioux P, Thivolet-Béjui F, Trumbic B and Valeyre D. Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique, *Revue des Maladies Respiratoires*, 2017
58. Crowe A, Lemaire M. In vitro and in situ absorption of SDZ- RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin, *Pharm Res*, 1998, 15: 1666-72
59. Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P and Lemaire M. Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats, *Drug Metab Dispos*, 1999, 27: 627-32
60. Crystal R G, West J B, Barnes P J, Weibel E. The lung: scientific foundations. 2nd ed. New York, NY, USA: Raven Press, 1997: pp 629– 631
61. Cui X, Hartanto Y and Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation, *J R Soc Interface*, 2017, 14 (127)
62. D'Amico R, Fusco R, Cordaro M, Siracusa R, Peritore AF, Gugliandolo E, Crupi R, Scuto M, Cuzzocrea S, Di Paola R, Impellizzeri D. Modulation of NLRP3 inflammasome through Forpyl peptide receptor 1 (Fpr-1) pathway as a new therapeutic target in bronchiolitis obliterans syndrome, *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6):2144

63. Darley DR, Carlos L, Hennig S, Liu Z, Day R and Glanville AR. Tacrolimus exposure early after lung transplantation and exploratory associations with acute cellular rejection, *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 75(7):879-888
64. Dausset J. Problem of autoantibodies, *Rev Fr Etud Clin Biol*, 1958, 3(8):825-828
65. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, Boomersshine CS, Ortiz C, Sherrill TP, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS and Lawson WE. TGF β signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio*, 2011, 300:L887-97
66. Dheer D, Jyoti, Gupta PN and Shankar R. Tacrolimus: Ann update review on delivering strategies for multifarious disease, *Eur J of Pharma, Sciences*, 2018, 114:217-227
67. Dong M, Wang X, L T, Wang J, Yang Y, Liu Y, Jing Y, Zhao H and Chen J. Mir-27a-3 α attenuates bronchiolitis obliterans in vivo via the regulation of dendritic cells' maturation and the suppression of myofibroblasts' differentiation, *Clin Transl Med*, 2019, (4):140
68. Eng CP, Gullo-Brown J, Chang JY and Sehgal SN. Inhibition of skin graft rejection in mice by rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide, *Transplant Proc*, 1991, 23(1 Pt 1):868-869
69. Fang Y and Eglen RM. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development, *SLAS Discov*, 2017, 22(5): 456-472
70. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, Blitterswijk C and Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends Biotechnol*, 2013, 31(2): 108-115
71. Fintha A, Gasparics A, Rosivall L and Sebe A. Therapeutic targeting of fibrotic epithelial-mesenchymal transition-an outstanding challenge, *Front pharmacol*, 2019, 10:388
72. Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity, *Clin Transplant*, 2008, 22:1-15
73. Flint SM, Walker RG, Hogan C, Haeusler MN, Robertson A, Francis DMA, Millar R, Finlay M, Landgren A and Cohney SJ. Successful ABO-incompatible kidney transplantation with antibody removal and standard immunosuppression, *Am J Transplant*, 2011, 11(5):1016-1024
74. Foglietta F, Canaparo R, Muccioli G, Terreno E and Serpe L. Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids, *Life Sci*, 2020, 254:117784
75. Fonseca C, Bicker J, Alves G, Falcao A and Fortuna A. Cystic fibrosis: physiopathology and the latest pharmacological treatments, *Pharmacol Re*, 2020, 162:105267
76. Friedman RC, Farh KK, Bruge Cb and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs, *Genome Res*, 2009, 19(1):92-105
77. Furlong T, Storb R, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Doney K, Martin P, Sullivan K, Witherspoon R and Nash RA. Clinical outcome after conversion to FK-506 (tacrolimus) therapy for acute graft-versus-host-disease resistant to cyclosporine or for cyclosporine-associated toxicities, *Bonne Marrow Transplant*, 2000, 26(9):985-991
78. Geissler EK, Schlitt HJ and Thomas G. mTOR, cancer and transplantation, *Am J Transplant*, 2008, 8(11):2212-2218
79. Gennai S, Pison C and Briot R. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation, *La presse médicale*, 2014, 43(9):921-930
80. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, Langer R, Roth AE, Church GM, Markmann JF, Sachs DH, Chandraker A, Wertheim JA, Rothblatt M, Boyden ES, Eidbo E, Lee WPA, Pomahac B, Brandacher G, Weinstock DM, Elliot G, Nelson D, Acker JP, Uygun K, Schmalz B, Weegman BP, Tocchio A, Fahy GM, Storey KG, Rubinsky B, Bischof J, Elliot JAW,

