



HAL
open science

Etude du rôle de la transglutaminase 2 dans la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et de son interaction avec la MMP-9

Adrien Tissot

► **To cite this version:**

Adrien Tissot. Etude du rôle de la transglutaminase 2 dans la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et de son interaction avec la MMP-9. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1028 . tel-04433204

HAL Id: tel-04433204

<https://theses.hal.science/tel-04433204v1>

Submitted on 1 Feb 2024

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.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N°605

Biologie-Santé

Spécialité : « Biologie cellulaire, biologie du développement »

Par

« Adrien TISSOT »

**« Etude du rôle de la transglutaminase 2 dans la dysfonction
chronique du greffon pulmonaire et de son interaction avec la MMP-9 »**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 03 octobre 2023

Unité de recherche : Centre de recherche en transplantation et immunologie translationnelle,

Rapporteurs avant soutenance :

Hélène Salvator PU-PH, Hôpital Foch

Arnaud Mailleux Chargé de recherche, Université Paris Cité, UMR Inserm 1152

Composition du Jury :

Président : Antoine Magnan PU-PH, Université Versailles St Quentin Paris-Saclay, Hôpital Foch

Examineurs :

Martine Raynaud-Gaubert

Hélène Salvator

Arnaud Mailleux

PU-PH, Aix-Marseille Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille

PU-PH, Hôpital Foch

Chargé de recherche, Université Paris Cité, UMR Inserm 1152

Dir. de thèse : Laureline Berthelot

Co-dir. de thèse : Sophie Brouard

Chargée de recherche, Université de Nantes, UMR 1064

Directrice de recherche, Université de Nantes, UMR 1064

Remerciements

Au Docteur Laureline Berthelot, pour avoir accepté la direction de cette thèse. Ce travail n'aurait pas été possible sans ton accompagnement et ton investissement à toutes les étapes. Ton jugement scientifique et tes encouragements ont été des soutiens salvateurs.

Au Docteur Sophie Brouard, pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour tes conseils et tes remarques toujours judicieux. J'ai été honoré et heureux de faire ce travail dans ton équipe. Tu as su créer et faire vivre un groupe d'un très haut niveau scientifique dans une ambiance bienveillante (et ludique).

Au Professeure Hélène Salvator, pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse et d'être rapportrice de ce travail. Ton parcours est un exemple à suivre pour moi.

Au Docteur Arnaud Mailleux, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'être rapporteur de ce travail.

Au Professeure Martine Reynaud-Gaubert, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour toutes ces années de collaboration dans le cadre de COLT.

Au Professeur Antoine Magnan, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour m'avoir accompagné dans ce parcours universitaire, depuis 2010, pour m'avoir proposé de faire une thèse, il y a bien longtemps, pour m'avoir aidé à faire ce pré-doc à Newcastle et pour m'avoir transmis COLT. Je suis particulièrement heureux de partager cet accomplissement avec vous.

Au Professeur François-Xavier Blanc, pour avoir accompagné ce projet pendant ces 4 années (en fait 6). Pour votre soutien intelligent et bienveillant dans mon parcours universitaire. Pour m'avoir soutenu aussi au sein du service de Pneumologie, un service et une équipe dans lesquels je suis toujours heureux de venir travailler, même le lundi matin.

Au Docteur Richard Danger, pour notre collaboration de longue date sur la transcriptomique, sur les biomarqueurs, sur COLT et sur PRELUD et j'espère sur d'autres dans le futur. J'ai beaucoup appris avec toi.

A Eugénie Durand, pour ton travail sur COLT et sur PRELUD, les comités d'adjudications et toutes les expériences réalisées. Rigueur, esprit critique et pugnacité. Et en plus tu es drôle.

A Aurore Foureau ex-cheffe de projet COLT, tu as su maintenir un lien fort entre les participants de ce projet, à Nantes et dans toute la France. Tu étais l'énergie de ce projet !

A David Lair, chef de projet COLT (et coordinateur LungO2), tu as brillamment repris la main sur ce projet, alors que la barre était haute (cf ci-dessus). Nous avons beaucoup, beaucoup de travail en perspective. En route vers l'infini et l'au-delà.

Aux membres du CR2TI et d'ailleurs qui m'ont particulièrement aidé sur ce projet : Alexandra Garcia, Camille Mathé, Nathalie Girard, Hoa, Vanh et Thomas Goronflot.

A Dorian Hassoun, même si tu m'as doublé en route, tu ne m'as pas oublié. Je suis honoré que tu es partagé avec moi ton secret de la potion magique.

A Luc Colas, toi aussi tu m'as doublé... J'espère pouvoir profiter un jour de ton énergie et ton imagination pour de belles collaborations poumons !

A Grégory Bouchaud, pour ce temps passé sur le modèle animal. Je l'aurais, un jour.

A tout mes collègues de pneumologie : Isabelle, Emmanuel, Morgane, Delphine, Charlotte, Charlotte, Sandrine, Jean, Hakim, Cédric, Stéphanie, Antoine, Laurent, Arnaud, Camille, Lise, Marie et Marie. Pour votre compréhension et votre soutien pendant ces années.

Aux étudiants M2 que j'ai eu la chance de superviser : Morgane Penhouet, Naïla Benkalfate, Bérénice Reucherand et Pierre Halitim, par ordre d'apparition. Un vrai bonheur à chaque fois. J'aurais aimé être plus présent, mais bon, on fait ce qu'on peut.

A mes collègues doctorants de l'open space. En plus de conseils bien avisés qui peuvent faire gagner une semaine et d'alliquots de secours, vous m'avez permis de garder contact avec le jeunesse d'aujourd'hui, que je comprends de moins en moins.

A tout ceux que j'ai oublié, votre action et votre présence ont été déterminantes.

A ma mère, même si sur ce truc, tu ne voyais pas trop l'intérêt.

A mes frères, qui ont suivi cela de loin et que j'aime beaucoup.

A Félix, tes encouragements négatifs m'ont beaucoup aidé (et je les avais bien cherché).

A Esther, si tu fais une thèse un jour, j'espère que tu la passeras avant l'âge de 42 ans .

A Hélène, je suis heureux de passer mes journées avec toi et je suis conscient de la chance que j'ai. Et cela m'a beaucoup aidé au cours des 4 dernières années.

Avant Propos

La transplantation pulmonaire représente pour beaucoup de patients atteints d'insuffisance respiratoire chronique terminale la seule option thérapeutique capable d'améliorer significativement leur espérance de vie et leur qualité de vie. Le développement de cette prise en charge a été rendu possible à partir des années 1980 par la maîtrise combinée des techniques chirurgicales, anesthésiques et des traitements anti-rejets. Ainsi, les patients éligibles ont pu alors espérer un bénéfice médical de cette procédure, une amélioration de leur quotidien et une nouvelle perspective de vie. L'évolution a été marquée ensuite par une augmentation continue du nombre de procédures réalisées en lien avec une augmentation du nombre de donneurs proposés mais aussi une organisation progressive des filières, de la transplantation jusqu'au suivi à long terme des receveurs avec un nombre croissant de professionnels formés. La transplantation pulmonaire présente les caractéristiques d'une situation biologique et médicale hautement complexe avec l'organe d'un donneur, l'organisme du receveur, deux systèmes HLA et deux systèmes immunitaires propres, deux histoires médicales séparées et une histoire commune marquée par une immunodéficience induite et les toxicités associées aux immunosuppresseurs. De ces interactions découlent les principales complications de la transplantation pulmonaire, certaines communes à toutes les transplantations d'organe comme le risque infectieux associé à l'immunodépression induite d'autres spécifiques au poumon comme les différents types de rejets pouvant émailler le parcours de ces patients. Les complications spécifiques de la greffe constituent des limites au bénéfice que peuvent attendre les receveurs et les équipes soignantes. La principale limite à long-terme de la transplantation pulmonaire est la dysfonction chronique du greffon pulmonaire, première cause de décès tardif. Ce terme spécifique, plus large dans sa compréhension que celui de « rejet chronique », est préférentiellement utilisé du fait de l'identification de facteurs de risques et de mécanismes non liés au système immunitaire. La compréhension de la physiopathologie, comme nous allons la détailler dans ce travail a beaucoup progressé ces dix dernières années mais de nombreuses zones d'ombres persistent comme le rôle précis et contextuel de certaines populations de lymphocytes T (régulatrices, mémoires), la place des lymphocytes B, largement sous-estimée jusqu'à récemment ou encore sur l'initiation et le développement de la fibrose pulmonaire. C'est d'ailleurs dans ce contexte que je situe le rôle, non étudié jusqu'alors, de la transglutaminase 2. Cette protéine

multifonctionnelle et pléiotropique présente la capacité de réaliser des liaisons croisées covalentes sur des protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, solidifiant son architecture et favorisant son accumulation. Le rôle de la transglutaminase 2 a été démontré dans la fibrose pulmonaire idiopathique ou dans le cancer pulmonaire par le biais de mécanismes que l'on peut retrouver dans la dysfonction chronique du greffon pulmonaire. La transglutaminase 2 pourrait agir à un stade très précoce du développement de cette complication. Par ailleurs, de façon plus générale, la transglutaminase 2 ne semble avoir une activité qu'en condition pathologique, en faisant ainsi une cible thérapeutique de choix, si son importance était confirmée. De nombreux défis en transplantation pulmonaire ont été relevés et résolus depuis ses débuts, celui de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire est probablement l'un des plus importants actuellement, par l'ampleur des zones de connaissances à éclaircir et par l'ampleur du bénéfice qu'il pourrait apporter aux patients en terme thérapeutique. Le travail que je propose ici affronte ce défi par l'angle du rôle de la transglutaminase 2 dans le processus fibrosant associé à la dysfonction chronique du greffon pulmonaire (DCG) et de son action possible sur différentes métalloprotéinases dont MMP-9. Je vais vous présenter également une étude sur le potentiel pronostic de la MMP-9 plasmatique pour la DCG.

Abbréviations

ABM : Agence de la Biomédecine

ASD : anticorps anti-HLA spécifique du donneur

ATP : adénosine triphosphate

BO : bronchiolite oblitérante

BOS : syndrome de bronchiolite oblitérante

BPCO : bronchopneumoathie chronique obstructive

CEC : circulation extracorporelle

CFTR: Régulateur transmembranaire de conductance associé à la mucoviscidose (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

ColV : collagène V

CVF : capacité vitale forcée

DCG : dysfonction chronique du greffon pulmonaire

DPG : dysfonction primaire du griffon

ECMO: membrane d'oxygénation extracorporelle

EGFR : récepteur du facteur de croissance epidermal (epidermal growth factor receptor)

ERK : kinase de regulation des signaux extracellulaire (extracellular signal regulated kinase)

E.U. : Etats-Unis

FEA : fibro-élastose alvéolaire

FAK : kinase d'adhésion focale (focal adhesion kinase)

FPI : fibrose pulmonaire idiopathique

GDP : guanosine diphosphate

GTP : guanosine triphosphate

HIF : facteur inductible par l'hypoxie (hypoxia inducible factor)

HLA: antigène des leucocytes humains (human leucocyte antigen)

HP : hypertension artérielle pulmonaire

HT : hydroxytryptamine (5-)

IL : interleukine

ISHLT : Société internationale de transplantation coeur et poumon (International Society of Heart and Lung Transplantation)

K α 1T : tubuline K-alpha 1

LBA : lavage broncho-alvéolaire

MA : macrophage alvéolaire

MEC : matrice extracellulaire

MMP : métalloprotéase matricielle

NK : cellules tueuses naturelles (Natural Killer cells)

PEC : photophérèse extracorporelle

RAC: rejet aigu cellulaire

RAS : syndrome restrictif d'allogreffe

RGO : reflux gastro-oesophagien

RMA : rejet médié par les anticorps

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TG2 : transglutaminase 2

TP : transplantation pulmonaire

Treg: T régulatrice (cellule)

UNOS : United Network of Organ Sharing

VEMS : volume expiratoire maximal en 1 seconde

Table des matières

I. Transplantation pulmonaire	12
A. Généralités	12
B. Candidats à la greffe et donneurs	13
1. Indications et sélection des candidats	13
2. Allocation des organes, augmentation du pool de greffons	16
C. Survie et complications de la transplantation pulmonaire	18
1. Résultats de la transplantation pulmonaire	18
2. Complications post-opératoire	20
a. Dysfonction primaire du greffon	20
b. Complications des voies aériennes	20
c. Infections.....	21
d. Rejet aigu cellulaire	22
e. Rejet médié par les anticorps.....	23
II. Dysfonction chronique du greffon pulmonaire	25
A. Définition et diagnostic	26
1. Définition	26
2. Diagnostic différentiel	27
3. Phénotypes	27
4. Facteurs de risques cliniques	30
5. Explorations	30
a. Epreuves fonctionnelles respiratoires.....	30
b. Imagerie.....	31
c. Endoscopie bronchique	31
6. Pronostic	31
B. Traitement de la DCG	32
1. Modification du traitement immunosuppresseur	33
2. Azithromycine	33
3. Traitement du reflux gastro-oesophagien	34
4. Photophérèse extra-corporelle (PEC)	35
5. La re-transplantation	35
6. Autres traitements	36
C. Physiopathologie de la DCG	36
1. Histologie de la DCG	37
a. Le syndrome de bronchiolite oblitérante.....	37
b. Le syndrome restrictif d'allogreffe	38

2. Immunologie de la DCG	39
a. Immunité innée	40
b. Immunité adaptative	42
i. <i>Immunité cellulaire</i>	42
ii. <i>Immunité humorale</i>	43
iii. <i>Auto-immunité</i>	44
c. Médiateurs du processus fibrosant.....	45
III. Transglutaminase 2	46
A. La famille des transglutaminases	46
1. Transglutaminase 1	47
2. Transglutaminase 3	48
3. Transglutaminase 4	48
4. Transglutaminase 5	48
5. Transglutaminase 6 et 7	49
6. Facteur XIIIa	49
7. Protéine érythrocytaire de membrane band 4.2	50
B. La transglutaminase 2	50
1. Structure	50
2. Fonctions biochimiques	51
a. Transamidation/déamidation.....	51
b. GTPase/ Protéine G	52
c. Fonction kinase.....	54
d. Fonction isomérase disulphide et régulation mitochondriale	54
e. Régulation de l'expression de la TG2	55
3. Fonction physiologique cellulaire	56
a. Survie/mort cellulaire.....	56
b. Interaction avec la surface cellulaire et la MEC	56
c. Régulation transcriptionnelle	57
C. La TG2 dans le poumon	59
1. Cancer pulmonaire	59
2. La fibrose pulmonaire idiopathique	60
3. Mucoviscidose	61
4. BPCO	62
5. Asthme	62
IV. MMP-9	65
A. Structure et mécanismes d'actions des MMPs	65

1. Structure	65
2. Substrats	69
3. Rôle cellulaire	70
B. Les gélatinases dans les pathologies pulmonaires	71
V. Objectifs de la thèse	73
VI. Résultats	74
A. Surexpression de la TG2 dans la DCG et interaction avec MMP-9.....	74
1. Résumé en français	74
a. Contexte	74
b. Méthodologie.....	74
c. Résultats	75
d. Conclusion	75
2. Article en anglais	75
B. Le taux de MMP-9 plasmatique mesuré à 2 ans post Tx est un marqueur pronostique de la survenue d'une DCG.....	111
1. Résumé en français	111
a. Contexte	111
b. Méthodologie.....	111
c. Résultats	111
d. Conclusions.....	112
1. Article en anglais	112
VII. Discussion et perspectives	154
VIII. Conclusions	162
IX. Références bibliographiques	163

I. Transplantation pulmonaire

A. Généralités

En 1963, une première équipe fait la preuve de la faisabilité technique de la transplantation pulmonaire (TP) chez l'homme¹. Ce n'est cependant qu'à partir des années 1980 que la TP devient une réalité clinique après une série d'innovations chirurgicales et surtout pharmacologiques. L'utilisation des inhibiteurs de calcineurine, en premier lieu la ciclosporine, va effectivement permettre d'atteindre des durées de survie significatives. Le nombre de procédures réalisées chaque année a augmenté ensuite de façon presque continue, atteignant selon le registre de l'International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) en 2017, plus de 4500 procédures dans le monde et près de 70 000 sur l'ensemble de la période². Cette thérapeutique a progressivement évolué au fil des années pour devenir la norme de la prise en charge de patients sélectionnés avec insuffisance respiratoire chronique terminale. L'augmentation de l'activité de transplantation est probablement liée à deux facteurs, d'une part l'amélioration progressive significative de la survie des patients post-transplantation et d'autre part, l'augmentation du nombre de greffons disponibles par le travail des centres de transplantations et la mise en œuvre de politiques publiques volontaires du don et du prélèvement d'organe. La survie à long terme des patients bénéficiant d'une transplantation pulmonaire reste cependant en-deçà des autres transplantations d'organes solides³. Cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs spécifiques à la transplantation pulmonaire que sont l'exposition constante de l'organe avec l'environnement extérieur et donc avec d'éventuels agents infectieux ou polluants ainsi que la présence d'un tissu lymphoïde abondant, soumettant ainsi le poumon à des agressions répétées et stimulant le système immunitaire⁴. Le risque lésionnel et plus spécifiquement de rejet en transplantation pulmonaire est ainsi plus élevé que dans d'autres types de transplantations. De fait, les principales causes de décès à court terme, dans la première année sont les dysfonctions aiguës du greffon (dont la dysfonction primaire du greffon, DPG) et les infections. Après la première année, la première cause de décès est la dysfonction chronique du greffon pulmonaire (DCG) et il n'existe à ce jour pas de traitement ayant fait la preuve son efficacité². Je vais traiter dans un premier temps et de façon générale des enjeux concernant la sélection des receveurs, l'utilisation et le choix des greffons de donneurs, les complications post-opératoires précoces et tardives pour ensuite aborder plus en détail, dans un chapitre dédié la DCG.