- Woodruff TK, Morris GJ, Demirci U, Brockbank KGM, Woods EJ, Ben RN, Baust JG, Gao D, Fuller B, Kravitz DC, Taylor MJ and Toner M. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine, *Nnat Biotechnol*, 2017, 35(6):530-542
81. Gomes ME, Rodrigues MT, Domingues RMA, Reis RL. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: New Trends and Directions-A Year in Review, *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 3(3):211-24
 82. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Sci Signal*, 2014, 7(344)
 83. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y and Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1, *Nature Cell Biol*, 2008, 10:593–601
 84. Griese M, Costa S, Linnemann RW, Mali MA, McKone EF, Polineni D, Qun BS, Ringshausen FC, Taylor-Cousar JL, Withers NJ, Moskowitz SM and Daines CL. Safety and Efficacy of Elexacaftor/Tezacaftor/ivacaftor for 24 weeks or longer in people with Cystic Fibrosis and one or more F508del Alleles: Interim results of an Open-Label phase 3 clinical trial, *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(3):381-385
 85. Gulluoglu S, Tuysuz EC, Sahinn M, Yaltirik CK, Kuskucu A, Azkan F, Dalan AB, Sahin F, Ture U and Bayrak O. The role of TNF-alpha in chordoma progression and inflammatory pathways, *Cell Oncol*, 2019, 42(5):663-677
 86. Gullotta F, Izzo D, Scalera F, Palazzo B, Martin I, Sannino A and Gervaso F. Biomechanical evaluation of hMSCs-based engineered cartilage for chondral tissue regeneration, *J Mech Behav Biomed Mater*, 2018, 86:294–304
 87. Guo L, Xu JM, Liu L, Liu SM, Zhu R. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is involved in bleomycin-induced lung fibrosis, *Biomed Res Int*, 2015, 10:23791
 88. Haisler, WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, and Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation, *Nat Protoc*, 2013, 8:1940–9
 89. Halpin D, Criner G, Papi A, Singh D, Anzueto A, Martinez F, Agusti A and Vogelmeier CF. Global initiative for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease, *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(1):24-36
 90. Halloran K, Aversa M, Tinckam K, Martinu T, Binnie M, Chaparro C, Chow CW, Waddell T, McRae K, Pierre A, De Perrot M, Yasufuku K, Cypel M, Keshavjee S and Singer LG. Comprehensive outcomes after lung retransplantation: a single-center review, *Clin Transplant*, 2018, 32:e13281
 91. Hebert MF. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 27(2-3):201-214
 92. Heisel O, Heisel R, Balshaw R, et al. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*, 2004, 4:583-95
 93. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumor suppression, *Nat Rev Cancer*, 2011, 12(9):613-626
 94. Heyer CM, Lemburg SP, Knoop H, Hooland-Letz T, Nicolas V, Roggenland D. Multidetector-CT angiography in pulmonary embolism-can image parameters predict clinical outcome, *Eur Radiol*, 2011, 21(9):1928-1937
 95. Hill C, Jones MG, Davies DE and Wang Y. Epithelial-mesenchymal transition contributes to pulmonary fibrosis via aberrant epithelial/fibroblastic crosstalk, *J Lung Health Dis*, 2019, 3(2):31-35

96. Higgins R, Ramaiyan K, Dasgupta T, Kanji H, Fletcher S, Lam F and Kashi H. Hyponatraemia and hyperkalaemia are more frequent in renal transplant recipients treated with tacrolimus than with cyclosporin. Further evidence for differences between cyclosporin and tacrolimus nephrotoxicities, *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 9(2):444-450
97. Hislop A and Reid L. Normal structure and dimensions of the pulmonary arteries in the rat, *J Anat*, 1978, 175: 71–84
98. Hoarau-Vechot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1)
99. Holt DW. Monitoring mycophenolic acid. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39:173-83
100. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie Aj, Conley J, Bachmann S, Unwinn RJ and Ellison DH. The calcineurin inhibitor Tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension, *Nat Med*, 2011, 17(10):1304-1309
101. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial- mesenchymal transition, *J. Cell Sci*, 2012, 125:4417–4422
102. Ilyas M, Colegio OR, Kaplan B and Sharma A. Cutaneous toxicities from transplantation-related medication, *Am J Transplant*, 2017, 17(11):2782-2789
103. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A and Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive, *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11):1122–1128
104. Jacobs SS, Krishnan JA, Lederer DJ, Ghazipura M, Hossain T, Tan AYM, Carlin B, Drummond MB, Ekstrom M, Garvey C, Granney BA, Jakson B, Kallstrom, Knight LS, Lindell K, Prieto-Centurion V, Renzoni EA, Ryerson CJ, Schneidman A, Swigris J, Upson D and Holland AE. Home oxygen therapy for adults with Chronic lung disease. An official american thoracic society clinical practice guideline, *Am J respir Crit Care Med*, 2020, 202(10):e121-e141
105. Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris RE, Benet LZ and Christians U. Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD, *Transplant Proc*, 2001, 33: 514-5
106. Jaganathan H, Gage J, Leonard F, Srinivasan S, Souza GR, Dave B and Godin B. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation, *Sci Rep*, 2014, 6468
107. Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Fron. Biosci*, 2008, 13: 221-35
108. Jiang X, Zhang Z, Song C, Deng H, Yang R, Zhou L, Sun Y and Zhang Q. Glucocalyxin A reverses EMT and TGF-β1/Smad2-3 signaling pathway in osteosarcoma, *Chem Biol Interact*, 2019, 307;158-166
109. Jolly MK, Ward C, Eapen MS, Myers S, Hallgren O, Levine H, Sohal SS. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: role in lung development, homeostasis, and disease, *Dev Dyn*, 2018, 247(3):346-358
110. Junior EA, De Campos Werebe E, Carraro RM, De Oliveira Braga Teixeira RH, Fernandes LM, Adballa LG, Samano MN, PEgo-Fernandes PM. Lung transplantation, *Einstein*, 2015 13(2):297-304
111. Jurewicz WA. Tacrolimus versus cyclosporin immunosuppression: long-term outcome in renal transplantation, *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18:i7-11

112. Kalluri R and Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *J Clin Invest*, 2003, 112(12):1776-1784
113. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial mesenchymal transition, *J. Clin. Invest*, 2009, 119:1420- 1428
114. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M and Korthuis RJ. Ischemia/reperfusion, *Compr Physiol*, 2017, 7(1):113-170
115. Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T and Kohyama T. Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF-alpha induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells, *Allergy Immunol*, 2011, 115:119-128
116. Katari SR, Magnone M, Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Gritsch A, McCauley J, Starzl T, Demetris AJ and Randhawa PS. Clinical features of acute reversible tacrolimus (FK 506) nephrotoxicity in kidney transplant recipients, *Clin Transplant*, 1997, 11(3):237-242
117. Kawashima M, Sato M, Murakawa T, Anraku M, Koneoda C, Hosoi A, Kakimi K and Nakajima J. Role of Toll-like Receptor 4 expressed by fibroblasts in allograft fibrosis in mouse orthotopic tracheal transplantation, *Transplant Proc*, 2018, 50(10):3863-3872
118. Kawashima M and Juvet SC. The role of innate immunity in the long-term outcome of lung transplantation, *Ann Transl Med*, 2020, 8(6):412
119. Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI, Miyashita M, McMenamin M, Lechner JF, Harris CC. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation, *Differentiation*, 1988, 38:60–66
120. Kim M, Martin ST, Townsend K, Gabardi S. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options, *Pharmacotherapy*, 2014, 34(7):733-744
121. Kimsa M, Strzalka-Mrozek B, Kimsa-Dudek M, Kruszniewska-Rajs, Gola J, Adamska J and Mazurek U. Transforming growth factor- β -related genes in human retinal pigment epithelial cells after tacrolimus treatment, *Pharmacological reports*, 68(5):969-974
122. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I and Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus, *Clin Pharmacokineti*, 2014, 43(2):83-95
123. Kirsanov O, renegar RH, Busada, JT, Serra ND, Harrington EV, Johnson TA and Geyer CB. The rapamycin analog Everolimus reversibly impairs male germ cell differentiation and fertility in the mouse, *Oxford Univeristé Press*, 2020
124. Kolb M and Vasakova M. The natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases, *Respir Res*, 2019, 20(1):57
125. Korfhagen TR, Le Cras TD, Davidson CR, Schmidt SM, Ikegami M, Whitsett JA and Hardie WD. Rapamycin prevents transforming growth factor-alpha-induced pulmonary fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41:562–572
126. Kurdi A, De Doncker M, Leloup A, Neels H, Timmermans JP, Lemmens K, Apers S, De Myers GRY, Martinet. Continuous administration of the mTORC1 inhibitor Everolimus induces tolerance and decreases autophagy in mice, *Br J Pharmacol*, 2016; 173(23):3359-3371
127. Lamas S. Cellular mechanisms of vascular injury mediated by calcineurin inhibitors, *Kidney Int*, 2005, 68(2):898-907
128. Lamouille S, Xu J and Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3):178-196

129. Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, et Benet LZ, Sewing KF and Christians U. Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine, *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 285: 1104-12
130. Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation, *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7):1056-1067
131. Le Pavec J, Dorfmüller P, Perros F, Mercier O and Fadel E. Bronchiolite oblitérante post-transplantation pulmonaire. *La lettre du Pneumologie*, 2013, 16(3) : 86-92
132. Lee BH, Kim MH, Lee JH, Seliktar D, Cho NJ and Tan LP. Modulation of spheroid formation and functionality using modified PEG-based hydrogels of different stiffness, *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118123
133. Lin-Li LV. Role of extracellular vesicles in renal inflammation and fibrosis, *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165:455-466
134. Liu J, Farmer J, Lane WS, Friedman J, Weissman I and Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell*, 1991, 66, 807– 815
135. Liu YN, Yin JJ, Abou-Kheir W, Hynes PG, Casey OM, Fang L, Yi M, Stephens RM, Seng V, Sheppard-Tillman H, Martin P and Kelly K. miR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug- independent mechanisms, *Oncogene*. 2012, 32:296–306
136. MacDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts, *Transplantation*, 2001, 71(2):271–80
137. Mak BC, Yeung RS. The tuberous sclerosis complex genes in tumor development, *Cancer Invest*, 2004, 22(4):588–603
138. Malm SW, Amouzougan EA and Klinecki WT. Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line, *Toxicol In Vitro*, 2018, 50:383-390
139. Mao TT and Meng XM. TGF- β /smad and renal fibrosis, *Advances in experimental medicine and biology*, 2019, 1165:347-364
140. Margolin SB. Investigation of new drug: pirfenidone. Dallas, TX: Marnac, Inc, 2002
141. Masola V, Carraro A, Zaza G, Bellin G, Montin U, Violi P, Lupo A and Tedeschi U. Epithelial to mesenchymal transition in the liver filed: the double face of Everolimus in vitro, *BMC Gastro*, 2015, 15:118-128
142. Masood A, Jacob M, Gu X, Jabar MA, Bennabdelkamel H, Nizami I, Li L, Dasouki M and Rahman AMA. Distinctive metabolic profiles between cystic fibrosis mutational subclasses and lung function, *Metabolimics*, 2021, 17(1):4
143. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharma*, 2000, 47:119-25
144. Matsuno K, Harada N, Harada S, Takeshige T, Ischimori A, Itoigawa Y, Katsura Y, Domama Y, Makino F, Ito J, Atsuta R, Akiba H and Takahashi K. Combination of TWEAK and TGF- β induces the production of TSLP, RANTES and TARC in BEAS-2B human bronchial epithelial cells during epithelial-mesenchymal transition, *Exp Lung Res*, 2019, 44(7):332-343
145. Mc Curry K. Brief overview of Lung, Heart, and Heart-Lung transplantation, *crit Care Clin*, 35(1):1-9