B. Candidats à la greffe et donneurs

1. Indications et sélection des candidats

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) associée au trouble respiratoire lié au déficit en alpha-1-antitrypsine est depuis les débuts de la TP, la première indication rassemblant plus d'un tiers de toutes les procédures réalisées. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) connaît depuis 20 ans une forte progression à la fois en nombre de procédures réalisées mais aussi en proportion par rapport aux autres indications. Elle est probablement aujourd'hui la première indication mondiale. Le registre de l'ISHLT n'a pas encore été interrogé sur la période après 2018² mais sur les données du registre français de l'Agence de Biomédecine (ABM), la FPI est en 2021 l'indication principale (figure 1).

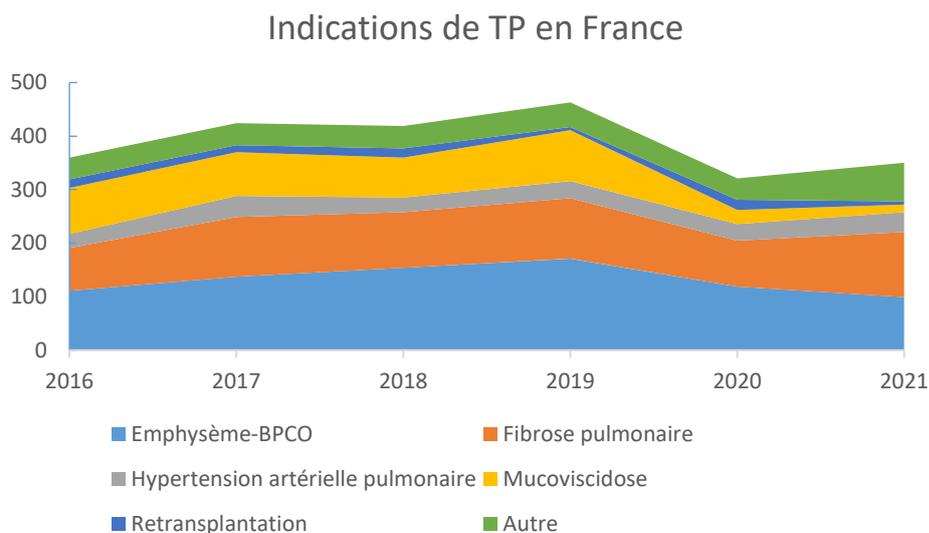


Figure 1. Evolution des indications de transplantations pulmonaires (TP) en France entre 2016 et 2021. Résultats rapportés en nombres de procédures réalisées chaque année. Emphysème-BPCO intégrant les déficits en alpha-1-antitrypsine. Fibrose pulmonaire intégrant la fibrose pulmonaire idiopathique et autres causes de fibrose pulmonaire. Les données concernant les TP pour COVID-19 ne sont pas rapportées (n=2 en 2021).

La mucoviscidose qui a été longtemps une indication majeure, environ 15% des TP, est en passe de devenir anecdotique. Cette évolution est en lien direct avec le développement des

médicaments modulateurs de la fonction du cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) qui permettent une amélioration très significative et une stabilisation de la fonction respiratoire. Une étude observationnelle française de 2021 rapporte l'amélioration spectaculaire de patients atteints de mucoviscidose avec atteinte respiratoire sévère, conduisant à retirer du parcours de greffe plus de 90% d'entre eux (5 patients restant dans le parcours contre 53 au début de l'étude)⁵. Les données du registre français illustre bien à cet égard cette transformation radicale de la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose⁶ (figure 2).

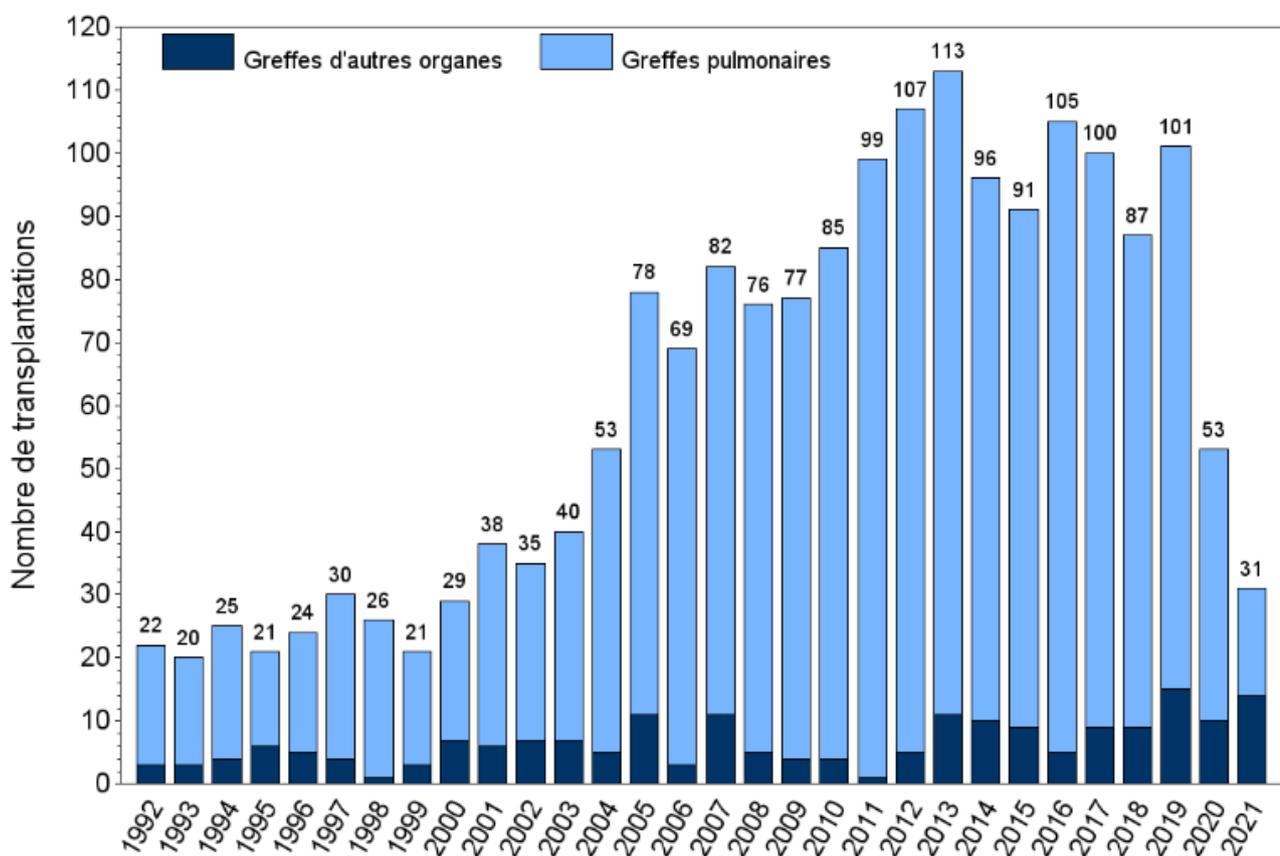


Figure 2. Nombre de transplantations pulmonaires et autres organes annuelles pour les patients atteints de mucoviscidose. Données issues du rapport 2021 du registre français de la mucoviscidose.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HP) est une cause de TP stable sur les 20 dernières années à environ 3% au niveau mondial et 10% en France. Parmi les autres causes primaires de TP, on retrouve la sarcoïdose, la lymphangioléiomyomatose, l'histiocytose

langhérancienne, la dilatation des bronches non liée à la mucoviscidose ou encore les maladies systémiques avec atteintes du tissu conjonctif (dont la sclérodermie).

La sélection des candidats à la TP implique un bilan exhaustif somatique, psychologique et social qui doit permettre à l'équipe de greffe d'éliminer des contre-indications absolues, d'évaluer le niveau de risque en lien avec la chirurgie et la période post-opératoire, de sonder les motivations du patient et ses ressources psychosociales. Il est important de noter que la sélection des candidats à la TP est un choix autant éthique que médical. Éthique parce que les poumons de donneurs sont rares et donc qu'un rationnement de cette ressource ayant le potentiel de sauver des vies est nécessaire. L'ISHLT indique que les principes devant guider les choix de sélection des candidats et de répartitions des greffons sont l'utilité (le bénéfice pour le receveur), la justice (prioriser les patients urgents ou ceux avec difficultés d'accès) et le respect de la personne et de son autonomie⁷. Médical, car il existe des comorbidités ou même simplement un état général qui ne permettent pas d'envisager un bénéfice individuel de la TP (*i.e.* le candidat à une meilleure chance de survie ou une meilleure qualité de vie prévisible sans greffe). A ce titre, les dernières recommandations de l'ISHLT n'évoquent plus seulement la notion de contre-indication mais aussi celle de facteur de risque à considérer. Dans les contre-indications absolues, on peut retenir le cancer avec haut risque de récurrence, le syndrome coronarien aigu ou l'accident vasculaire cérébral récent, l'insuffisance rénale ou hépatique sévère (sauf si considération d'une greffe combinée), un processus infectieux non contrôlé, un état fonctionnel altéré (non ambulatoire), une non-adhérence caractérisée ou encore la consommation active et la dépendance à des substances telles que le tabac, le cannabis ou l'alcool. Dans les éléments dits à hauts risques, on peut citer l'obésité avec indice de masse corporel supérieur à 35 kg/m² ou un âge supérieur à 70 ans. Ce dernier point est, à titre d'exemple, révélateur des évolutions sur le long terme des critères de sélection des candidats, initialement très restrictifs pour répondre à la pénurie d'organe et assurer les meilleurs résultats post-greffe. La prévalence des maladies respiratoires augmentant avec l'âge, le vieillissement global de la population a entraîné une augmentation du nombre de candidats plus âgés à la TP ⁸. Ainsi, l'ISHLT rapportait en 2013 que 10% des patients transplantés avaient 65 ans ou plus. En 2017, les candidats de plus de 65 ans représentaient plus de 30% de la liste d'attente aux Etats-Unis (E.U.)^{9,10}. En 1998, Les recommandations de l'ISHLT sur la sélection des candidats suggéraient en 1998 un âge limite à 60 ans, à 65 ans en

2006 avant de statuer en 2014 que les patients de plus de 75 ans étaient des candidats « peu probable » et pour finir en 2021 à simplement considérer un âge supérieur à 70 ans comme un facteur de risque élevé^{7,11-13}.

2. Allocation des organes, augmentation du pool de greffons

Le système français de répartition s'appuie sur 2 listes, une liste d'urgence nationale (mise en place en 2007) dans laquelle on retrouve des candidats à haut risque de décès immédiat et une liste standard. Un poumon de donneur va être proposé dans l'ordre suivant : aux patients en urgence nationale puis au centre de greffe le plus proche du prélèvement puis à l'ensemble des centres. Aux E.U., un score d'allocation individuel a été mise en place en 2005 dans le but d'attribuer les poumons disponibles sur la base de l'urgence médicale et du bénéfice potentiel post-transplantation. L'idée étant d'attribuer les poumons de donneur aux patients le nécessitant le plus en évitant ceux qui auraient un risque de mortalité post-opératoire précoce élevée. Dans les deux cas, en France et aux E.U., l'accès à la greffe a été facilité et la mortalité sur liste réduite de façon significative^{14,15}. Par ailleurs l'utilisation de systèmes de support vital hémodynamique et respiratoire (circulation extracorporelle (CEC) et membrane d'oxygénation extracorporelle (ECMO)) permet chez les patients les plus sévères de maintenir une condition médicale compatible avec une chirurgie de transplantation dans l'attente d'un organe¹⁶.

Le choix des poumons de donneurs a été dans les premiers temps de la greffe très strict avec une définition du donneur standard qui peut se résumer à un donneur de moins de 55 ans, ayant une exposition au tabac de moins de 20 paquets-années, sans anomalies radiologiques et avec un rapport PaO₂/FiO₂ de plus de 300 (témoignant d'une capacité d'oxygénation optimale). L'utilisation de greffons dits à critères élargis, ne rencontrant pas ces critères est devenu progressivement la norme du fait de la pénurie de greffons et de la publication de rapports rassurants quant au résultats de la greffe avec ce type de poumons¹⁷. Le développement dans les années 2010 de la technique de perfusion *ex vivo* d'organe, probablement la dernière innovation majeure en date de la TP, a ensuite permis d'augmenter le pool de greffons utilisables. A partir d'un poumon de donneur ne remplissant pas les critères de qualité permettant une TP, pour une raison réversible (œdème, atélectasie voire infection),

l'utilisation d'une machine permettant une perfusion et une ventilation *ex vivo* va pouvoir permettre d'améliorer la capacité d'hématose de l'organe et de le rendre compatible avec une greffe. Cette technique a fait ses preuves et est maintenant utilisée en routine^{18,19}. Finalement, des efforts sont réalisés actuellement afin de développer le prélèvement chez des donneurs à cœurs arrêtés. Cette situation particulière correspond à un donneur potentiel pour lequel des traitements de support vital sont arrêtés, pour lequel un décès est constaté après arrêt cardiaque et pour lequel une équipe de greffe va pouvoir, dans la continuité, prélever les organes. Malgré des freins logistiques importants avec la mobilisation de plusieurs équipes de chirurgie/anesthésie et de salles d'opération, l'utilisation de tels donneurs pourrait augmenter le nombre de greffons pulmonaires de près de 30%²⁰.

Ainsi, la dynamique de la transplantation pulmonaire a été portée par une augmentation importante du nombre de poumons de donneurs proposés aux équipes de transplantation, par l'élargissement des critères de qualité des greffons, par l'utilisation de technique de perfusion *ex vivo* et par le prélèvement d'organe chez des donneurs à cœurs arrêtés. Cette dynamique a aussi été soutenue par l'amélioration spectaculaire de la survie à court terme des receveurs que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

C. Survie et complications de la transplantation pulmonaire

1. Résultats de la transplantation pulmonaire

La survie des receveurs d'une TP reste en dessous de celle des autres organes solides. Le dernier rapport de l'ABM de 2021 rapporte un taux de survie à 5 ans de 63,5%²¹. La survie s'est cependant améliorée de façon considérable depuis les premières ères de la TP. Dans les années 1990, le taux de survie à un an était de 54%, en 2000 de 68%, en 2010 de 78% et dans la dernière période, il dépassait les 82% (figure 3).

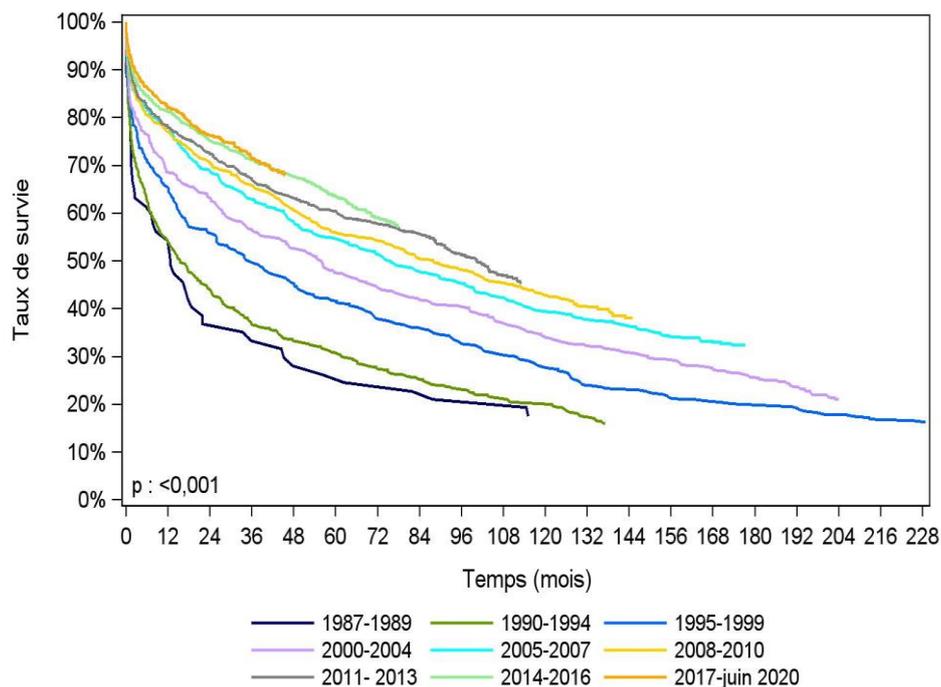


Figure 3. Taux de survie des receveurs après greffe pulmonaire en fonction de la période de transplantation.

Une différence importante existe selon la maladie sous-jacente avec par exemple, un taux de survie à 5 ans de 71% pour les patients atteints de mucoviscidose contre seulement 46% pour ceux présentant une fibrose pulmonaire (figure 4). Ces différences apparentes entre indications sont probablement induites en partie par d'autres facteurs comme la sévérité de la maladie, les comorbidités et l'âge des receveurs.