146. Melhem O, Savage E and Lehane E. Symptom burden in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Appl Nurs Res*, 2020, 57:151389
147. Misumi K, Wheeler DS, Aoki Y, Combs MP, Braeuer RR, Higashikubo R, Li W, Kreisel D, Vittal R, Myers J, Lasgtein A, Walker NM, Farver CF and Vibha NL. Humoral immune responses mediate the development of a restrictive phenotype of chronic lung allograft dysfunction, *JCI Insight*, 2020, 5(23)
148. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, Meyer N, Chenard MP, Freyssinet JM, Bareiss P, Mazzucotelli JP and Toti F. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection, *J Heart Lung Transplant*, 2008, 27(1):38-45
149. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM and Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis, *Semin Immunopathol*, 2011, 33:469-486
150. Murray J F. The normal lung: the basis for diagnosis and treatment of pulmonary disease. 2nd ed. Philadelphia, PA, USA: W B Saunders, 1985: pp 1–285
151. Murray J F. Occasional Essay. Bill Dock and the location of pulmonary tuberculosis. How bed rest might have helped consumption, *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168: 1029– 1033
152. Murray JF. The structure and function of the lung, *Int J Tuberc Lung*, 2010, 14(4):391-396
153. Naesens M, Kuypers DRJ and Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity, *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4:481–508
154. Nakajima T, Palchevsky V, Perkins DL, Belperio JA and Finn PW. Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome, *Semin Immunopathol*, 2011, 33(2):135-156
155. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy, *N Engl J Med*, 2003, 349(24):2326-2333
156. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft, *N Engl J Med*, 2010, 363(15):1451-1462
157. Nanmoku K, Shinzato T, Kubo T, Shimizu T and Yagisawa T. Conversion to Everolimus in kidney transplant recipients with calcineurin inhibitor-induced nephropathy: 3 case reports, *Transplant proc*, 2019, 51(5):1424-1427
158. Nasr AB, Ponnala D, Sagurthi SR, Kattamuri RK, Marri VK, Gudala S, Lakkaraju C, Bandaru S and Nayariseri A. Molecular docking studies of FKBP12-mTOR inhibitor using binding predictions, *Bioinformation*, 2000, 11(6):307-315
159. Nawshad A, Lagamba D, Polad A, and Hay ED. Transforming growth factor- β signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis, *Cells Tiss Org*, 2005, 179: 11–23
160. Neri T, Armani C, Pegoli A, Cordazzo C, Carmazzi Y, Brunellschi S, Bardelli C, Breschi MC, Paggiaro P and Celi A. Role of NF κ B and PPAR- γ in lung inflammation induced by monocyte, *Eur Respir J*, 2011, 37:1494-1502
161. Neurohr C, Kneidinger N, Ghiani A, Monforte V, Knoop C, Jaksch P, Parmar J, Ussetti P, Sole A, Müller-Quernheim J, Kessler R, Hubert Wirtz, Gerhar Boerner G, Denk O, Fernandes SP and Behr J. A randomized controlled trial of liposomal cyclosporine A for inhalation in the prevention of bronchiolitis obliterans syndrome following lung transplantation, *Am J Transplant*, 2021
162. Ng-Blichfeld JP, De Jong T, Korekaas RK, Wu X, Lindner M, Guryev V, Hiesmtra PS, Stolk J, Konigshoff M and Gosens R. TGF- β activation impairs fibroblast ability to support

- adult lung epithelial progenitor cell organoid formation, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(1):14-28
163. Nieri D, Neri T, Petrini S, Vagaggini B, Paggiaro P, Celi A. Cell-derived microparticles and the lung, *Eur Respir Rev*, 2016, 25(141) :266-77
 164. Nieto MA, Huang RYJ, Jackson RA and Thiery JP. EMT:2016, *Cell*, 2016, 166(1):21-45
 165. Novelli F, Neri T, Tavanti L, Armani C, Noce C, Falaschi F, Bartoli ML, Martino F, Palla A, Celi A and Paggiaro P. Procoagulant, tissue factor-bearing microparticles bronchoalveolar lavage of interstitial lung disease patients: an observational study, *PLoS One*, 2014, 9(4):e95013
 166. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater*, 2011, 14(3):88–95
 167. Okadome T, Oeda E, Saitoh M, Ichijo H, Moses HL, Miyazono K and Kawabata M. Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor- β type I receptor *in vivo*, *Comm*, 1996, 271(36):21687-21690
 168. Okuhara M and Kino T. Immunomodulator, *Biotechnology*, 1990, 26:321-346
 169. Olland A. La transplantation pulmonaire : indications et résultats. Strasbourg. 2016
 170. Olland A, Reeb J, Leclercq A, Renaud-Picard B, Falcoz PE, Kessler R, Schini-Kerth V, Kessler L, Toti F and Massard G. Microparticles: a new insight into lung primary graft dysfunction?, *H Immunol*, 2016, 10:1101-1107
 171. Olson MT, Elnahas S, Dameworth J, Row D, Gagliano RA, Roy SB, Kang P, Walia R and Bremner RM. Management and outcomes of diverticulitis after lung transplantation, *Prog Transplant*, 2020, 30(3):235-242
 172. Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Toyer PJ, Botturi K, Tissot A, Brouard S, Eickelberg O and Magan A. Tissue remodeling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype, *Eur Respir Rev*, 2014, 23(131):118-130
 173. Pedersen BK and Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic disease, *Scand J Med Sci Sports*, 2015, 25(3):1-72
 174. Petersdorf EW. In celebration of Ruggero Ceppellini: HLA in transplantation, *HLA*, 2017, 89(2):71-76
 175. Piscione TD, Phan T and Rosenblum ND. BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Slad1-dependant and independent pathways, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 280(1):F19-33
 176. Pison C, Maclet E and Veale D. Essoufflement et sexualité, *La lettre du Pneumologue*, 2004, 7(2) : 52-54
 177. Powers MJ, Janigian DM, Wack KE, Baker CS, Beer Stolz D, Griffith LG. Functional behavior of primary rat liver cells in a three-dimensional perfused microarray bioreactor, *Tissue Eng.*, 2002, 8(3):499–513
 178. Reams BD, Musselwhite LW, Zaas DW, Steele MP, Garantziotis S, Eu PC, Snyder LD, Curl J, Lin SS, Davis RD and Palmer SM. Alemtuzumab in the treatment of refractory acute rejection and bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation, *Am J Transplant*, 2007, 7:2802-8
 179. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes, *Cancer Res*, 1988, 48:1904–9

180. Renaud-Picard B, Vallière K, Toussait J, Kreutter G, El-Habhab A, Kassem M, El-Ghazouani F, Olland A, Hirschi S, Porzio M, Chenard MP, Toti F, Kessler L and Kessler R. Epithelial-mesenchymal transition and membrane microparticles: potential implications for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation, *Transpl Immunol*, 2017, 59:101273
181. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-George F, Boilard E, Buzas EI, Caporali A, Dignat-George F, Evans PC, Lacroix R, Lutgens E, Ketelhuth DFJ, Nieuwland R, Toti F, Tunon J, Weber C and Hofer IE. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position paper of the european society of cardiology working group on atherosclerosis and vascular biology, *Thromb Haemost*, 2017, 117(7):1296-1316
182. Ringshausen FC, Hellmuth T and Dittrich AM. Was is gesichert in der Therapie der Mukoviszidose?, *Internist (Berl)*, 2020, 61(12):1212-1229
183. Ritchie AI, Wedzicha JA. Definition, causes, pathogenesis and consequences of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations, *Clin Chest Med*, 2020, 41(2):421-438
184. Roman A, Ussetti P, Zurbano F, Borri JM, Solé A, Carreno MC and Santos F. A retrospective 12-month study of conversion to everolimus, *Transplant Proc*, 2011, 43(7):2693-2698
185. Ru P, Steele R, Newhall P, Phillips NJ, Toth K, Ray RB. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial- mesenchymal transition signaling, *Mol. Cancer Ther*, 2012, 11:1166–1173
186. Sakalem ME, de Sibio MT, da Silva da Costa FE, de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine, *Biotechnol J*, 2021, 16(5):e2000463
187. Sato M, Keshavjee S. Bronchiolitis obliterans syndrome: alloimmune-dependent and -independent injury with aberrant tissue remodeling, *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2008;20:173e82
188. Saxton RA and Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease, *Cell*, 2017, 169: 361e371
189. Scheffert JL and Raza K. Immunosuppression in lung transplantation, *J Thorac Dis*, 2014, 6(8):1039-1053
190. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, Campistol JM, Racusen L, Polinsky MS, Goldberg-Alberts R, Li H, Scarola J, Neylan JF and Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial, *Transplantation*, 2009, 87(2):233–42
191. Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Haberlin B, Schulz, HJ Schuurman, Zenke G, Zerwes HG and Schreier MH. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo, *Transplantation*, 1997, 64(1):36–42
192. Schuurs TA, Morariu AM, Ottens PJ, Hart NAT, Popma Sh, Leuvenink HGD and Ploeg RJ. Time-dependent changes in donor brain death related processes, *Am. J. Transplant*, 2006, 6: 2903-11
193. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ and Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation, *Drugs*, 2003, 63(12): 1247-1297
194. Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action, *Ther Drug Monit*, 1995, 17(6):660–665
195. Semenza GL. Targeting hypoxia-inducible factor 1 to stimulate tissue vascularization, *J Investig Med*, 2016, 64(2):361-363