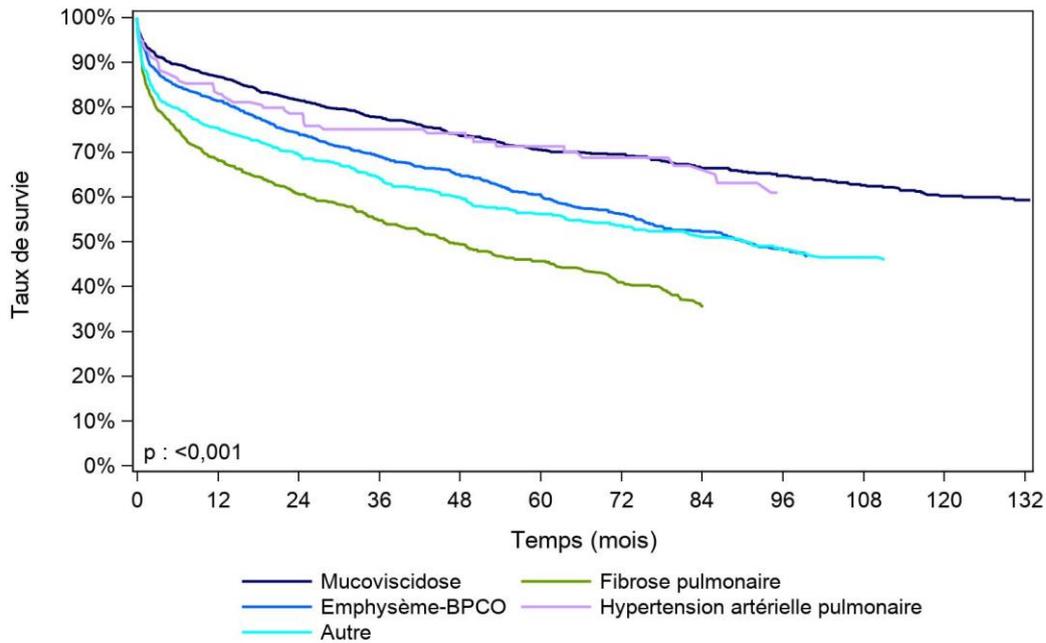


Figure 4. Taux de survie du receveur après greffe pulmonaire selon la maladie sous-jacente (première greffe en 2004 - 2019).

J'ai déjà évoqué les grandes évolutions de la période pré-transplantation, l'amélioration de la survie au cours du temps est liée aussi en grande partie à l'amélioration des techniques chirurgicales et d'anesthésie/réanimation et à une utilisation mieux maîtrisée des immunosuppresseurs.

En ce qui concerne les techniques chirurgicales, un bond en avant a été réalisé par la réalisation d'une procédure bi-pulmonaire séquentielle plutôt qu'en bloc. Dans le premier cas, les sutures entre le donneur et le receveur sont faites au niveau des bronches souches droite et gauche, et non au niveau trachéal, ce qui a permis de diminuer le risque d'ischémie et de lâchage de suture, complication le plus souvent fatale²². Cette technique permet aussi, dans certains cas, de ne pas avoir recours à la circulation extracorporelle, limitant ainsi les risques hémorragiques et thrombotiques ainsi que le risque de dysfonction primaire du greffon^{23,24}. Plus tardivement, la thoracotomie latérale bilatérale a supplanté la voie d'abord chirurgicale clamshell (bi-thoraco-sternotomie transverse) initialement préférée permettant de diminuer les risques de complications infectieuses, vasculaires et d'améliorer les douleurs et la fonction respiratoire post-opératoire²⁵.

Concernant l'immunosuppression, des protocoles d'induction ont été introduits à partir des années 1990 avec le sérum anti-lymphocytaire ou les anticorps monoclonaux ciblant le récepteur à l'interleukine(IL)-2 (Basiliximab). Ces traitements permettent de réduire l'incidence du rejet aigu et possiblement celle de la DCG. Une analyse récente du registre de l'United Network for Organ Sharing (UNOS) confirme un avantage de survie pour les patients ayant bénéficié d'un traitement d'induction²⁶. Le régime d'immunosuppression d'entretien est le plus fréquemment assuré par l'association de corticostéroïdes, d'un inhibiteur de calcineurine (Tacrolimus ou Ciclosporine) dont nous avons déjà évoqué le rôle déterminant et d'un antimétabolite (mycophénolate mofétil, acide mycophénolique ou azathioprine). Le Tacrolimus, introduit à la fin des années 1990 est majoritairement utilisé aujourd'hui par rapport à la Ciclosporine, permet probablement de réduire l'incidence de la DCG^{27,28}.

2. Complications post-opératoire

a. Dysfonction primaire du greffon

La dysfonction primaire du greffon (DPG) est décrite comme une lésion aiguë de l'allogreffe survenant dans les 72 heures suivant la transplantation caractérisée par un œdème non cardiogénique sans cause secondaire identifiable²⁹. La définition de la DPG inclue la présence d'opacités radiologiques et le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ et détermine 4 grades de sévérité (de grade 0 à 4). La survenue d'une DPG est associée à une augmentation de la mortalité et de la survenue d'un DCG. Il est supposé que la cause de la DPG est un phénomène d'ischémie-reperfusion mais les évènements inflammatoires en lien avec la mort cérébrale et les traumatismes chirurgicaux sont probablement des facteurs contribuant à cette complication. La prise en charge des formes sévères est un traitement de support avec des stratégies de ventilation protectrice ou l'utilisation de l'ECMO.

b. Complications des voies aériennes

Dans les techniques chirurgicales utilisées, il n'y a pas de remise en continuité du flux sanguin systémique à l'allogreffe. La vascularisation des bronches du donneur se fait donc par voie rétrograde du système veineux pulmonaire vers les artères bronchiques collatérales mettant ainsi les voies aériennes à risque de lésions ischémiques. Les complications bronchiques

peuvent survenir jusqu'à un tiers des cas dans certaines études³⁰. Une des conséquences possibles est l'apparition de déhiscence (ou lâchage de suture) qui dans le cas où elle est étendue peut entraîner une médiastinite, un pneumothorax, une hémorragie et le décès. La nécrose bronchique peut aussi apparaître sous la forme de pseudo-membrane pouvant obstruer la lumière bronchique, limiter les débits aériens et faire le lit de colonisation fongique³¹. La complication des voies aériennes la plus fréquente est la sténose bronchique qui peut être la conséquence d'un remaniement fibreux, d'une broncho-malacie ou du développement de granulomes. Ce phénomène se développe typiquement plusieurs semaines à plusieurs mois après la greffe. Les patients peuvent présenter des sibilants et la spirométrie une limitation des débits aériens avec un syndrome obstructif. La prise en charge diagnostique et thérapeutique est endoscopique permettant notamment une dilatation au ballon ou la pose de prothèse endobronchique. La plupart des situations peuvent être traitées avec succès mais certains patients vont connaître des sténoses récurrentes nécessitant des interventions répétées et pouvant compromettre le résultat fonctionnel de la greffe et leur qualité de vie.

c. Infections

Les infections constituent une menace permanente pour les receveurs de TP. Elles représentent la première cause de décès dans la première année de greffe et restent la deuxième cause après la première année. Une analyse exhaustive des complications infectieuses dépasse le cadre de l'introduction de ce travail, je ne développe ici que les pathogènes et les situations cliniques les plus fréquentes.

Une étude multicentrique prospective espagnole a rapporté que la pneumopathie bactérienne était de loin la plus fréquente des complications infectieuses avec un pic d'incidence dans le premier mois³². Les pathogènes les plus fréquemment retrouvés sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Après les bactéries, les infections virales représentent la deuxième complication infectieuse et le pathogène le plus fréquent est le Cytomegalovirus (CMV). Des mesures préventives sont préconisées avec dans la situation la plus à risque (sérologie receveur négative et sérologie donneur positive) une prophylaxie antivirale de 6 à 12 mois post-TP³³. La maladie à CMV peut se présenter comme un syndrome

mononucléosique (fièvre, asthénie, leucopénie) ou comme une infection invasive tissulaire pouvant toucher le poumon, le tube digestif, l'appareil oculaire ou le système nerveux central. Une surveillance de la charge virale périphérique est réalisée en routine et le traitement curatif est le plus souvent débuté lorsque cette charge virale est détectable sans qu'elle soit accompagnée de signes cliniques. Le traitement repose sur l'utilisation du Ganciclovir (IV) ou du Valganciclovir (PO). Dans le cas de souche virale résistante le Foscavir peut être utilisé ainsi le Maribavir (sous conditions car sans autorisation de mise sur le marché à ce jour).

Le taux de colonisation pulmonaire fongique des receveurs de TP est de l'ordre de 30 à 40% et *Aspergillus* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée. La survenue d'une infection fongique invasive est cependant plus rare, avec une incidence variant selon les observations de 3 à 14% et ayant tendance à survenir dans les 6 premiers mois de la greffe. L'ISHLT distingue aussi la trachéobronchite aspergillaire qui inclut la trachéobronchite ulcéreuse et l'infection anastomotique. Ces formes peuvent être traitées par l'utilisation d'azolés par voie orale ou d'amphotéricine inhalée. Les formes invasives touchent majoritairement le poumon mais peuvent parfois présenter des localisations extra-pulmonaires. Le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire peut être problématique, la fréquence élevée de la colonisation aspergillaire rendant difficile l'interprétation des prélèvements infectieux respiratoires. A ce titre, l'imagerie pulmonaire par tomographie assistée par ordinateur peut aider la prise de décision car des images spécifiques sont décrites ainsi que le dosage de l'antigène aspergillaire galactomannane qui présente une spécificité élevée (mais une sensibilité basse)³⁴. Les traitements azolés (voriconazole, itraconazole, posaconazole et isavuconazole) sont le pilier du traitement de l'aspergillose invasive.

d. Rejet aigu cellulaire

Le diagnostic de rejet aigu cellulaire (RAC) est réalisé à partir l'observation anatomopathologique d'infiltrats de cellules mononuclées périvasculaires qui dans les grades les plus sévères peut déborder sur l'interstitium adjacent et les espaces alvéolaires. Une infiltration bronchiolaire (définissant la bronchiolite lymphocytaire) peut accompagner ces lésions ou survenir de façon indépendante³⁵. La suspicion diagnostique se fait le plus souvent sur une baisse de la fonction respiratoire évaluée par spirométrie. Les symptômes présentés

par les patients ne sont pas spécifiques (toux, dyspnée, fièvre modérée, asthénie) et le RAC peut être asymptomatique dans 40% des cas. Selon le registre de l'ISHLT, environ 30% des receveurs présentent au moins un épisode de RAC la première année mais des études dédiées systématiques retrouvent des taux plus élevés, proche de 50%. Une étude nord-américaine récente retrouvait comme facteurs de risques un nombre d'incompatibilités pour le human leucocyte antigen (HLA) supérieures à 4 et la procédure de transplantation mono-pulmonaire^{36,37}. Après la première année, l'incidence du RAC décline de façon marquée. Le traitement classique consiste en l'administration sur 3 jours de fortes doses de Solumedrol relayées par une dose décroissante de Prednisone. Dans la majorité des cas la fonction respiratoire et les symptômes s'améliorent rapidement mais le risque de récurrence existe. La réalisation de biopsies transbronchiques systématiques de suivi montre une récurrence chez 25% des patients. Le RAC a été identifié dans de nombreuses études comme un facteur de risque de DCG mais aucun travaux récents ne valident cette information dans des cohortes plus contemporaines^{38,39}.

e. Rejet médié par les anticorps

Ce paragraphe se base principalement sur le rapport de consensus de l'ISHLT publié en 2016⁴⁰. Les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur (ASD) sont responsables du rejet médié par les anticorps (RMA). Les antigènes du donneur les mieux caractérisés sont les HLA, divisés selon leur structure et leur fonction en HLA de classe I et de classe II. Le RMA est un processus pathologique, sérologique et clinique complexe où des cellules B allo-spécifiques et des plasmocytes produisent des anticorps dirigés contre les antigènes du donneur. Du complexe anticorps-antigène résulte une réponse immune amplifiée via des voies dépendantes ou non du complément aboutissant à une atteinte tissulaire pulmonaire et une dysfonction du greffon. Il existe aujourd'hui des moyens d'analyses spécifiques permettant de déterminer précisément les ASD présents, leur capacité à fixer le complément (test C1q) et l'existence d'un processus tissulaire (immunofixation du C4d). D'un point de vue anatomopathologique, le RMA est caractérisé par des éléments non spécifiques comme la margination des neutrophiles, la capillarite et la vascularite à neutrophiles. L'immunohistochimie pour le C4d apporte probablement plus de spécificité. La définition du RMA intègre donc 4 éléments : la présence dans le sang circulant d'ASD, la fonction du greffon, l'observation d'éléments

histologiques non spécifiques, l'immunofixation tissulaire du C4d et l'exclusion d'autres causes. En fonction de la présence ou non de ces critères le diagnostic de RMA est considéré par le rapport de consensus comme certain, probable ou possible (tableau 1). Le rapport différencie les formes cliniques avec dysfonction pulmonaire mesurable et les formes subcliniques avec fonction d'allogreffe normale. Différents phénotypes cliniques sont aussi présentés avec une forme hyperaiguë survenant pendant la chirurgie ou dans les premières 24 heures, une forme aiguë et une forme chronique cette dernière pouvant être considérée comme une forme occulte de DCG.

Les traitements du RMA ont pour objectifs de réduire les ASD circulants, de supprimer la réponse cellulaire B et de limiter l'activation du complément. La plasmaphérèse et l'immunoadsorption sont utilisées pour diminuer le taux d'ASD circulants. Ces techniques ne permettent pas d'obtenir une désensibilisation à long-terme, les taux de réduction sont variables et il peut exister un phénomène de rebond avec augmentation de la production d'anticorps après les plasmaphérèses. En ce qui concerne la cible de la voie du complément, il existe un inhibiteur de la C1 estérase et l'Eculizumab qui lui inhibe le composant C5. Plus récemment, il a été démontré que l'IgG endopeptidase (enzyme qui clive les IgG) avait une capacité de réduction spectaculaire des anticorps anti-HLA chez des patients hypersensibilisés en attente de greffe rénale et dans une situation similaire, un cas clinique en transplantation pulmonaire a été rapporté^{41,42}. Les immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (IVIg) sont utilisées généralement en association et non seules. Ce traitement serait capable de neutraliser les ASD circulants et d'inhiber l'activation du complément. Pour inhiber la production d'anticorps, différents traitements ciblant la réponse B sont disponibles. En premier lieu, le Rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20, ciblant les lymphocytes B matures. Il existe aussi des inhibiteurs du protéasome, ciblant les plasmocytes tel que le Bortezomib ou le Carfilzomib⁴³.

Il est difficile de porter des conclusions définitives sur l'efficacité des schémas de traitements décrits dans la littérature car ils sont variables selon les études et une partie des informations en transplantation pulmonaire repose sur des rapports de cas cliniques. Le schéma le plus utilisé est cependant l'association d'immunoglobulines polyvalentes IV, la plasmaphérèse et le Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20). A ce jour, il n'existe pas d'études randomisée, contrôlée comparant deux régimes de traitement et les travaux sus-cités ont utilisé des

définitions différentes du RMA. Deux études de 2013 et 2018 de l'équipe de Saint Louis (E.U.) qui retenaient des critères similaires au rapport de consensus rapporte une mortalité de 26 et 29% suivant le diagnostic de RMA. Les autres participants présentaient une amélioration clinique permettant un retour à domicile mais plus de 90% ont développé par la suite une DCG^{44,45}. Ces données suggèrent que le RMA peut être réfractaire aux traitements engagés et qu'il est associé à un pronostic sombre en terme de survie et de DCG.

	Dysfonction pulmonaire	Exclusion autres causes	Histologie pulmonaire	Fixation C4d	ASD
Certain	+	+	+	+	+
Probable	+	+	+	-	+
Probable	+	+	+	+	-
Probable	+	+	-	+	+
Probable	+	-	+	+	+
Possible	+	+	+	-	-
Possible	+	+	-	-	+
Possible	+	+	-	+	-
Possible	+	-	+	+	-
Possible	+	-	+	-	+
Possible	+	-	-	+	+

Tableau 1. Définition et probabilité du diagnostic de rejet clinique pulmonaire médié par les anticorps. + : item présent. – item absent. ASD : anticorps anti-HLA spécifiques du donneur. (adapté de Levine et al., JHLT, 2016)

II. Dysfonction chronique du greffon pulmonaire

L'amélioration de l'espérance de vie des patients greffés pulmonaires, nous l'avons vu plus haut, s'explique principalement par des innovations qui ont touché la période péri-opératoire avec des améliorations des techniques chirurgicales, de la prise en charge anesthésique et en réanimation ou encore de la maîtrise de l'immunosuppression⁴⁶. Il est intéressant de noter que sur les courbes de survie des receveurs en fonction de la période de transplantation, passé 24 mois post-greffe, les pentes des courbes sont assez similaires entre les différentes périodes considérées. La déduction de cette constatation est qu'il n'y a pas eu jusqu'à lors de

modifications dans la prise en charge des patients permettant de réduire la mortalité à long-terme. Celle-ci reste fortement affectée par la survenue de la DCG qui touche près de 50% des patients à 5 ans de greffe et qui est responsable après la première année de transplantation de plus de 40% des décès ⁴⁷. En 2019, la nomenclature de la DCG a été standardisée ainsi que les différents phénotypes cliniques dans un rapport de consensus de l'ISHLT⁴⁸. Je vais dans ce chapitre revenir sur les définitions de la DCG, la physiopathologie, les moyens diagnostiques et thérapeutiques à disposition ainsi que sur les dernières innovations dans cette pathologie.

A. Définition et diagnostic

1. Définition

La DCG est définie par une baisse du volume expiratoire maximal en 1 seconde (VEMS) supérieure ou égale à 20% par rapport au VEMS de référence qui est la moyenne des 2 meilleures valeurs obtenues (espacées d'au moins 3 semaines) après la transplantation. Cette diminution de la fonction doit être persistante et retrouvée sur deux valeurs de VEMS espacées d'au moins 3 mois ⁴⁸. Il existe différentes classes de DCG selon le niveau de baisse du VEMS, allant de 0 à 4 (tableau 2) ⁴⁸. Il est important de retenir que la DCG correspond surtout à un terme général permettant de décrire les manifestations cliniques d'une variété de processus pathologiques dans les voies aériennes et le parenchyme du poumon greffé⁴⁸.