196. Service Public (27/10/2021) <https://www.service-public.fr/particuliers/vosdroits/F182>
197. Shah RJ and Diamond JM. Primary graft dysfunction (PGD) following lung transplantation, *Semin Respir Crit Care Med*, 2018, 39(2):148-154
198. Shihab FS, Bennett WM, Yi H and Andoh TF. Effect of cyclosporine and sirolimus on the expression of connective tissue growth factor in rat experimental chronic nephrotoxicity, *Am J Nephrol*, 2006, 26:400–407
199. Shiraishi K, Nakajima T, Shichino S, Deshimaru S, Matsushima and Ueha S. In Vitro expansion of endogenous human alveolar epithelial type II cells in fibroblast-free spheroid culture, *Biochemical and Biophysical research communication*, 2019, 515(4): 579-585
200. Shrestha BM. Two Decades of Tacrolimus in Renal Transplant: Basic Science and Clinical Evidences, *Exp Clin Transplant*, 2017, 15(1):1-9
201. Siemens H, Jackstadt R, Hunten S, Kaller M, Menssenn A, Gotz U and Hermeking H. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions, *Cell Cycle*, 2011, 10:4256–4271
202. Silverman E S, Gerritsen M E, Collins T. Metabolic functions of the pulmonary endothelium
203. Sivanantham A, DhamPattarayan D, Rajasekar N, Kannan A, Loganathan L, Bethunaickan R, Mahapatra SK, Palanichamy R, Muthusamy K, Rajasekaran S. Tannic acid prevents macrophage-induced pro-fibrotic response in lung epithelial cells via suppressing TLR4-mediated macrophage polarization, *Inflamm Res*, 2019, 68(12):1011-1024
204. Smyth AR, Smith SJ and Rowbotham NJ. Infection prevention and control in cystic fibrosis: One size fits all the argument against, *Pediatric Respiratory Reviews*, 2019, 36:94-96
205. Snyder SH, Lai MM, Burnett PE. Immunophilins in the nervous system, *Neuron*, 1998, 21:283-294
206. Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, Bronk LF, Ananta JS, Mandelin J, Georgescu MM, Bankson JA, Gelovani JG, Killian TC, Arap W, and Pasqualini R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation, *Nat Nanotechnol*, 2010, 5:291–6
207. Soleimani A, Asgharzadeh F, Rahmani F, Avan A, Mehraban S, Fakhraei M, Arjmand MH, Binabaj MM, Parizadeh PR, Ferns GA, Ryzhikov M, Afshari AR, Naghinezhad J, Sayyed-Hossenian SH, Khazael M and Hassannian SM. Novel oral transforming growth factor- β signaling inhibitor potently inhibits postsurgical adhesion band formation, *J Cell Physiol*, 2020, 235(2):1249-1357
208. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, Glanville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Reinsmoen NL, Scott JP, Studer SM, Tazelaar HD, Wallwork JL, Westall G, Zamora MR, Zeevi A and Yousem SA. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection, *J Heart Lung Transplant*, 2007, 26(12):1229-1242
209. Stewart CE, Torr EE, Mohd Jamili NH, Bosquillon C, Sayers I. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research, *J Allergy*, 2012, 1–11
210. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI and Tomic-Caninc M. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair in fibroblast, *Cell Tissue Res*, 2016, 365(3):495-506

211. Stratta P, Canavese C, Quaglia M, Balzola F, Bobbio M, Busca A, Franchello A, Libertucci D and Mazzucco G. Posttransplantation chronic renal damage in nonrenal transplant recipients, *Kidney Int*, 2005, 68(4):1453-1463
212. Sureshbabu A, Fleming T and Mohanakumar T. Autoantibodies in lung transplantation, *Transpl Int*, 2020, 33(1):41-49
213. Szalontai K, Gemes N, Furak J, Varga T, Neuperger P, Balog JA, Puskas LG and Szebeni GJ. Chronic obstructive pulmonary disease: Epidemiology, biomarkers and paving the way to lung cancer, *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(13):2889
214. Takamori S, Shoji F, Okamoto T, Kozuma Y, Matsubara T, Haratake N, Akamine T, Katsura M, Takada K, Toyokawa G, Tagawa T and Maehara Y. HMGB1 blockade significantly improves luminal fibrous obliteration in a murine model of bronchiolitis obliterans syndrome, *Transpl Immunol*, 2018, 53:13-20
215. Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hashimoto M, Hatanaka H, Kino T, Goto T, Okuhara M. Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*, *Transplant Proc*, 1987, 19(6):11-16
216. Tanjore H, et al. Contribution of Epithelial-derived Fibroblasts to Bleomycin-induced Lung Fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180:657-665
217. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 56:23-46
218. Tejani A, Emmett, L. Acute and chronic rejection. *Semin Nephrol*, 2001, 21(5):498-507
219. Theveneau E, Mayor R. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells, *Curr. Opin Cell Biol.*, 2012, 24:677-684
220. Thuong M, Ruiz A, Evrar P, Kuiper M, Boffa C, Akthar MZ, Neuberger J and Ploeg R. New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology, *Transplant International*, 2016, 29(7):749-759
221. Toledo Perdomo K, Navarro Cabello MD, Perez Saez MJ, Ramos Perez MJ, Aguera Morales ML, Aljama Garcia P. Reversible acute encephalopathy with mutism, induced by calcineurin inhibitors after renal transplantation, *J Nephrol*, 2012, 25(5):839-842
222. Tostivint V, Racaud-Sultan C, Roumigué M, Soulié M, Gamé X and Beauval JB. Progress in prostate cancer study: 3D cell culture enables the ex vivo reproduction of tumor characteristics, *Presse Med*, 2017, 46(10):954-965
223. Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Richard MJ, Greget M, Masson D, Zobairi F, Benhamou PY and Kessler L. Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation, *Transplant Proc*, 2011, 43(9):3241-3245
224. Triñanes J, Rodriguez AE, Brito-Casillas Y, Wagner A, De Vries APJ, Cuesto G, Acebes A, Salido E, Torres A and Porrini E. Deciphering Tacrolimus-induced toxicity in pancreatic beta cells, *Am J Transplant*, 2017, 17(11):2829-2840
225. Trindade AJ, Thaniyavarn T, Townsend K, Klasek R, Tsveybel KP, Kennedy JC, Goldberg HJ and El-Chemaly. Alemtuzumab as a therapy for chronic lung allograft dysfunction in lung transplant recipients with short telomeres, *Front Immunol*, 2020, 11:1063
226. Tseng H, Gage JA, Raphael RM, Moore RH, Killian TC, Grande-Allen KJ, and Souza GR. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation, *Tissue Eng. Part C. Methods*, 2013, 19:665-75
227. Turker E, Arslan-Yildiz A. Recent advances in magnetic levitation: a biological approach from diagnostics to tissue engineering, *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 787-79