Grade de DCG	Spirometrie
DCG 0	VEMS actuel > 80% VEMS de référence
DCG 1	VEMS actuel > 65-80% VEMS de référence
DCG 2	VEMS actuel > 50-65% VEMS de référence
DCG 3	VEMS actuel > 35-50% VEMS de référence
DCG 4	VEMS actuel ≤ 35% VEMS de référence

Tableau 2. Classification de la sévérité de la dysfonction chronique greffon pulmonaire (DCG) en fonction du VEMS de référence (adapté de Verleden et al., ISHLT, 2019)

2. Diagnostic différentiel

L'altération persistante de la fonction respiratoire peut être liée à d'autres étiologies qui doivent être éliminées avant de poser le diagnostic de DCG :

- Le déclin physiologique de l'organe lié à l'âge.
- Les causes pleurales (épanchement aérique ou liquidien).
- Les causes bronchiques (sténoses des voies aériennes).
- Les états d'hyperinflation hydrosodée (causes rénales, cardiaques ou hépatiques).
- L'infiltration tumorale.
- La récurrence de la maladie causale sur le greffon (lymphangioliomyomatose, sarcoïdose).
- Les toxicités pulmonaires médicamenteuses.
- Les infections pulmonaires.
- Les rejets aigus/subaigus d'origine cellulaire ou humorale.

Il est à noter que la DCG peut parfois être partiellement réversible, témoignant d'une composante inflammatoire pouvant être en lien avec une part de rejet aigu ou d'infection et donc avec un potentiel d'amélioration après le traitement causal à la différence des authentiques lésions broncho-parenchymateuses de la DCG considérées comme fixées.⁴⁹

3. Phénotypes

Deux phénotypes principaux sont décrits.

Le syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS) est la manifestation de la DCG la plus fréquente représentant plus des deux tiers des DCG⁵⁰, Il a été décrit pour la première fois en 1984 chez des patients transplantés cardio-pulmonaires⁵¹. Il est caractérisé par une inflammation et une obstruction des petites voies aériennes responsable du déclin de la fonction respiratoire avec un trouble ventilatoire obstructif et peu d'anomalies radiologiques⁵². Les anomalies radiologiques pouvant être observées sont en lien avec l'atteinte bronchique qui caractérise ce syndrome. Elles comprennent le piégeage aérique et l'atténuation en mosaïque en rapport, des bronchiectasies et des micronodules de distribution centrolobulaire (figure 5)⁵³.

Le syndrome restrictif d'allogreffe (RAS) a été décrit pour la première fois en 2011 par Sato et al.⁵⁴. Il représente environ 30% des DCG. D'un point de vue histologique, on peut observer de lésions de dommage alvéolaire diffus, de pneumonie organisée et de fibrose extensive atteignant particulièrement les lobes supérieurs et la plèvre, pouvant donner dans ce dernier cas un pattern histologique de fibro-élastose pleuro-parenchymateuse. C'est une forme avec un phénotype restrictif défini par une mesure de la capacité pulmonaire totale inférieure à 90% de la valeur de base et par la présence d'opacités radiologiques persistantes (verre dépoli, consolidation, lignes septales ou réticulations) avec ou sans fibrose pleurale⁴⁸.

Dans le cas particulier de la transplantation mono-pulmonaire, l'évolution naturelle du poumon natif pathologique influe sur la mesure de la capacité pulmonaire totale qui n'est donc pas le reflet exclusif du volume du greffon pulmonaire. Il a donc été proposé d'utiliser le rapport de VEMS/capacité vitale forcée (CVF). Sa normalité ou son augmentation chez des patients ayant une baisse du VEMS et de la CVF est en faveur d'un profil restrictif⁵⁵. Le pronostic du RAS est plus péjoratif que celui du BOS avec une survie médiane entre 6 et 18 mois contre 3 à 5 ans^{54,56}.

En dehors de ces deux entités, il existe un phénotype dit mixte. La distinction entre le BOS et le RAS peut parfois être difficile avec des profils lésionnels pouvant être intriqués et une entité pouvant évoluer vers l'autre (BOS vers RAS et inversement). La DCG mixte correspond à un déclin de la fonction respiratoire alliant baisse du VEMS, du rapport VEMS/CVF et une diminution associée de la capacité pulmonaire totale. Des anomalies radiologiques sont dans ce cas présentes. Lorsque les patients ne répondent pas aux critères de BOS, de RAS ou de dysfonction mixte, la DCG est alors décrite comme non définie⁴⁸.

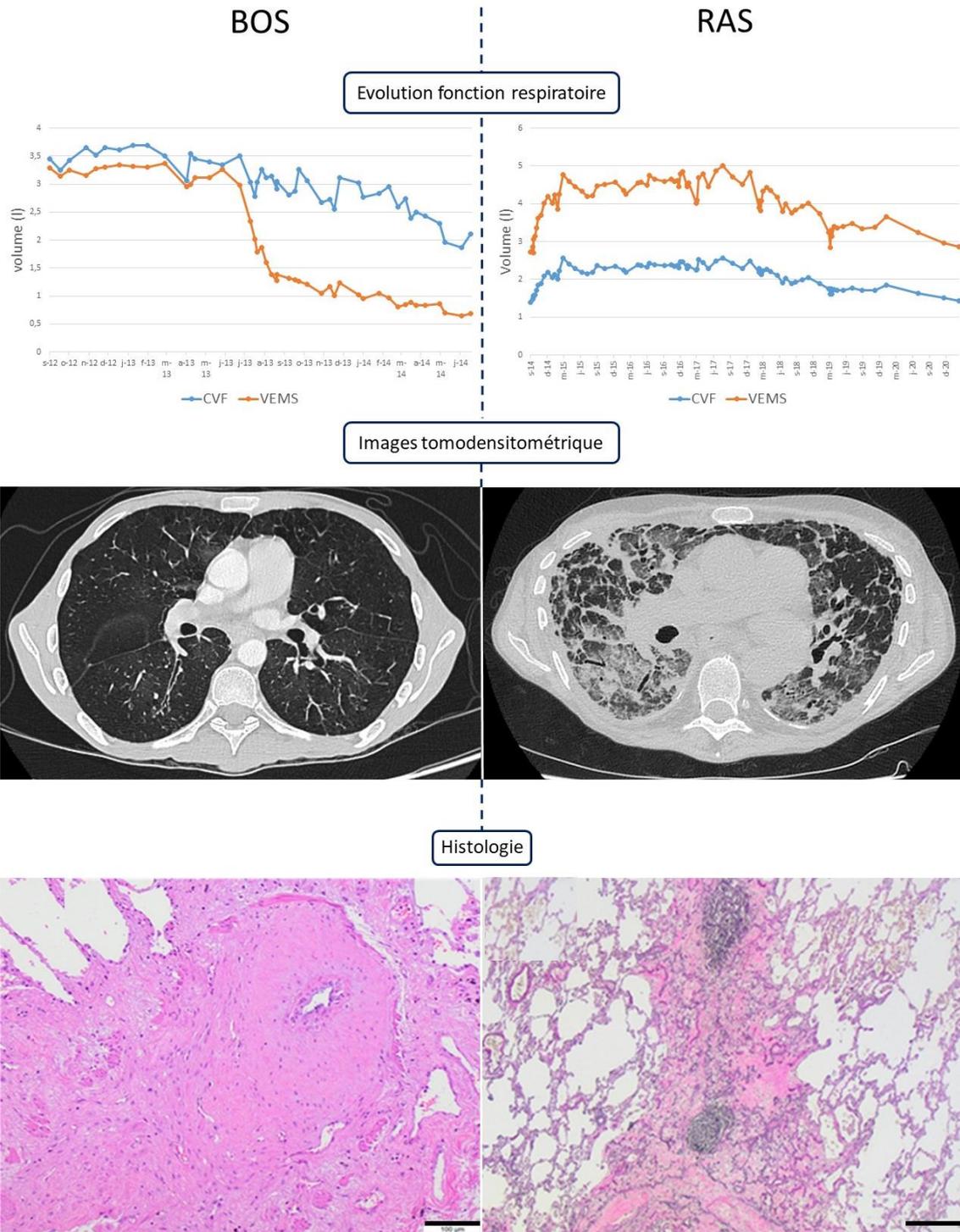


Figure 5. Caractéristiques des DCG. (A) Evolution de la fonction respiratoire de deux patients, à gauche présentant un BOS et à droite un RAS. (B) Images caractéristiques des deux phénotypes de dysfonction chronique du greffon pulmonaire, à gauche BOS avec distension thoracique et discrètes bronchiectasies et à droite RAS avec syndrome interstitiel diffus avec atteinte pleural et parenchymateuse. (C) Coloration hématoxyline et éosine montrant à gauche (BOS) l'oblitération fibrotique subtotal de la bronchiole typique de la bronchiolite oblitérante et à droite (RAS) la fibrose intra-alvéolaire paraseptale avec élastose septale (de Verleden et al, *Am J Transplant*, 2020). BOS : syndrome de bronchiolite oblitérante ; RAS : syndrome restrictif d'allogreffe ; VEMS : volume expiratoire maximal en 1 s ; CVF : capacité vitale forcée.

4. Facteurs de risques cliniques

La physiopathologie de la DCG reste incomplètement élucidée mais plusieurs facteurs de risques ont été identifiés dont nous présentons ci-dessous une liste non exhaustive.

Facteurs allo-immuns :

Rejet aigu cellulaire

Rejet dépendant des anticorps (ou humoral)

Facteurs non allo-immuns :

Dysfonction primaire du greffon

Reflux gastro-oesophagien (RGO)

Infection pulmonaire virale, bactérienne ou fongique

Pollution atmosphérique

5. Explorations

La plupart des équipes commencent des investigations dès 10% de baisse de VEMS, en considérant que ce seuil de valeur d'altération de la fonction respiratoire n'est pas lié à des fluctuations journalières de VEMS.

a. Epreuves fonctionnelles respiratoires

Les épreuves fonctionnelles respiratoires restent à la base du diagnostic. Le rapport de consensus de l'ISHLT préconise la réalisation d'une spirométrie à chaque visite hospitalière et toutes les 4 à 6 semaines en cas de suspicion de DCG. Dans les DCG décrits comme stables ou avec un déclin lent, la spirométrie doit être répétée tous les 3 à 4 mois. L'automesure du VEMS au domicile est un outil qui permet de détecter de manière précoce le déclin de la fonction respiratoire et de mettre en place rapidement les explorations diagnostiques nécessaires ⁵⁷. La mesure de la capacité pulmonaire totale doit être réalisée à 3 et 6 mois après

transplantation puis au moins de manière annuelle. Sa réalisation doit aussi être envisagée dès que le diagnostic de DCG est suspecté afin d'en déterminer précisément le phénotype.

b. Imagerie

Le scanner thoracique est indispensable pour définir le phénotype de DCG mais aussi pour orienter vers un diagnostic alternatif. Le piégeage aérique et l'atténuation en mosaïque sont des signes radiologiques en faveur d'un BOS tandis que du verre dépoli et des images de condensations avec éléments de fibrose associés sont plutôt en faveur d'un RAS.

c. Endoscopie bronchique

L'endoscopie bronchique s'envisage dès lors qu'une baisse de VEMS est constatée. Elle permet de documenter une cause infectieuse (bactérienne et/ou fongique et/ou virale) à ce déclin par la réalisation du lavage broncho-alvéolaire (LBA) ou encore d'un rejet aigu s'il est prouvé sur les biopsies transbronchiques. Sa place dans le suivi de la DCG est plus discutable puisqu'il n'y a pas d'éléments spécifiques d'un certain phénotype dans le LBA ou dans les biopsies transbronchiques. En effet, la sensibilité de ces dernières est faible dans le diagnostic de BOS ⁴⁹. Cela s'explique par l'hétérogénéité topographique des lésions de rejet et par le territoire limité des biopsies. Il est aussi nécessaire de prendre en compte le caractère invasif de ce type de procédure qui limite leur exécution de façon répétée. Au-delà de l'utilité diagnostique, les différentes explorations endoscopiques trouvent un intérêt pronostique. Les LBA (réalisés à l'état stable) avec des taux d'éosinophiles ($\geq 2\%$) et de neutrophiles ($\geq 15-20\%$) élevés sont associés à un risque de développer une DCG et cela peut également avoir un impact péjoratif sur la survie ⁵⁸⁻⁶⁰. De même, la présence d'une bronchiolite lymphocytaire sur les biopsies et d'une hyperéosinophilie sanguine est associée à une mortalité accrue chez les patients porteurs d'un RAS ⁶⁰.

6. Pronostic

Selon les données du registre de l'ISHLT, la DCG survient chez plus de 47% des receveurs après 5 ans de greffe et elle représente la première cause de mortalité après la première année post greffe représentant plus de 40% de toutes les causes de décès. Les analyses de cohorte ou monocentriques permettent d'avoir cependant une évaluation plus précise. Dans la première publication définissant le RAS, la cohorte regroupait 493 patients ayant survécu au moins 3 mois après la greffe, 156 (34%) ont développé une DCG dont 109 (22%) présentaient un BOS et 47 (9%) un RAS⁶¹. La survie médiane après le diagnostic de RAS était de 1,5 ans et pour le BOS de 4 ans. Plus récemment, le travail collaboratif entre la cohorte de patients transplantés pulmonaires franco-belge COLT et la cohorte suisse Swiss Transplant Cohort Study, a déterminé le phénotype de chaque patients par un comité d'experts examinant la fonction respiratoire, les imageries disponibles et les facteurs confondants. Sur les 422 patients inclus, le comité jugeait que 81 (19%) receveurs avaient développé une DCG certaine dont 51 (12%) un BOS et 30 (7%) un RAS⁶². Il faut préciser que dans cette étude, parmi les patients qui présentaient une altération chronique de la fonction respiratoire, le comité n'avait pas retenu le diagnostic de DCG pour 45 patients en raison de la présence de facteurs confondants. De la même manière, une étude de l'équipe de Louvain a analysé de façon rétrospective les phénotypes des patients transplantés de leur centre en séparant les dysfonctions chroniques pour lesquelles une cause était retrouvée. Les auteurs trouvaient sur la période d'analyse une incidence de DCG sans facteur confondant de 30% dont 21% de patients avec BOS et 9% de patients avec RAS. La survie à 5 ans pour les patients avec DCG était de 72% contre 90% pour les patients sans DCG. Le pronostic des patients présentant une DCG de type BOS était meilleur que celui des receveurs avec un phénotype restrictif avec une médiane de survie de 5,5 et 2,5 ans respectivement⁶³. L'incidence de la DCG est probablement surévaluée dans les données du registre ISHLT mais il reste vrai que la DCG est une complication très fréquente de la transplantation pulmonaire qui est associée à un pronostic particulièrement péjoratif.

B. Traitement de la DCG

La prise en charge thérapeutique de la DCG est l'un des principaux défis des années à venir pour l'amélioration de l'espérance de vie des patients transplantés pulmonaires. S'il n'existe pas à ce jour de traitement pharmacologique ayant fait la preuve de son efficacité pour

améliorer le pronostic de la DCG, plusieurs pistes sont explorées. Certains traitements pourraient être bénéfiques pour des patients spécifiques et la retransplantation pulmonaire, option radicale, peut pour les patients éligibles transformer leur trajectoire. Un document de consensus de 2014 existe sur la prise en charge de la DCG⁴⁹.

1. Modification du traitement immunosuppresseur

En premier lieu, la modulation du traitement immunosuppresseur de maintenance ne semble pas apporter de bénéfice concret sur l'évolution de la fonction respiratoire. Les recommandations en vigueur indiquent de ne pas utiliser la corticothérapie à fortes doses au long cours, du fait de l'absence d'efficacité prouvée et des effets secondaires délétères avérés⁶⁴. Plusieurs études ont suggéré que la conversion de la Ciclosporine vers le Tacrolimus pouvait permettre un ralentissement du déclin de la fonction respiratoire mais avec un niveau de preuve faible du fait de l'absence d'études randomisées⁶⁵⁻⁶⁷. Il est cependant important de noter que plusieurs études prospectives, randomisées et contrôlées ont évalué différents régimes d'immunosuppressions initiaux, mis en place immédiatement après la greffe. Ces travaux montrent d'une part une possible supériorité du Tacrolimus par rapport à la Ciclosporine sur la survenue de la DCG mais sans effet sur la survie et d'autre part, l'absence d'effet de l'Everolimus sur l'incidence de la DCG^{27,28,68-70}.

2. Azithromycine

L'utilisation de l'azithromycine est peut-être à ce jour l'innovation thérapeutique la plus marquante dans la prise en charge de la DCG. Au début des années 2000, trois études ont rapporté que, chez des patients présentant un BOS établi, l'administration de l'azithromycine en plus du traitement immunosuppresseur de maintenance permettait une amélioration moyenne du VEMS de plus de 10%⁷¹⁻⁷³. De nombreux autres rapports ont corroboré par la suite ces résultats, identifiant par ailleurs que la présence d'une neutrophilie au LBA ($\geq 15\%$) était un facteur prédictif de réponse au traitement et que les patients répondeurs avaient un meilleur pronostic que les non-répondeurs⁷⁴⁻⁷⁶. Ces résultats ont abouti à la définition de la dysfonction du greffon répondant à l'azithromycine, correspondant chez un patient présentant une suspicion de DCG, à une amélioration de 10% ou plus du VEMS après

l'introduction de l'azithromycine. Les actions anti-inflammatoires et immuno-modulatrices du néo-macrolide sont probablement responsables de cet effet bénéfique dans la DCG. Les effets bénéfiques de l'azithromycine ont été confirmés par une étude contrôlée contre placebo et randomisée⁷⁷ avec une analyse à distance qui suggérait un ralentissement de la progression du BOS sous azithromycine⁷⁸. Une autre étude contrôlée et randomisée a démontré que l'azithromycine prescrit à la sortie de l'hospitalisation suivant la greffe pouvait prévenir la survenue de la DCG. Dans le bras azithromycine, 12% des patients avaient développé une DCG contre 44% dans le bras placebo⁷⁹. Il est recommandé en tout cas d'essayer ce traitement pour une durée minimale de 8 semaines chez tout patient présentant un diagnostic suspecté ou établi de DCG.

3. Traitement du reflux gastro-oesophagien

Le RGO est une complication retrouvée très fréquemment chez les patients transplantés pulmonaires et est un facteur de risque très probable de la DCG^{80,81}. Des études récentes incriminent plus spécifiquement les troubles de la motilité œsophagienne dans le risque de la dysfonction du greffon^{82,83}. Le RGO doit donc être recherché de façon attentive. Des tests de la mobilité gastro-intestinale proximale et des pH/impédancemétrie sont réalisés de façon routinière par les centres de transplantations. Par ailleurs, l'analyse de marqueurs de micro-aspiration dans le LBA, comme la pepsine ou la présence d'acide biliaire, pourrait permettre de mieux identifier cette complication⁸⁴. Le reflux non-acide semble être plus délétère que le reflux acide et de ce fait, l'utilisation des inhibiteurs de pompes à protons n'est pas suffisante. La prise en charge chirurgicale, plus spécifiquement la fundoplicature de Nissen ou de Toupet (réalisant une valve respectivement complète ou uniquement postérieure) peut être proposée aux patients présentant un RGO. Plusieurs séries ont rapporté une amélioration de la fonction respiratoire et de la survie de patients transplantés après fundoplicature⁸⁵⁻⁸⁹. Il est à noter cependant que ces études, observationnelles ou séries de cas, ont étudié des patients transplantés pulmonaires avec un RGO et non spécifiquement des patients transplantés avec RGO et un possible BOS. Le lien direct entre le RGO et le BOS et à plus forte raison entre le traitement du RGO et l'amélioration du BOS, n'est donc pas encore complètement établi.

4. Photophérèse extra-corporelle (PEC)

La PEC est une thérapie à visée immuno-modulatrice visant à réaliser une leucophérèse pour isoler les leucocytes du patient puis à les traiter avec des ultraviolets et du methoxsalen pour finalement les ré-injecter au patient. La plupart des données d'efficacité de la PEC sur la DCG proviennent d'études monocentriques, rétrospectives, avant-après et montrent un ralentissement du déclin de la fonction respiratoire à l'initiation de la PEC⁹⁰⁻⁹². Une étude prospective non contrôlée menée par l'équipe de Vienne indiquait que plus d'un tiers des patients traités par la PEC pouvaient espérer une stabilisation de leur fonction respiratoire à 6 mois⁹³. Plus récemment, l'équipe de Strasbourg a montré sur une série de 25 patients présentant un BOS que le déclin de la fonction respiratoire semblait être stabilisé à la mise en route de la PEC. Cependant, il n'y avait pas de différence sur le risque global de chute de 20% ou plus du VEMS en comparaison avec des patients non traités⁹⁴. La tolérance de cette thérapeutique est très satisfaisante mais le niveau de preuve d'efficacité reste limité. Des études prospectives contrôlées et randomisées sont en cours aux Etats-Unis et au Royaume-Uni ainsi qu'une analyse rétrospective des patients inclus dans l'étude COLT en France. Ces résultats permettront peut-être de déterminer la place de la PEC dans la stratégie thérapeutique de la DCG.

5. La re-transplantation

La re-transplantation est le seul traitement curatif existant de la DCG. Cette stratégie soumet cependant, de nouveau, le patient à une chirurgie à haut risque et aux complications associées à une forte immunosuppression. Par ailleurs, la plupart des patients présentent suite à la première greffe de nouvelles comorbidités comme une insuffisance rénale, un diabète ou une hypertension artérielle. De ce fait, seule une minorité de candidats est éligible. Les résultats d'une deuxième transplantation pulmonaire pour une DCG sont inférieurs à ceux d'une première transplantation avec, selon les études, des médianes de survie rapportées entre 2 et 3 ans^{95,96}. Une analyse récente du registre de l'ISHLT rapporte une survie à un an de 73% avec comme facteurs de risque associés à la mortalité un délai court entre les deux transplantations, un âge du donneur élevé et le fait pour le receveur d'être sous ventilation mécanique avant la deuxième greffe⁹⁷. Le taux de patients retransplantés varie peu. Depuis

2007 la retransplantation représente entre 4 et 6% de toutes les transplantations réalisées annuellement. Une étude multicentrique Européenne et Nord-Américaine, de moindre ampleur mais avec des données plus précises retrouvait une médiane de survie de 5,1 ans pour les receveurs re-transplantés pour un BOS et de 1,7 ans pour ceux re-transplantés pour un RAS. De plus, les patients ayant présenté un RAS lors de la première greffe étaient plus à risque de développer un nouveau RAS, et ce de façon plus précoce⁹⁸. Finalement, une étude plus récente, proposant une approche chirurgicale moins invasive (notamment épargne de l'abdomen sternal et de la circulation extra-corporelle per-opératoire), rapporte des résultats à courts termes plus favorables⁹⁹. La re-transplantation est donc possible avec un risque principalement concentré sur la période péri-opératoire et doit être proposée à des patients bien sélectionnés.

6. Autres traitements

Les traitements utilisés actuellement dans la fibrose pulmonaire idiopathique ont été essayés dans la DCG avec initialement plusieurs séries de cas rapportées^{100,101}. Des études contrôlées contre placebo aux Etats-Unis et en Europe sont en cours. Finalement, deux études récentes ont permis de mettre en évidence une potentielle efficacité de l'utilisation de la Ciclosporine liposomale inhalée chez des patients présentant un BOS^{102,103}. Cette voie d'administration permet d'obtenir des concentrations intra-greffon élevées sans avoir les effets secondaires systémiques avec toutefois la contrainte pour les patients de la voie inhalée. D'autres stratégies ont été rapportées, nous pouvons citer l'irradiation lymphoïde totale, comme traitement immuno-modulateur mais, là encore, les preuves d'efficacité ne sont pas solides et les effets secondaires de cette approche sont fréquents¹⁰⁴.

C. Physiopathologie de la DCG

Les premiers cas de DCG ont été décrits dès la toute première ère de transplantation, avant l'arrivée des inhibiteurs de calcineurine. Derom et al publient ainsi en 1971, le cas clinique d'un receveur d'une transplantation pulmonaire qui va présenter plusieurs épisodes de rejets aigus sévères et finir par développer au bout de 6 mois une altération irréversible de sa

fonction respiratoire avec un profil obstructif. L'analyse pulmonaire d'autopsie a rapporté des lésions de fibroses avec des infiltrations inflammatoires¹⁰⁵. Le terme de bronchiolite oblitérante (BO) apparaît une décennie plus tard avec la constatation sur une série d'autopsies d'une fibrose inflammatoire des bronchioles terminales et respiratoires mais aussi, déjà, l'observation par différents groupes de la présence d'une fibrose pleurale et interstitielle associée¹⁰⁶. Les mêmes auteurs font la corrélation de ces observations histologiques avec le déclin progressif de la fonction respiratoire constatée. La BO est alors identifiée comme le corolaire morphologique du rejet chronique. Les biopsies transbronchiques, réalisées en surveillance de routine, sont cependant très peu sensibles pour identifier ces lésions périphériques et hétérogènes, c'est pourquoi il a été introduit le terme de syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS), une entité clinique basée seulement sur l'épreuve fonctionnelle respiratoire⁵². Cependant, plusieurs observations de dysfonction chronique du greffon avec un profil fonctionnel surtout restrictif et une présentation radiologique particulière vont conduire à la définition en 2011 par Sato et al. d'un phénotype bien distinct de la BO, le syndrome restrictif d'allogreffe (RAS)⁵⁴. C'est à cette époque que le terme de dysfonction chronique du greffon pulmonaire a été de nouveau utilisé, comme un terme parapluie englobant toutes les formes de défaillance chronique du greffon pulmonaire. Je vais présenter les caractéristiques histologiques des phénotypes de la DCG pour ensuite revenir sur un aspect immunologique des connaissances actuelles dans cette pathologie.

1. Histologie de la DCG

a. Le syndrome de bronchiolite oblitérante

Des analyses sur des explants pulmonaires de receveurs présentant un BOS terminal ont montré une obstruction abondante par remodelage fibreux des petites voies aériennes débutant à la 5^e génération de division bronchique et augmentant jusqu'à 70% de voies aériennes obturées à la 9^e génération. A côté de ces lésions fibrotiques, il a aussi été constaté des obstructions des voies aériennes cicatricielles sans accumulation de matrice extracellulaire (MEC) dans la lumière bronchiolaire. Il est important de signaler que dans les deux types d'obstructions sont segmentaires et que à distance des lésions de BO, les voies aériennes s'ouvrent de nouveau¹⁰⁷. L'hypothèse actuelle est que la BO résulte de microlésions répétées (pollution, infections bactériennes/virales/fongiques, RGO...) de l'épithélium

respiratoire résultant en une inflammation chronique, un processus de réparation lésionnelle, un recrutement et une activation excessive de myofibroblastes aboutissant *in fine* à l'oblitération de la lumière des petites voies aériennes périphériques (des voies aériennes plus larges peuvent être parfois touchées). Le tissu alvéolaire adjacent reste intact. Il a été observé une perte des glandes sous-muqueuses des voies cartilagineuses et une quasi-disparition des cellules basales (agissant comme progénitrices des cellules épithéliales) des voies aériennes en général. Une inflammation chronique, une accumulation de MEC sous-muqueuse, une hyperplasie des cellules musculaires sont souvent observées et au stade d'oblitération complète de la lumière, une destruction partielle de la couche originelle de muscles lisses peut être associée. Une angiogénèse aberrante peut aussi se développer dans et à côté des lésions de BO. L'axe amphiréguline-hyaluronane semble jouer un rôle important dans la réponse épithéliale lésionnelle. Deux études rapportent ainsi l'accumulation de ces protéines dans l'épithélium affecté des voies aériennes fibreuses. L'amphiréguline est un ligand de l'epidermal growth factor receptor (EGFR), qui induirait une augmentation de la capacité de prolifération, une hyperplasie muqueuse initiale et une altération de la différenciation ciliaire des cellules basales des voies aériennes. Le hyaluronane régule ensuite la réponse inflammatoire innée en relarguant cytokines, chimiokines et facteurs de croissance attirant principalement neutrophiles et macrophages^{108,109}. Alors que la réponse inflammatoire en réponse aux lésions devient hors de contrôle, des (myo-)fibroblastes de différentes sources (recrutement de fibrocytes du sang périphérique, développement de fibroblastes résidents et possiblement transition épithélio-mésenchymateuse) vont s'accumuler¹¹⁰⁻¹¹². Par ailleurs les lésions allo-immunes infligées à la microvascularisation des voies aériennes pourraient aussi jouer un rôle important qui reste à élucider de façon précise¹¹³.

b. Le syndrome restrictif d'allogreffe

La lésion caractéristique du RAS est la fibro-élastose alvéolaire (FEA) qui correspond à une oblitération alvéolaire fibreuse avec un dépôt majeur de fibres élastiques¹¹⁴. La localisation prédominante est sous-pleurale et paraseptale. De la même manière que dans le BOS, la FEA peut être secondaire à une infection virale/bactérienne ou à un rejet aigu dépendant des anticorps aboutissant à une séquence de lésions épithéliales et vasculaires, une exsudation intra-alvéolaire fibrineuse, une accumulation et une activation des macrophages, un échec de

la dégradation de la fibrine et finalement une FEA constituée¹⁰⁶. Certains motifs lésionnels histologiques semblent associés au RAS. Ainsi, Paraskeva et al. ont démontré que la pneumopathie organisée fibrinoïde aiguë, un type de lésion défini par une prolifération mésenchymateuse associée étroitement avec de la fibrine mais sans fibrose interstitielle, était associé à une diminution de la survie globale post-transplantation. Il apparaît plausible que la pneumopathie organisée fibrinoïde aiguë soit une lésion histologique précoce du RAS¹¹⁵. De même, la survenue tardive de lésions de dommage alvéolaire diffus, caractérisée par un dépôt de membranes hyalines adjacents aux parois alvéolaires, semble être associée à une augmentation de l'incidence du RAS¹¹⁶. En plus des macrophages, les cellules myéloïdes et lymphoïdes sont retrouvées abondamment à tous les stades de la FEA. Le chapitre qui suit traite spécifiquement du rôle de l'immunité dans la physiopathologie de la DCG mais il est important de noter ici un rôle probablement crucial de la réponse B dans le RAS caractérisée notamment par la présence de follicules lymphocytaires B, non retrouvés dans le BOS¹¹⁷. Cette implication des lymphocytes B est soutenue aussi par le fait que les ASD sont plus fréquemment retrouvés dans le RAS⁶². La FAE est souvent accompagnée de lésions de BO indiquant un chevauchement, au moins partiel du BOS et du RAS. Le nombre de voies aériennes affectées par de la BO est toutefois moins important dans les RAS que dans les BOS¹¹⁸.

2. Immunologie de la DCG

Les mécanismes immunopathologiques en cause dans la DCG ne sont que très partiellement élucidés mais des interactions complexes ont pu être mis en évidence entre l'immunité innée, adaptative et l'auto-immunité. La considération immunologique est d'autant plus importante dans le poumon qui est un organe qui présente un tissu lymphoïde abondant et qui est exposé à l'environnement extérieur et donc aux agressions infectieuses et toxiques. La stimulation du système immunitaire y est permanente⁴. En préambule, il est intéressant de citer de nouveau le travail de Vandermeulen et al avec une analyse immunohistochimique comparative d'explants pulmonaires BOS, RAS ou contrôles. Cette analyse a mis en évidence que les nombre de cellules T cytotoxiques et de cellules B étaient augmentées dans les explants BOS et encore plus dans les explants RAS ; que toutes les cellules myéloïdes, à l'exception des cellules dendritiques, étaient fortement présentes dans le RAS en comparaison des contrôles

et que les follicules lymphoïdes n'étaient présents que dans le RAS¹¹⁷. Cette observation témoigne d'une implication majeure du système immunitaire dans la DCG tardive avec une diversité immunologique en fonction du phénotype.

a. Immunité innée

Les neutrophiles ont une fonction physiologique de clairance de micro-organismes invasifs mais ils ont aussi un haut potentiel lésionnel du tissu pulmonaire¹¹⁹. Les mécanismes par lesquels ils peuvent causer ces dommages sont de plusieurs ordres : relargage d'espèces réactives d'oxygène, relargage de cytokines, activation d'enzymes hydrolytiques et de protéases, expression de métalloprotéases matricielles (MMP). Les neutrophiles sont généralement retrouvés élevés dans le LBA et le tissu pulmonaire de patients BOS et RAS et des taux élevés après transplantation sont corrélés avec une incidence plus élevée de la DCG, une baisse de la survie sans DCG et de la survie globale. L'importance des neutrophiles a été relevé avec l'émergence de la dysfonction d'allogreffe neutrophilique réversible. Cette atteinte est caractérisée par une neutrophilie des voies aériennes dépendante de l'IL-17 et par l'efficacité de l'utilisation de l'azithromycine pour améliorer la fonction respiratoire⁷¹. Dans ce schéma, l'IL-17 est capable d'induire la sécrétion d'IL-8, un puissant chemo-attracteur des neutrophiles, par différents types cellulaires (cellules épithéliales alvéolaires de type II, cellules épithéliales bronchiques et macrophages) après le relargage de cytokines pro-inflammatoires. Une corrélation entre l'IL-8 et le taux de neutrophiles dans les LBA a d'ailleurs été retrouvée dans plusieurs études¹²⁰. Par ailleurs, des patients ne répondant pas à l'azithromycine présentent des taux plus élevés d'IL-1 β et de cytokines pro-inflammatoires associées suggérant une voie différente de l'IL-17¹²¹.

Les éosinophiles sont des granulocytes traditionnellement définis comme un médiateur destructeur et cytotoxique notamment dans l'allergie, certaines maladies parasitaires et réactions médicamenteuses. Leur présence dans la zone péri-vasculaire a été associée avec le RAC³⁵. De la même manière que pour les neutrophiles, des taux élevés d'éosinophiles dans le LBA et dans le sang des receveurs sont associés à une incidence plus forte de la DCG et plus globalement à de moins bons résultats de la TP. Une étude récente a montré que la présence d'éosinophiles sur des biopsies transbronchiques était associée de façon indépendante à la

mortalité¹²². L'association semble d'autant plus forte avec le RAS qu'avec le BOS^{60,123}. L'action des éosinophiles serait pro-fibrotique en attirant les fibroblastes et en stimulant la sécrétion du TGF- β avec aussi un effet toxique sur les cellules épithéliales en augmentant la perméabilité membranaire et en induisant des dommages ciliaires. Cependant, une série travaux sur le modèle murin de transplantation mono-pulmonaire gauche a pu mettre en évidence que les éosinophiles étaient capables de réguler négativement la réponse immunitaire T et de jouer un rôle tolérogénique en l'absence d'immunosuppression. Cette régulation passe par la formation d'une synapse PD-L1/PD-1 entre des éosinophiles polarisés par des cytokines Th1 et les cellules T CD8+ et par une inhibition de l'association du récepteur des cellules T (TCR)/CD3, inhibition dépendante de l'oxyde nitrique synthase produit par les éosinophiles¹²⁴. Ces hypothèses n'ont pas été confrontées en condition clinique. Elles apportent cependant un contre point intrigant dans la compréhension des fonctions immuno-modulatrices des éosinophiles dans la DCG, probablement fortement dépendantes du microenvironnement¹²⁵.