228. Van der Mark SC, Hoek RAS and Hellemons ME. Developments in lung transplantation over the past decade, *Eur Respir J*, 2020, 29(157):190132
229. Vandebussche C, Van der Hauwaert C, Dewaeles E, Franczak J, Hennino MF, Gnemmi V, Savary G, Tavernier Q, Nittet N, Paquet A, Perrais M, Blum D, Mari B, Pottier N, Glowacki F and Cauffiez C. Tacrolimus-induced nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation, *Arch Toxicol*, 2018, 92(4):1539-1550
230. Vanhove T, Annaert P and Kuypers DR. Clinical determinants of calcineurin inhibitor disposition: a mechanistic review, *Drug Metab Rev*, 2016, 48(1):88-11
231. Vanhove T, Annaert P and Kuypers DRJ. Bodyweight-adjustments introduce significant correlations between CYP3A metrics and tacrolimus clearance, *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(6):1353-1356
232. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications, *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2003, 28(3): 165–172
233. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudennaerde and Verleden GM. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation, *Chest*, 2016, 150(1):219-225
234. Verma ND, Hall BM, Plain KM, Robinson CM, Boyd R, Tran GT, Wang C, Bishop GA and Hodgkinson SJ. Interleukin-12 (IL-12p70) promotes induction of highly potent TH1-like CD4 CD25 T regulatory cells that inhibit allograft rejection in unmodified recipients, *Front Immunol*, 2014, 5:190
235. Walter Gottlieb Land. *Transplantation surgery: past-present-future*. Strasbourg, 2016
236. Wang C, Cao H, Gu S, Shi C, Chen X and Han X. Expression analysis of microRNAs and mRNAs in myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells, *Differentiation*, 2020, 112:10-16
237. Wang D, Chen X, Fu M, Xu H and Li Z. Tacrolimus increases the expression level of the chemokine receptor CXCR2 to promote renal fibrosis progression, *Int J Mol Med*, 2019, 44(6):2181-2188
238. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The role of Snail in EMT and tumorigenesis, *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9):963-972
239. Wang Z, Fang K, Wang G, Guan X, Pang Z, Guo Y, Yuan Y, Ran N Liu Y and Wang F. Protective effect of amygdalin on epithelial-mesenchymal transition in experimental chronic obstructive pulmonary disease mice, *Phytother Res*, 2018, 33(3):808-817
240. Watkins KD, Boettger RF, Hanger KM, et al. Use of sublingual tacrolimus in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2012, 31:127-32
241. Weibel E R. What makes a good lung? The morphometric basis of lung function, *Swiss Med Wkly*, 2009; 139: 375–386
242. Weigt SS, DerHovanessian A, Wallace WD, Lynch JP and Belperio JA. Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation, *Semin Respir Crit Care Med*, 2013, 34(3):336-351
243. Willis BC and Borok Z. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(3):525-534
244. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court Lomas CW, Mendiola M, Hardisson D and Eccles SA. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation, *BMC Biol*, 2021, 10: 29

245. Wu MH, Huang SB and Lee GB. Microfluidic cell culture systems for drug research, *Lab Chip*, 2010, 10(8): 939–956
246. Wu Q, Marescaux C, Wolff V, Jeung MY, Kessler R, Lauer V and Chen Y. Tacrolimus-associated posterior reversible encephalopathy syndrome after solid organ transplantations, *Eur Neurol*, 2010
247. Wu SY, Chen TW, Feng AC, Fan HL, Hsieh CB and Chung KP. Comprehensive risk assessment for early neurologic complications after liver transplantation, *World J Gastroenterol*, 2016, 22(24):5548-5557
248. Xu H, Abuduwufuer A, Lv W, Zhou Z, Yang Y, Zhang C and Hu J. The role of HIF-1 alpha VEGF pathway in bronchiolitis obliterans after lung transplantation, *Journal of Cardiothoracic surgery*, 2019, 14-27
249. Xu X, Su B, Barndt RJ, Chen H, Xin H, Yan G, Chen L, Cheng D, Heitman J, Zhuang Y, Fleischer S and Shou W. FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506, *Transplantation*, 2002, 73(11):1835-1838
250. Xu X, Dai H, Geng J, Wan X, Huang X, Li F, Jiang D and Wang C. Rapamycin increases CCN2 expression of lung fibroblasts via phosphoinositide 3-kinase, *Lab Invest*, 2015, 95:846-859
251. Yacyshyn BR, Bowen-Yacyshyn MB, Pilarski LM. Inhibition by rapamycin of P-glycoprotein 170-mediated export from normal lymphocytes, *Scand J Immunol*, 1996, 43: 449-55
252. Yanik G, White E, Mineishi S, Levine JE, Braun T, Cooke K. Tumour necrosis factor inhibition for the treatment of sub-acute lung injury following allogeneic stem cell transplantation, *BM Transplant*, 2011, 46:S52
253. Yigitaslan S, Erol K and Cengelli C. The effect of P-glycoprotein inhibition and activation on the absorption and serum levels of cyclosporine and tacrolimus in rats, *Adv Clin Exp Med*, 2016, 25(2):237-242
254. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion, *Can Metas Rev*, 2009, 28:15–33
255. Zeriuoh M, Mohite PN, Sabashnikov A, Zych B, Patil NP, Garcia-Saez D, Koch A, Ghodsizad A, Weymann A, Soresi S, Wittwer T, Chol YH, Wipperman J, Wahlers T, Popov AF and Simon AR. Lung transplantation in chronic obstructive pulmonary disease: long-term survival, freedom from bronchiolitis obliterans syndrome, and factors influencing outcome, *Clin Transplant*, 2015, 29:383-392
256. Zhang C, Niu Y, Yul L, Lv W, Abuduxufuer A, Cao A and Hu J. The role of epithelial-mesenchymal transition in the post-lung transplantation bronchiolitis obliterans, *J Cardiothorac Surg*, 2017, 12(1):119
257. Zhang J, Zhang H, Liu J, Tu X, Zang Y, Zhu J, Chen J, Dong L and Zhang J. miR-30 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2012, 417:1100–1105
258. Zhou H, Latham CW, Zander DS, et al. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant*, 2005, 24:1577-85