Les macrophages résidents sont les cellules immunitaires les plus abondantes du poumon et jouent un rôle clé dans la défense de l'hôte et dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Une étude de 2016 a démontré que la population des macrophages alvéolaires (MA) était constituée à la fois de MA du donneur, qui persistaient jusqu'à deux ans après transplantation et de MA du receveur qui affluaient dans les semaines suivant la greffe¹²⁶. Le nombre absolu de macrophages dans le LBA ne semble pas modifié de façon importante en comparant les patients avec et sans DCG. Par contre, sur des analyses tissulaires, les macrophages semblent plus abondants dans le RAS et le BOS en comparaison de patients sans DCG ou contrôles non transplantés¹²³. Une étude récente montrait qu'après transplantation, l'espace alvéolaire était rapidement principalement peuplé de MA matures dérivés des monocytes du receveur. Ces macrophages étaient capables de prendre en charge des complexes peptide donneur – complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) donneur mais n'étaient pas capable d'induire une réponse allo-réactive à partir de cellules T circulantes du receveur¹²⁷. Une analyse transcriptomique sur cellule unique de LBA de patients présentant une dysfonction aiguë du greffon a pu associer à l'évènement deux phases de MA, l'une définie par des gènes stimulés par l'interféron et une autre par une inflammation dépendante de la métallothionéine, chacune contribuant à un environnement pro-inflammatoire. Ces mêmes phases de MA étaient aussi identifiées sur des explants pulmonaires avec DCG¹²⁸. Finalement, le rôle du microbiote

pulmonaire a été étudié à partir de LBA de patients transplantés pulmonaires. L'analyse a montré qu'une dysbiose bactérienne pouvait conduire à un profil inflammatoire ou un remodelage des macrophages alvéolaires¹²⁹.

Les cellules Natural Killer (NK) font partie de la première ligne de défense contre les cellules infectées ou transformées. Elles sont retrouvées augmentées dans les poumons des patients avec un BOS et activées dans le sang périphérique de ces mêmes patients¹³⁰. Une fois activées les cellules NK relâchent des molécules cytotoxiques (granzyme et perforine) et chimiotactiques (TNF- α et INF- γ) qui ont été retrouvées régulées positivement dans la DCG et qui vont engager les cellules T, incliner une réponse Th1, augmenter l'expression des CMH I et II et induire l'infiltration tissulaire par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. D'un autre côté, il a été suggéré, sur un modèle animal, que les cellules NK pouvaient favoriser l'acceptation du greffon par déplétion des cellules dendritiques dérivées du donneur¹³¹.

b. Immunité adaptative

i. *Immunité cellulaire*

L'immunité cellulaire est principalement conduite par les cellules T suivant la présentation d'allo-antigènes par des cellules présentatrices d'antigène *via* des molécules du CMH qui correspondent chez l'humain au HLA. Les gènes HLA sont hautement polymorphiques et les grandes différences interindividuelles dans les variants alléliques constituent la barrière immunologique principale en transplantation. Les voies canoniques du rejet en transplantation d'organe solide requièrent la présentation de peptides du donneur à des lymphocytes du receveur par 3 voies possibles : la voie directe dans laquelle les cellules présentatrices d'antigène du donneur présentent des peptides du donneur sur des CMH du donneur, la voie indirecte dans laquelle les cellules présentatrices d'antigène du receveur présentent des peptides du donneur sur des CMH du receveur et la voie semi-directe où les cellules présentatrices d'antigène du receveur présentent des CMH du donneur. Les CMH de classe I et II sont reconnus respectivement par les cellules T CD8+ et CD4+ qui, avec des signaux de co-stimulation secondaire, vont proliférer et se différencier¹³². Les cellules T CD8+ ont une activité cytotoxique. En parallèle, les cellules T CD4+ auxiliaires vont réguler la réponse

immunologique dont les différents sous-types ont des caractéristiques différentes allant d'une activité cytolytique, d'une activation de l'immunité innée ou d'autres cellules adaptatives à la propagation ou l'atténuation de l'inflammation. Les cellules T auxiliaires 1 (Th1) sont une source clé d'IL-2, d'IL-12, de TNF- α et d'IFN- γ qui conduisent une réponse immunitaire cytotoxique. Elles activent les macrophages et peuvent aussi causer des dommages directs sur l'allogreffe par une cytotoxicité dépendante de Fas/Fas ligand. Les cellules auxiliaires Th2 produisent une variété de cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) qui peuvent promouvoir l'immunité humorale¹³³. Une balance Th1/Th2 en faveur de Th2 et IL-10 semble diminuer le taux de rejets alors que des cellules Th2 peuvent l'accélérer en sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques tels que l'IL-6 et l'IL-13. Des réseaux complexes de chimiokines et de leurs récepteurs qui recrutent et activent une variété de leucocytes sont impliqués dans les processus inflammatoires aboutissant à la DCG. Nous pouvons citer CCR2/CCL2, CXCR2/ligand, CXCR3/ligand, et CCL5/RANTES¹²⁰. Les Th17 sécrètent l'IL-6, l'IL-17, l'IL-22 et le TNF- α , elles aident à lutter contre les pathogènes en recrutant les neutrophiles et les macrophages mais sont aussi associées à l'auto-immunité en cas de dérégulation ou de surproduction d'IL-6¹³⁴. Les cellules T régulatrices (Treg) ont un rôle important dans l'homéostasie immunitaire par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF- β) et des interactions cellulaires directes. Ces actions empêchent une réponse T effectrice excessive. En induisant la différenciation et l'activité de cellules T sécrétant l'IL-10, les Treg protègent aussi de l'auto-immunité. Dans les modèles animaux, les Treg semblent être capable de réduire la survenue de la DCG et d'induire une tolérance immunitaire. Chez les patients transplantés, une majorité d'études ont associé l'augmentation de la fréquence des Treg pulmonaires ou périphériques à une meilleure survie sans DCG^{135,136}. Notre équipe a cependant retrouvé des résultats inverses avec une fréquence augmentée de Treg périphériques chez les patients qui allaient développer un BOS¹³⁷. Les Th17 et les Treg proviennent des cellules T naïves stimulées par le TGF- β . C'est l'IL-6 qui va générer la différenciation Th17, en association avec le TGF- β en inhibant la différenciation Treg. L'IL-17 et l'IL-6 sont probablement également impliquées dans la DCG en activant les cellules endothéliales, les fibroblastes et en induisant une prolifération.

ii. Immunité humorale

Les anticorps et les cellules B allo-réactives jouent un rôle important dans la DCG. Les cellules T sont nécessaires pour la croissance et la maturation des lymphocytes B spécifiques d'antigènes qui vont produire des anticorps contre les antigènes non appariés du CMH ou d'histocompatibilité mineure. La présence d'ASD est fortement corrélée avec la DCG par le biais de réponses allo-immunes dépendantes de l'activation du complément ou non. Les anticorps anti-HLA peuvent de plus induire la sécrétion de facteurs de croissance fibrotique comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance IGF1 et le TGF- β . Les cellules B peuvent contribuer ou limiter le développement de la DCG par leur régulation de l'immunité cellulaire T. Les cellules B influencent la réponse cellulaire T en améliorant la présentation d'antigènes, la co-stimulation, la production de cytokines ou par l'induction d'une accommodation ou d'une tolérance¹³⁸. Une étude récente a montré une augmentation des cellules B périphériques chez des patients BOS avec une augmentation des cellules B mémoires et une diminution des cellules B naïves et transitionnelles¹³⁹. L'étude histologique de Vandermeulen et al. a montré de même une infiltration de cellules B importante dans les explants BOS et surtout RAS avec présence de follicules lymphoïdes¹¹⁷. A côté ce rôle délétère, des sous-types lymphocytaires B spécifiques semblent impliqués dans la promotion de la tolérance du greffon, ces cellules immunosuppressives sont appelées cellules B régulatrices⁴³. C'est surtout à partir de l'étude des patients greffés rénaux et hépatiques présentant une tolérance opérationnelle (fonction stable du greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur de maintenance) que ces cellules ont été étudiées en transplantation¹⁴⁰. La tolérance opérationnelle n'est pas observée dans le cadre de la transplantation pulmonaire, cependant, notre équipe a démontré qu'une population spécifique de cellules B dites transitionnelles CD24^{hi}CD38^{hi} exprimant CD9+ et sécrétant l'IL-10 était associée à la tolérance à long terme du greffon¹⁴¹. Une autre étude italienne retrouvait en analyse multivariée que la présence de cellules B CD19+ CD24^{hi}CD38^{hi} était inversement corrélée à la survenue d'une DCG¹⁴². Les cellules B sont ainsi considérées aujourd'hui comme des médiateurs centraux de la régulation immunitaire.

iii. Auto-immunité

Des arguments existent aujourd'hui pour affirmer que l'allo-immunité n'est pas seulement dirigée contre le système HLA mais aussi des antigène non HLA et des auto-antigènes

suggérant un rôle de l'auto-immunité dans la DCG. Le collagène V (Col V) et la tubuline K-alpha 1 (K α 1T), deux auto-antigènes prédominants, sont des composants des petites voies aériennes et ne sont normalement pas exposés au système immunitaire de l'hôte. Le Col V est présent dans l'épithélium bronchique et dans les tissus périvasculaire et péribronchique. C'est une protéine immunogénique qui masque efficacement ses épitopes du système immunitaire. Cependant, les lésions de l'allogreffe (*e.g.* ischémie-reperfusion, infection) peuvent permettre de faciliter l'exposition de ces protéines antigéniques du poumon donneur et entraîner le relargage d'auto-antigènes sous formes d'antigène solubles, d'exosomes ou de corps apoptotiques. Leur détection et leur présentation par les cellules présentatrices d'antigènes amène ensuite la propagation d'une réponse auto-immune médiée par l'axe Th17. A l'initiation de ce processus les MMP-9 et MMP-2 jouent possiblement un rôle dans le clivage de Col V notamment. Une association forte a été retrouvée entre les auto-anticorps anti Col V et K α 1T et la DCG en l'absence d'anticorps anti-HLA classique. Il a été aussi suggéré que les lésions du greffon induites par les auto-anticorps pouvaient être responsables de la génération *de novo* d'ASD¹⁴³.

c. Médiateurs du processus fibrosant

La dérégulation de la réparation épithéliale des voies aériennes et le remodelage tissulaire sont des éléments clés de la physiopathologie de la DCG¹⁴⁴. Des lésions épithéliales répétées ou persistantes allergiques, infectieuses, auto-immunes ou toxiques amènent à une perte de l'intégrité épithéliale et une réparation altérée. Un déséquilibre entre des cytokines pro et anti-inflammatoires entraîne une réponse fibroblastique excessive et un remodelage de la MEC aboutissant à une fibrose des petites voies aériennes ou du parenchyme pulmonaire. Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans ces mécanismes et peuvent être sécrétés par les cellules épithéliales, les fibroblastes ou les cellules inflammatoires¹⁴⁵. Le TGF- β joue un rôle clé dans ce processus en induisant la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes¹⁴⁶. Les métalloprotéases matricielles (MMP) peuvent être sécrétés par les cellules de l'épithélium bronchique et du parenchyme. Elles sont capables de dégrader les protéines de la MEC, de cliver le collagène, sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose. Des taux augmentés de MMP (MMP-2, -3, -7, -8 et -9) ont été retrouvés dans le LBA de patients et dans des cellules épithéliales de patients avec BOS.

L'activité des MMPs pourraient faciliter le renouvellement incontrôlé de la MEC et le remodelage tissulaire¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Les neutrophiles sont aussi une source possible de MMPs dans le cadre de la DCG et les études sus-cités ont aussi retrouvé une corrélation entre les taux de MMP-8 et MMP-9 et la neutrophilie du LBA de patients BOS.

Parmi les autres protéines impliquées dans le remodelage associé à la DCG on retrouve dans la littérature la kinase hépatique B1 qui active la protéine kinase adénosine monophosphate et régule la croissance, la polarité, le métabolisme cellulaire et l'autophagie. Cette protéine inhibe la fibrose tissulaire et une étude a démontré qu'elle était régulée négativement chez les patients BOS¹⁵⁰. Finalement, une étude récente a retrouvé des niveaux d'expression plus élevés dans le tissu pulmonaire et dans des LBA du facteur de croissance CTGF, médiateur impliqué dans la fibrose pulmonaire idiopathique, chez des patients BOS et RAS en comparaison de patients stables¹⁵¹.

III. Transglutaminase 2

Dans cette partie je vais présenter la transglutaminase 2 (TG2), sa famille protéique, sa structure et fonction et son rôle dans la fibrose pulmonaire et ces autres actions en pneumologie. C'est une protéine pléiotropique et multifonctionnelle, c'est la protéine la plus représentée et la plus étudiée de sa famille que je vais décrire ci-dessous. Elle présente notamment la capacité de réaliser des liaisons croisées covalentes entre protéines et semble jouer un rôle central dans la stabilisation de la matrice extracellulaire, élément clé du processus de fibrose. La transglutaminase 2 n'a jamais été directement étudiée dans le cadre de la transplantation pulmonaire et du contexte plus spécifique de la DCG. Je vais décrire aussi ses autres fonctions cellulaires et son rôle identifié dans certaines pathologies pulmonaires notamment le cancer et la fibrose pulmonaire idiopathique. Certains éléments de la physiopathologie de ces maladies peuvent se rapporter à ce qui se passe dans la DCG et me permettent de faire l'hypothèse d'un rôle important de la TG2 dans les mécanismes associés à la DCG.

A. La famille des transglutaminases

Les différentes transglutaminases sont des protéines qui ont des structures et des fonctions communes capables de catalyser la modification post-translacionnelle dépendante du Ca^{2+} en introduisant des liaisons covalentes entre des groupes d'amines libres et des groupes γ -carboxamides de peptides liés à des glutamines¹⁵². Les produits ainsi liés sont très résistants aux tensions mécaniques et dégradation protéolytique et on retrouve une accumulation de ces produits dans nombres de tissus ou de processus où cette propriété est importante comme dans la peau, les poils, les phénomènes de cicatrisation ou de thrombose. Les associations protéiques oligomériques ou polymériques impliquent souvent des forces chimiques purement secondaires (e.g. liaison hydrogène ou ionique) et même si l'assemblage ou le désassemblage de protéines peuvent être régulés par des modification post-translacionnelles comme la phosphorylation/déphosphorylation, les liaisons impliquées dans ce cas ne sont pas covalentes. C'est en fait l'analyse moléculaire des phénomènes de thrombose et de coagulation qui ont permis de mettre en évidence l'existence d'une voie alternative à l'assemblage protéique supramoléculaire dépendante des transglutaminases¹⁵³. C'est en 1957 que la première transglutaminase, connue maintenant sous le nom de transglutaminase 2, a été identifiée pour sa capacité à incorporer des amines primaires de bas poids moléculaires dans des protéines¹⁵⁴. Depuis cette découverte, d'autres protéines avec cette capacité ont été identifiées à partir de différents types d'organismes vivants dont 9 chez l'humain¹⁵⁵. Ces protéines présentent des fonctions biologiques très variées dont certaines ne sont pas d'ordre catalytique. Elles peuvent avoir une fonction d'échafaudage, de maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire, de régulation de l'adhésion cellulaire et de modulation du signal de transduction. Elles partagent toutes (sauf une, la bande 4-2) une séquence identique d'acides aminés sur le site actif (YGQCWVFA) où le résidu cystéique catalytique fait partie du motif requis pour la réaction de transamidation. Nous allons décrire ci-dessous brièvement les caractéristiques des différentes transglutaminases, en terminant par la transglutaminase 2, la plus largement distribuée et la plus étudiée.

1. Transglutaminase 1

La transglutaminase 1 (TG1) ou transglutaminase kératinocytaire est exprimée dans l'épithélium squameux stratifié de la peau, du tractus digestif supérieur et de l'appareil génital féminin inférieur. L'activité catalytique de la TG1 peut être induite par des taux élevés de Ca^{2+} ,

par un clivage protéolytique et par une interaction avec la tazorotène-induced gene 3. Les esters de phorbol induisent et l'acide rétinoïque réduit l'expression de TG1. L'ichtyose lamellaire est une maladie génétique autosomale récessive résultant de plusieurs mutations du gène de la TG1. Les patients porteurs présentent une cornification anormale de l'épiderme avec une activité TG1 drastiquement réduite et l'absence de protéine TG1 détectable.

2. Transglutaminase 3

La transglutaminase 3 (TG3) ou transglutaminase épidermique est présente dans les follicules pileux, dans l'épiderme et dans le cerveau. La protéine TG3 est encodée comme deux chaînes polypeptidiques dérivées d'une seule protéine précurseure par protéolyse. La TG3 se lie et hydrolyse la guanosine 5'-triphosphate (GTP). Elle catalyse la liaison croisée des filaments intermédiaires de la trichohyaline et de la kératine afin de solidifier la partie interne de la racine des follicules pileux, nécessaire à la morphogénèse des fibres des poils. La TG3 participe aussi à la formation de l'enveloppe cellulaire à des stades plus tardifs de la différenciation¹⁵⁶.

3. Transglutaminase 4

La transglutaminase 4 (TG4) ou transglutaminase prostatique est retrouvée chez l'humain en condition physiologique dans la glande prostatique, dans le fluide prostatique et dans le plasma séminal mais aussi dans la salive, la fraction vésiculaire de l'urine et le muscle squelettique. En condition pathologique, la TG4 est fréquemment exprimée dans le cancer de la prostate et a été retrouvé dans le cancer du sein. C'est aussi un auto-antigène dans le syndrome auto-immun poly-endocrinien de type 1. Dans ce dernier, la TG4 participerait à une prostatite responsable d'une infertilité masculine. Les rôles précis de la TG4 restent cependant controversés. Une étude récente rapporte une activité transamidase faible de la TG4 et son incapacité à lier les nucléotides guanines¹⁵⁷.

4. Transglutaminase 5

La transglutaminase 5 est principalement exprimée dans les kératinocytes du prépuce, dans la barrière épithéliale et dans les muscles squelettiques. L'adénosine triphosphate (ATP) et la GTP inhibent la capacité de réaliser des liaisons croisées de la TG5 alors que le Ca^{2+} reverse cette inhibition. Des isoformes épissées de la TG5 ont été décrites : delta3, delta11 et delta3-delta11 (avec délétion de l'exon 3 ou 11 respectivement) qui présentent des niveaux de plus faible activité par rapport à la forme complète. La TG5 réalise des liaisons croisées de la locrine, de l'involucrine et de la SPR3 dans l'épiderme et participe à l'hyperkératose retrouvée dans l'ichtyose et le psoriasis. Les mutations d'inactivations du gène de la TG5 entraînent le skin peeling syndrome¹⁵⁸.

5. Transglutaminase 6 et 7

L'expression de la transglutaminase 6 (TG6) est localisée chez l'humain dans le poumon et le testicule. Chez la souris, on la retrouve dans le cerveau. *In vitro* des cellules humaines carcinomateuses avec des caractéristiques neuronales expriment aussi TG6. La fonction catalytique de la TG6 est activée un clivage protéolytique d'une pro-enzyme et la TG6 comprend deux polypeptides qui proviennent d'un seul précurseur¹⁵⁹.

L'expression de la transglutaminase 7 est aussi restreinte au poumon, au testicule et au cerveau. Peu de données existent sur la régulation et la fonction du gène de la transglutaminase 7.

6. Facteur XIIIa

Le facteur XIIIa (FXIIIa) ou la transglutaminase du plasma est un composant important de la cascade de coagulation du sang. Il est retrouvé dans les plaquettes, le plasma, les astrocytes, les macrophages, les cellules dendritiques dermales, les cellules de la lignée des ostéoblastes, les chondrocytes, le placenta, le liquide synovial, le cœur et les yeux. Le FXIIIa est le dernier zymogène activé dans la cascade de coagulation. C'est un hétérotétramère composé de deux sous-unités A, où se situe le site catalytique et B qui a la fonction de protéine porteuse. Suivant l'activation par le clivage dépendant de la thrombine, la sous-unité A se dissocie de la sous-unité B rendant l'enzyme active. En présence de Ca^{2+} , l'enzyme catalyse les liaisons croisées

de molécules de fibrines pour stabiliser les caillots de fibrines¹⁵³. FXIIIa joue aussi un rôle dans l'inflammation et dans la synthèse osseuse. La déficience en FXIIIa est une maladie autosomale récessive qui se caractérise par une hémophilie et une altération de la cicatrisation^{160,161}.

7. Protéine érythrocytaire de membrane band 4.2

La protéine band 4.2 (band 4.2) est la seule transglutaminase qui ne possède pas d'activité catalytique en lien avec la substitution du résidu cystéine par l'alanine au sein du site actif de la bande 4.2. Cette protéine est surtout présente dans les érythrocytes, la moelle osseuse, le foie fœtal et la rate. La band 4.2 est un composant majeur du cytosquelette de la membrane des érythrocytes et joue un rôle important dans l'intégrité membranaire et la régulation de la stabilité cellulaire¹⁶². La plupart des tissus expriment des formes multiples de transglutaminases qui partagent des substrats communs. Cette constatation est peut-être l'explication que les membres de la famille des transglutaminases compensent pour la perte d'une enzyme individuelle¹⁶³.

B. La transglutaminase 2

De tous les membres de la famille des transglutaminases, la transglutaminase 2 (TG2) est celle qui à l'expression la plus ubiquitaire et qui a été le plus étudiée. En plus de sa fonction de transamidation, il a été montré que la TG2 a la capacité de se lier et d'hydrolyser la GTP et l'ATP, que sous forme liée à la GTP/guanosine diphosphate (GDP), elle peut fonctionner comme une protéine G transduisant un signal à partir de récepteurs α 1-adrénergique, ocytocine et thromboxane. La TG2 peut aussi avoir une fonction de protéine disulfide isomérase, de protéine kinase, d'hydrolase d'ADN et de protéine d'échafaudage¹⁶⁴. La TG2 est trouvée de façon prédominante dans le cytosol mais est présente aussi dans le noyau, les mitochondries, la membrane plasmique et la MEC. Nous détaillons dans les paragraphes suivants la structure et les principales fonctions de la TG2.

1. Structure

La multifonctionnalité de la TG2 dépend de ses caractéristiques structurales. La TG2 comprend 4 domaines : un domaine NH₂-terminal β -sandwich (aa 1-140, contenant les sites de liaisons à l'intégrine et la fibronectine), le noyau catalytique (aa 141-460) et deux domaines COOH-terminal β -barrel (aa 461-586 et 587-687). Le site de l'activité transamidase est constitué d'une triade de protéases cystéine : cystéine 277, histidine 335, aspartate 358. A l'opposé du tunnel catalytique, deux résidus tryptophane (W241 et W332) sont responsables de la stabilisation de l'intermédiaire enzyme-thiol (voir paragraphe suivant) formé durant la catalyse. L'arrangement spatial des 4 domaines est modifié par des interactions avec des cofacteurs. Ainsi la liaison avec la GTP/GDP entraîne une interaction importante entre le domaine catalytique et les domaines 3 et 4 rendant la TG2 en une conformation fermée ou compacte (figure 7) réduisant de fait l'accès et l'activité du site catalytique dépendant du Ca²⁺. A l'inverse, la liaison au calcium modifie la conformation en déplaçant et séparant les domaines 3 et 4 autorisant ainsi une conformation ouverte avec exposition du site catalytique¹⁵².

2. Fonctions biochimiques

a. Transamidation/déamidation

Le mécanisme de cette réaction catalytique se déroule en deux étapes. Tout d'abord, le sulfure du site actif cystéine (C277) réalise une attaque nucléophile sur le γ -carbone du peptide lié à la chaîne glutamine latérale (qui est le donneur acyl) et forme un lien thioester entre le substrat et le C277. A la deuxième étape, le lien thioester est attaqué par une amine primaire (la réaction consiste alors en une transamidation) ou de l'eau (la réaction s'appelle dans ce cas déamidation) (figure 6) La réaction de transamidation a deux conséquences possibles, l'addition d'une petite amine à la protéine si le groupe d'attaque est une petite amine primaire (réalisant dans ce cas une modification post translationnelle) ou la formation d'un lien isopeptidique entre des peptides acyl donneur et acyl récepteur. Les liens isopeptidiques sont résistants aux forces perturbatrices chimiques et physiques et peuvent avoir ainsi une fonction potentielle de stabilisation de la MEC et d'empêcher le relargage du contenu intracellulaire de cellules apoptotiques au milieu extracellulaire¹⁶⁵. La réaction de déamidation n'a qu'un résultat possible : la conversion d'un résidu glutamine donneur acyl en un résidu glutamate. Plus de 150 substrats de la fonction de transamidation de la TG2 sont listés à ce jour. Ils

peuvent être catégorisés en substrats cellulaires et extracellulaires endogènes et en substrats exogènes d'origine alimentaire, virale ou fongique^{166,167}.

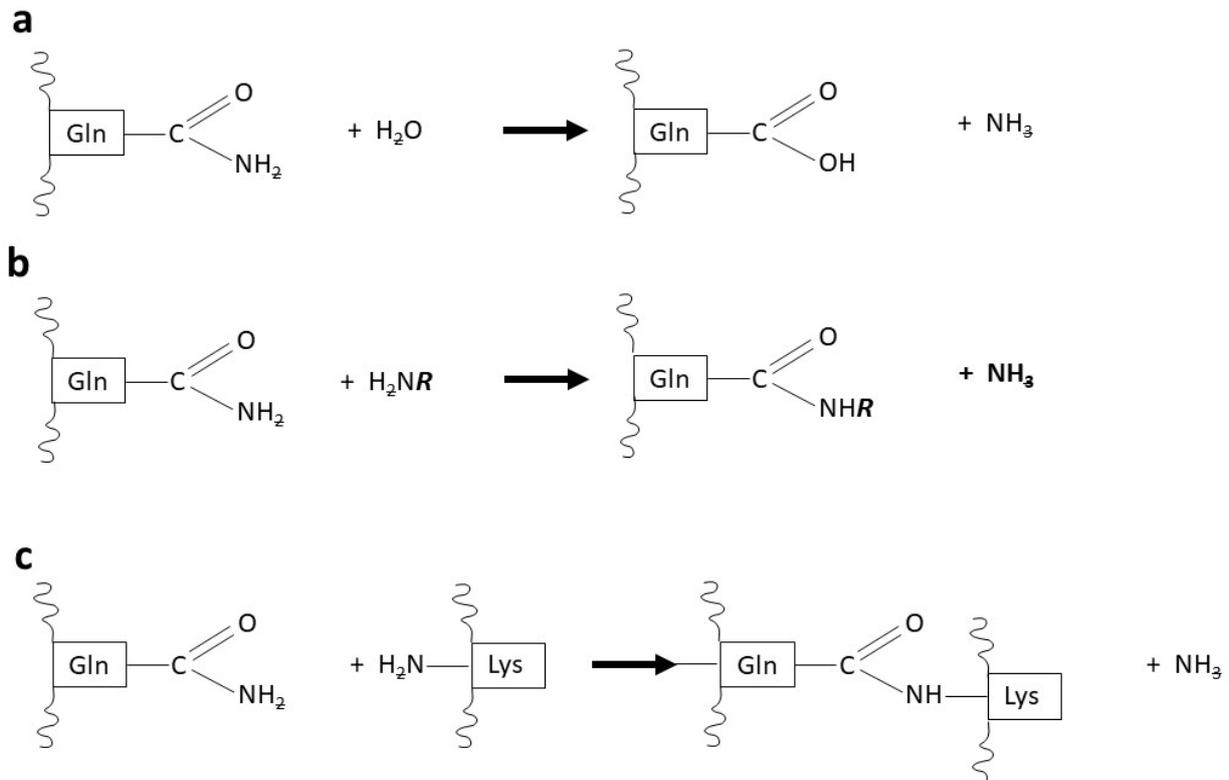


Figure 6. Réactions catalysées par l'activité transamidase de la TG2. (a) TG2 peut utiliser une molécule d'eau comme un acyl-accepteur pour déaminer résidu glutamine lié à un peptide et le convertir en un résidu glutamate. (b) Quand une amine primaire (H_2NR) agit comme un acyl-accepteur, le résidu glutamine est modifié aboutissant à une modification post translationnelle. (c) Un lien isopeptide se forme quand un group ϵ d'un peptide lié à une lysine est l'acyl-accepteur aboutissant à une liaison croisée entre 2 protéines. (d'après Gundemir et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012)

b. GTPase/ Protéine G

La TG2 a la capacité de se lier et d'hydrolyser la GTP. La liaison de la TG2 au Ca^{2+} est compétitive de la liaison à la GTP et cette dernière inhibe la fonction de transamidation de la TG2¹⁶⁸. La TG2 est la sous-unité α fonctionnelle d'une protéine G qui peut s'associer avec un récepteur α 1-adrénérique, portant le signal à la phospholipase C- δ 1. Il a aussi été montré que la TG2 pouvait interagir avec les récepteurs TP α thromboxane A2 et ocytocine^{169,170}. Il existe un ratio intracellulaire moyen GTP/ Ca^{2+} (environ $150\mu\text{M}/100\text{nM}$) qui permet de maintenir la TG2 comme transamidase dans un état latent. La perte de la capacité de liaison

de la TG2 à la GTP (par mutation sur un seul site ou pour des variants d'épissage) rend l'enzyme plus proapoptotique. Des isoformes différentes de la TG2 peuvent aussi jouer des rôles opposés dans la différenciation cellulaire. Par exemple, la forme courte de la TG2 (présentant une capacité de liaison défectueuse à la GTP) induit la différenciation des cellules neuroblastiques alors que la forme longue l'inhibe ¹⁷¹.

Les activités transamidases et GTPase sont étroitement régulées par la disponibilité du Ca^{2+} et de la GTP. En conséquence, la transamidation est probablement largement inactive dans le compartiment intracellulaire comme le montre les travaux sur la conformation de l'enzyme à l'intérieur des cellules. A l'inverse on pourrait s'attendre à une activité catalytique importante en contexte extracellulaire où il n'y a virtuellement pas de nucléotide guanine. Ce n'est cependant pas ce qui est constaté par l'expérimentation. L'activité de transamidation apparaît inactive sauf en cas de stress chimique ou physique. D'autres mécanismes de régulation de l'activité catalytique de la TG2 existe donc probablement, en dehors du Ca^{2+} et des nucléotides guanines. La liaison de la TG2 à la GTP ou à la GDP entraîne une conformation fermée incapable de catalyser la transamidation. La terminaison C se replie sur elle-même et bloque l'accès du substrat au site actif de transamidation (figure 7). A l'inverse une augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} réduit l'affinité de liaison de la TG2 pour la GTP/GDP entraînant une conformation ouverte exposant le site actif¹⁷² et rendant l'enzyme capable de catalyser les réactions protéiques de liaisons croisées. En ce sens, l'état redox de l'environnement pourrait être important aussi dans la régulation de l'activité TG2. Il a été effectivement observé que la formation, dans un environnement moins oxidant, de certains ponts disulphides intramoléculaires était associé à une inactivation de la TG2, même en présence de Ca^{2+} ¹⁷³. En clair, à l'état réduit la TG2 serait active et à l'état oxydé, inactive. Les autres facteurs agissant sur l'état de la TG2 extracellulaire sont l'oxyde nitrique et les thiol réductases.

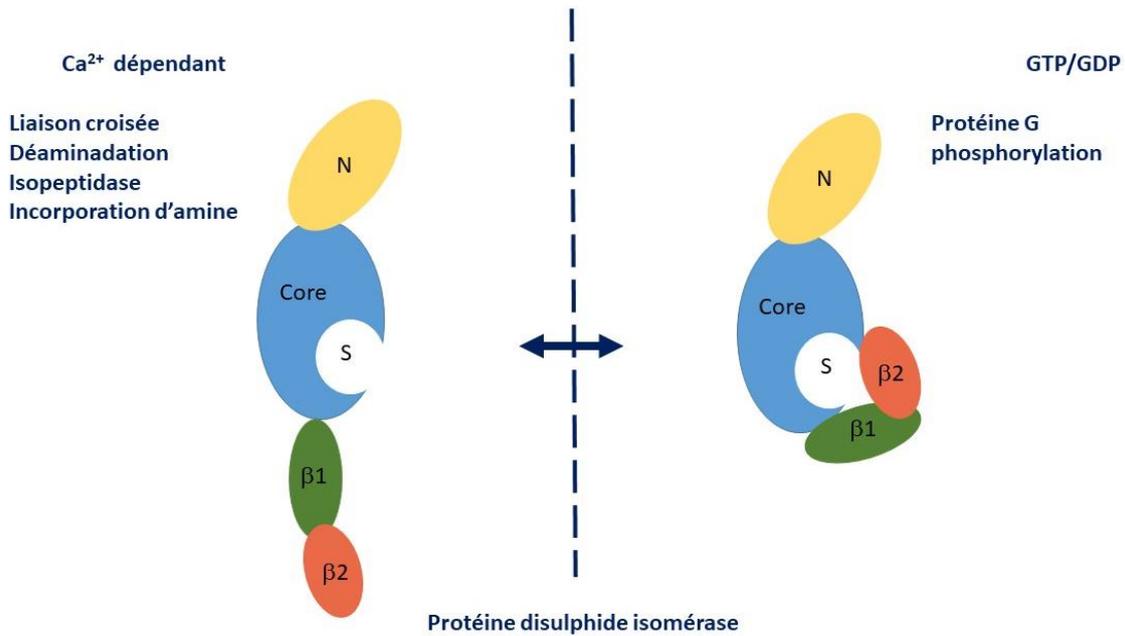


Figure 7. Relation structure-fonction de la TG2. La TG2 est composé d'un domaine N-terminal β -sandwich (N), d'un noyau catalytique (Core) contenant le site actif (S) et de deux domaines C-terminal β -barrel ($\beta 1$ et $\beta 2$). La TG2 peut avoir une conformation "ouverte" liée au Ca^{2+} avec un site catalytique accessible pouvant réaliser la fonction de transamidation et une conformation fermée, liée à un nucléotide guanine (GTP/GDP) avec un site catalytique incompétent. Les activités de transamidation et GTPase sont régulées par la disponibilité du calcium et de la GTP.

c. Fonction kinase

C'est à partir de 2004 que des preuves d'une activité ATPase indépendante du Ca^{2+} ont été rapportées par Mishra et al avec la mise en évidence tout d'abord d'une capacité de la TG2 à phosphoryler l'insulin-like growth-factor binding protein 3, puis les histones, la protéine p53 et la protéine du rétinoblastome¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Il est cependant à noter que la question de l'existence d'une activité kinase *in vivo*, et le cas échéant de son importance physiologique en condition normale restent ouvertes¹⁷⁷.

d. Fonction isomérase disulphide et régulation mitochondriale

La fonction isomérase disulphide est en comparaison de l'activité kinase, mieux établie. Cette fonction est indépendante du site actif cystéine de transamidation, elle ne requiert pas de Ca^{2+} et n'est pas inhibée par les nucléotides, ce qui suggère une action probablement plutôt

cytosolique. L'activité isomérase disulphide a notamment été démontré *in vivo* à partir d'études se focalisant sur la TG2 mitochondriale où il était constaté une baisse en lien disulphides du contenu de complexes respiratoires mitochondriaux issus de tissu de souris TG2^{-/-} ainsi qu'une diminution du taux d'ATP dans les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses de cette même souche de souris^{178,179}. Une étude a démontré la capacité d'interaction de la protéine mitochondriale adenine nucleotide translocator 1, une protéine importante de la fonction mitochondriale, avec la TG2 et pourrait être un substrat à la fois pour l'activité de transamidation et d'isomérase disulphide¹⁸⁰. Il est à noter que dans la majorité des cellules la TG2 se situe à la membrane externe mitochondriale et dans l'espace interne de la membrane.

e. Régulation de l'expression de la TG2

L'expression du gène *TGM2* est régulée par différents types d'évènements cellulaires incluant l'apoptose, les infections virales, le stress du reticulum endoplasmique, l'hypoxie/ischémie, l'inflammation et le cancer. La médiation se fait aussi par de multiples facteurs et cytokines comme l'acide rétinoïque, les lipopolysaccharides, le TGF- β , le NF- κ B, les glucocorticoïdes, l'IL-1, l'IL-6, l'hypoxia-inducible factor (HIF)-1, le TNF- α et l'epidermal growth factor¹⁸¹. L'acide rétinoïque est un inducteur bien identifié de l'expression de la TG2 agissant via l'hétérodimère retinoid acid receptor/retinoid X receptor et le facteur de transcription Sp1¹⁸². L'expression de TG2 est régulé positivement dans les cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie et à haut potentiel métastatique. Le promoteur de *TGM2* contient des éléments de réponse à l'inflammation et l'hypoxie, caractérisant l'environnement des tumeurs malignes. De plus, n-Myc et c-Myc participe à la régulation de TG2 en recrutant la protéine histone déacétylase 1 au promoteur de *TGM2*. Il est intéressant de noter que dans les cellules cancéreuses, les effets antiprolifératifs des inhibiteurs de l'histone déacétylase sont altérés par l'induction d'ARNm TG2 et de son expression protéique suggérant un rôle de la TG2 dans la résistance des cellules cancéreuses¹⁸³. Le promoteur de *TGM2*, contient un élément de réponse au TGF- β . En condition *in vitro*, la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF- β est associée à une augmentation de l'expression de la TG2 et TG2 contrôle la maturation et l'activité de TGF- β . Dans les fibroblastes, TG2 a la capacité d'induire l'ARNm de TGF- β et son expression protéique via la signalisation NF- κ B¹⁸¹.