Effets des immunosuppresseurs et des microparticules membranaires sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales bronchiques en culture 2D et 3D : intérêt en transplantation pulmonaire

Résumé

Mots clés : Bronchiolite oblitérante, transplantation pulmonaire, traitement Immunosuppresseur, transition épithélio-mésenchymateuse

Introduction. La bronchiolite oblitérante (BO) est caractérisée par un remodelage anormal de l'épithélium bronchique causant une oblitération fibreuse de la bronchiole. Un des mécanismes impliqués est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM pourrait être favorisée par des facteurs allo-immuns (infections) ou non-allo-immuns (Immunosuppresseur (IS)). Cette étude s'intéresse à l'impact d'un facteur non-immuns, les IS et plus particulièrement le Tacrolimus (TAC) et Everolimus (EVE). Le développement d'un modèle 3D est nécessaire pour mieux comprendre les interactions cellulaires et le phénomène de TEM induite par les IS.

Méthodes. BEAS-2B, cellules épithéliales bronchique sont soumis à TAC (1-20 μ M), EVE (0,1nM-1 μ M) et à un stress pro-inflammatoire (microparticules pro-inflammatoires, MPs) (30nM) pendant 72h. Les MPs sont obtenus par la stimulation des monocytes THP-1 par le lipopolysaccharide de *Pseudomonas aeruginosa*. La morphologie cellulaire a été analysé par microscopie optique et confocal, analyses des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux par western blot et de la capacité migratoire par scratch test. Pour la formation de sphéroïdes, 3 concentrations de cellules 10 000, 50 000 et 100 000 cellules ont été utilisées. Les sphéroïdes ont été analysées après 7 jours d'incubation au microscope optique et confocal.

Résultats : Les cellules traitées par TAC and EVE ont modifié leur morphologie cellulaire et ont un profil mésenchymateux avec une baisse significative de la E-cadhérine avec TAC_{10 μ M} and EVE_{0,1nM} comparé au cellules non traitées (p<0,0001) et (p<0,001) respectivement et une augmentation significative de la vimentine avec TAC_{10 μ M} et EVE_{0,1nM} comparé aux cellules non traitées (p=0,0005) et (p<0,05) respectivement. Les sphéroïdes à 10 000, 50 000 et 100 000 cellules ont un diamètre de 250 μ m, 520 μ m et 620 μ m respectivement. A 100 000 cellules, la partie distale es sphéroïdes expriment de la vimentine, alors que le reste expriment la E-cadhérine.

Conclusion : *In vitro*, le TAC et EVE combiné aux MPs pro-inflammatoires conduit en faveur d'une exagération de la TEM. Le prescripteur pourrait considérer la statue inflammatoire du patient transplanté. Le modèle 3D permettra d'avoir une présentation plus fidèle afin d'étudier les effets des IS des médicaments en diffusant par voie basale et non apicale

Résumé en anglais

Keywords : Chronic lung allograft dysfunction, Bronchiolitis obliterans, lung transplantation, immunosuppressive drugs, epithelial-mesenchymal transition

Introduction. Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is characterized by an abnormal remodeling of the bronchial epithelium causing fibrotic obliteration of the bronchiole. One of the mechanisms involved is the epithelial-mesenchymal transition (EMT). This EMT could be favored by allo-immune factors such as infections but also by non-immune factors such as immunosuppressive drugs (IS). This study focuses on the impact of non-immune factors, IS and more especially Tacrolimus (TAC) and Everolimus (EVE). The development of a 3D model is necessary to better understand cellular interactions and the phenomenon of EMT induced by IS.

Methods BEAS-2B, bronchial epithelial cells were submitted to TAC (1-20 μ M), EVE (0,1nM – 1 μ M) and/or proinflammatory stress (microparticles pro-inflammatory) (30nM) for 72h. Pro-inflammatory MPs were harvested from LPS of *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated monocytes THP1, washed and concentrated. Cells were used to test TAC, EVE and MPs. Cellular morphology was analyzed by optical microscopy and confocal, epithelial, and mesenchymal markers by Western blot and migratory cell capacity by scratch-test. For the spheroid's formation, 3 cell concentrations 10 000, 50 000 and 100 000 cells are used. Spheroids are analyzed 7 days after incubation in optical microscopy and confocal.

Results Cells treated by TAC and EVE had modified cellular morphology and a mesenchymal profile with a significant down-regulation in E-cadherin with TAC_{10 μ M} and EVE_{0,1nM} compared to untreated cells ($p < 0.0001$) and ($p < 0.001$) respectively, and a significant up-regulation in vimentin with TAC_{10 μ M} and EVE_{0,1nM} compared to untreated cells ($p = 0.0005$) and ($p < 0.05$) respectively

Spheroids at 10 000, 50 000 and 100 000 cells had a diameter of 250 μ m, 520 μ m and 620 μ m respectively. At 100 000 cells, distal part of spheroids expressed vimentin whereas the rest of spheroid, the center, express E-cadherin.

Conclusion. In vitro, TAC and EVE combined to pro-inflammatory MPs lead to favor exaggerated EMT. Immunosuppression regimens should consider the inflammatory status of lung transplanted patients. 3D model allows to have a better representation to study the effects of IS by basal pathway diffusing.