3. Fonction physiologique cellulaire

a. Survie/mort cellulaire

La TG2, en fonction du contexte peut agir comme une protéine favorisant la survie ou la mort cellulaire. La TG2 peut moduler la mort cellulaire programmée en passant par le processus dépendant de la caspase, par l'apoptose mais aussi par l'autophagie¹⁸⁴.

La TG2 peut moduler la mort programmée dépendante de la caspase¹⁸⁵. Il a été aussi démontré sa capacité à induire le lâchage d'apoptosis inducing factor par les mitochondries de cellules adénocarcinomeuses pancréatiques et déclencher ainsi une apoptose indépendante de la caspase¹⁸⁶. Un autre rapport suggère que la TG2 serait nécessaire pour la maturation des autophagosomes¹⁸⁷. Au niveau neuronal, des études ont identifié que la TG2 facilitait la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives. Un point d'incertitude est le caractère délétère ou non de la TG2, sa régulation positive dans le contexte de lésion ischémique cérébrale semblerait plutôt indiquer un rôle protecteur¹⁸⁸.

Les mécanismes précis par lesquels agit la TG2 sont complexes, spécifiques de l'environnement et ne restent que partiellement compris. Cependant, deux voies d'actions ont été bien décrites et semblent fortement exploitées par la TG2 pour contrôler les processus de mort/survie cellulaire : (1) médiation des contacts entre les cellules et la MEC, déclenchant ainsi les signaux de survie cellulaire ; (2) contrôle direct ou indirect de l'activité de facteurs de transcription¹⁶⁴.

b. Interaction avec la surface cellulaire et la MEC

La TG2 peut être relâchée dans le milieu extracellulaire via des exosomes en condition de stress cellulaire, soit attachée à la membrane soit associée à la MEC¹⁸⁹. La TG2 va pouvoir modifier de façon covalente les protéines de la MEC, comme la fibronectine, pour former des homo- ou des hétérodimères qui vont augmenter la stabilité de la matrice. Les liaisons croisées augmentent la rigidité de la fibronectine ou celle des fibrilles de collagènes^{190,191}. L'augmentation de la rigidité de la MEC a pour conséquences l'augmentation de l'adhésion des fibroblastes et des ostéoblastes, la survie, la croissance, la migration et la différenciation

cellulaire en jouant sur les voies de mécano-détection liées aux intégrines¹⁹². Il a été aussi observé que l'adhérence des cellules endothéliales au fibrinogène α C lié par la TG2 augmentait le regroupement de l'intégrine et la formation d'adhésions focales (et par là même, augmentant l'activation de la focal adhesion kinase (FAK) et de l'extracellular signal regulated kinase (ERK). La fibronectine est le principal collaborateur de la TG2 dans la MEC mais ce n'est pas le seul et la TG2 peut interagir directement avec 3 sous-unités β de la famille des intégrines. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires importants de l'adhésion et de signalisation, ils sont activés en se liant à la MEC. Plus précisément, alors que la liaison intégrine-fibronectine réalise une interaction faible, la TG2 est capable de former des complexes ternaires avec la fibronectine et l'intégrine β 1 qui augmentent cette interaction. Ces complexes sont clairement impliqués dans l'adhésion cellulaire et la migration¹⁹³ et d'autres part, ont la capacité d'activer les voies de signalisations FAK et la voie de survie d'aval PI3K/Akt ou la voie RhoA. Il est important de noter que ces fonctions « d'échafaudage » ne sont pas dépendantes de l'activité transamidase ou GTPase. La relation entre TG2 et les intégrines serait aussi importante dans le processus de phagocytose des macrophages, notamment pour l'engloutissement des cellules apoptotiques¹⁹⁴.

La TG2 interagit aussi avec le TGF- β qui est un régulateur clé du remodelage de la MEC, impliquant les intégrines et les protéases et est influencé par le stress mécanique et l'environnement oxydatif. La TG2 est capable d'augmenter l'expression de TGF- β en activant la voie NF- κ B, augmentant ainsi la synthèse et la déposition de protéines de la MEC¹⁹⁵. Une boucle d'activation positive entre la TG2 et le TGF- β semble ainsi exister. La liste des autres protéines pour lesquelles une interaction avec la TG2 extracellulaire a été constatée est longue : collagène, vitronectine, ostéopontine, nidogène, laminine, osteonectine, osteocalcine, fibronectine α , fibronectine γ , substance p, endostatine, héparine, syndecan-4, amyloïde β -peptide, MMP-2, PDGFR et VEGFR-2.

L'effet de l'attachement de la TG2 à la fibronectine sur la migration cellulaire semble dépendre du contexte. La TG2 augmenterait ainsi le caractère invasif et la capacité métastatique de certaines cellules cancéreuses mais aussi la migration de cellules inflammatoires.

c. Régulation transcriptionnelle

Bien que la TG2 soit majoritairement présente dans le cytosol, sa présence dans le noyau est bien documentée et elle semble pouvoir augmenter sous l'effet de certains facteurs de stress comme la sphingosine, la maïtoxine ou l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire^{196,197}. La conséquence fonctionnelle évidente de cette accumulation nucléaire de la TG2 est une régulation transcriptionnelle par cette dernière. Par exemple, elle peut interagir avec HIF1 β et inhiber la transcription dépendante de HIF avec un effet protecteur sur des modèles d'hypoxie. La TG2 a aussi la capacité de se lier au facteur de transcription Sp1 et l'inhiber. La TG2 semble aussi jouer un rôle direct sur l'expression de la MMP-9, avec des résultats contradictoires dans la littérature où dans certains cas la surexpression de TG2 inhibait l'expression de MMP-9 et son activité¹⁹⁸ alors que sur une lignée de cellules pulmonaires cancéreuses la TG2 semblait être nécessaire à l'augmentation de l'expression de la MMP-9¹⁹⁹. Nous avons déjà évoqué la régulation indirecte par la TG2 cytosolique de la voie NF- κ B. Elle est aussi capable de réguler l'activité d'un autre facteur de transcription : cAMP-response element-binding protein (CREB)²⁰⁰.

La TG2 et les autres membres de la famille des transglutaminases sont multifonctionnels, comprennent de nombreuses isoenzymes et variants d'épissages. Une compréhension globale des fonctions dans des événements physiopathologiques divers est de ce fait difficile à atteindre. Le rôle de la TG2 dans la mort cellulaire et la survie reste controversé. Cependant, la TG2 semble généralement impliquée dans les effets positifs de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et dans l'induction de la fibrose. En condition cellulaire normale, sans stress, à des concentrations de Ca^{2+} basse et de GTP élevée, la conformation fermée de la TG2 permet une activité GTPase, isomérase disulphide et kinase indispensable à l'homéostasie et la survie cellulaire. Au contraire, dans des conditions de stress cellulaire avec des concentrations calciques élevées, la conformation ouverte permet l'activité de liaisons croisées et sa relocalisation à la membrane et le relargage en extracellulaire. Après un événement inflammatoire ou de mort cellulaire, la TG2 est sécrétée dans l'espace extracellulaire et participe à l'augmentation de la fibrogénèse. La stabilisation de la MEC et l'activation soutenue du TGF- β mènent au développement de la fibrose associée à la dysfonction d'organe¹⁸¹.

C. La TG2 dans le poumon

1. Cancer pulmonaire

De nombreuses études *in vitro* sur des lignées de cellules tumorales pulmonaires humaines ont précisé le rôle de la TG2 dans le processus tumoral malin. Ainsi, Park et al ont pu mettre en évidence sur la lignée A459 que l'inhibition de la TG2 permettait d'empêcher le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induit par le TGF- β et diminuait l'expression de la N-cadhérine. La TEM étant reconnue comme un des mécanismes métastatiques précoces. L'équipe de recherche suggérait un axe dans lequel la TG2 activait l'effecteur C-Jun N-terminal et diminuait l'expression de la protéine régulatrice protéine/thréonine phosphatase 2A²⁰¹. En comparant deux lignées cellulaires avec des propriétés d'invasivité différentes, il a été constaté que la lignée la plus invasive avait une expression plus importante de TG2 et que la surexpression ou l'inhibition de la TG2 permettait de modifier la capacité d'invasion et de migration des cellules des deux lignées²⁰². Dans le cas particulier des cellules cancéreuses avec mutation EGFR, l'étude de Choi et al identifiait que les cellules résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase présentaient des niveaux d'expression de TG2 plus élevés et des niveaux moins importants des suppresseurs de tumeurs PTEN et I κ B α en comparaison des cellules sensibles aux inhibiteurs de tyrosine kinase²⁰³. Cette fonction suppressive était rétablie en inhibant la TG2 suggérant la capacité de la TG2 d'induire la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase via la perte de PTEN et l'induction de la voie NF- κ B. Une étude plus ancienne, identifiait que les cellules cancéreuses présentant une résistance acquise au tnf-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) présentait une expression élevée de TG2 et que la suppression de la TG2 diminuait les capacités migratrice et invasive notamment en diminuant l'expression de la MMP9. L'expression de TG2 était dépendant de l'EGFR et médiée par les MAP kinases C-Jun N-terminal et ERK (mais pas Akt et NF- κ B)¹⁹⁹. La TG2 semble jouer un rôle protecteur vis-à-vis des cellules cancéreuses pulmonaires en inhibant l'apoptose liée aux radicaux libres²⁰⁴. Finalement, à partir d'une analyse bioinformatique du Cancer Genome Atlas suivi d'une étude *in vitro*, la TG2 a pu être identifiée comme participant directement aux réparations de l'ADN, en interaction avec la topoisomérase II α . L'inhibition spécifique de cette interaction diminuant les capacités de réparation, sensibilisant donc les cellules cancéreuses aux traitements du cancer²⁰⁵.

Ces travaux permettent d'envisager des applications cliniques en ciblant la TG2 dans le développement de nouvelles thérapeutiques mais aussi comme biomarqueurs pouvant permettre de suivre, voire de prédire une réponse au traitement. Une analyse de l'expression de la TG2 sur des tumeurs pulmonaires explantées chirurgicalement identifiait une corrélation à la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase mais n'avait pas de valeur pronostique sur la survie globale²⁰⁶. A l'inverse, une étude chinoise retrouvait que les patients présentant des niveaux plus faibles d'expression de la TG2 présentaient une plus longue survie sans progression et survie globale que les patients présentant un niveau d'expression élevé²⁰⁷. La TG2 dans ce cas était donc un marqueur de mauvais pronostic. Choi et al, sur une méthodologie similaire retrouvait une corrélation entre le niveau d'expression de la TG2 et la survie chez les patients présentant un cancer non à petites cellules. Cependant dans l'analyse plus précise des types histologiques, cette corrélation n'était retrouvée que dans les tumeurs non-adénocarcinomeuses²⁰⁸. Une limite notable de ces études est qu'elles ne concernent que des patients ayant bénéficiés d'une chirurgie donc à des stades précoces de cancer pulmonaire.

La TG2 dans le cadre des cancers pulmonaires semblent donc agir à plusieurs niveaux : dans les capacités migratrices et invasives des cellules cancéreuses, pouvant inhiber l'apoptose cellulaire ou favorisant la réparation de l'ADN.

2. La fibrose pulmonaire idiopathique

C'est probablement dans le cadre de la fibrose pulmonaire que le rôle de la TG2 a été le plus étudié dans le poumon. La fibrose tissulaire correspond à un échec de réparation lésionnelle caractérisé par une différenciation épithéliale aberrante, une activation persistante des myofibroblastes et une MEC en excès²⁰⁹. La MEC semble être une des principales responsables de l'évolutivité de la maladie en ce sens qu'elle modifie l'architecture normal du tissu et qu'elle contribue à la dérégulation des cellules environnantes. La constitution de la MEC pathologique est le résultat d'une diminution de sa dégradation et d'une augmentation de sa production²¹⁰. Le rôle de la TG2 est potentiellement central dans ces processus par sa capacité notamment à réaliser des liaisons croisées avec des protéines constituantes majeures de la MEC, comme la fibronectine ou le collagène, augmentant ainsi la résistance de la MEC à la

dégradation par les protéases²¹¹. Il faut cependant noter que cette notion est soutenue par des preuves indirectes ou des résultats d'expérimentation *in vitro*, la compréhension du rôle de la TG2 dans la fibrose pulmonaire reste incomplète. En 2011, Olsen et al rapporte une expression et une activité de la TG2 augmentées sur des sections de biopsies pulmonaires de patients atteints de FPI en comparaison de biopsies de poumons sains. Par ailleurs, les auteurs constataient une diminution de la fibrose induite par la bléomycine sur des souris invalidées pour la TG2 comparées à des souris sauvages²¹². Ces résultats sur le modèle murins ont été confirmé plus récemment avec cette fois l'utilisation d'un inhibiteur chimique (GK921)²¹³. Une analyse *in vitro* de fibroblastes dérivés de patients avec FPI a révélé un rôle central de l'activité de liaison croisée de la TG2 dans l'adhésion et la prolifération des fibroblastes ainsi que dans le renouvellement de la MEC²¹¹. De même, Fell et al ont réussi à démontré, au niveau cellulaire, un rôle clé de la TG2 dans l'induction du phénotype des myofibroblastes et la capacité d'un inhibiteur sélectif de la TG2 à inverser ce phénotype²¹⁴. Finalement, Takeuchi et al, sur le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine ont réussi à identifier 126 substrats potentiels de liaisons croisés de la TG2. Pour ce faire, ils ont utilisé la grande spécificité du peptide T26 pour la TG2 pour isoler les protéines substrats de la TG2 à partir de sections fraîches de poumons de souris issues du modèle. Une étude spectrométrie de masse a permis ensuite d'identifier les protéines purifiées et l'analyse des réseaux d'interactions protéine-protéine a relevé 6 clusters distincts et hautement connectés pathologiques²¹⁵.

3. Mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique causée par des mutations du gène codant pour le CFTR. La morbi-mortalité est principalement liée à l'atteinte respiratoire, caractérisée par la présence d'un mucus visqueux, d'une clairance respiratoire altérée et d'une inflammation chronique des voies aériennes avec infections respiratoires répétées. Une équipe italienne a fait la démonstration en 2010 que la TG2 participait à la diminution de la clairance des agrégats de protéines CFTR défectueuses en réalisant une liaison croisée de la beclin-1 et ce dans un environnement oxydatif²¹⁶. L'hypothèse est que le processus d'autophagie défectueuse dans la mucoviscidose est médié par la TG2, activée de façon constitutive par les dérivés réactifs de l'oxygène, causant la séquestration de protéines nécessaire à l'initiation de l'autophagie. TG2 serait ainsi lié au processus d'autophagie. Une autre étude a montré que la dysfonction CFTR

était associée à une régulation positive de la TG2 et une séquestration fonctionnelle du peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) et l'augmentation de paramètres classiques de l'inflammation²¹⁷. Cette association était retrouvée plus récemment sur analyse en immunofluorescence de polypes nasaux une diminution de PPAR γ et une augmentation de la fluorescence pour TG2²¹⁸. L'utilisation d'un inhibiteur de la TG2, la cystamine, permettait *in vitro* d'améliorer la clairance bactérienne de macrophages issus de patients atteints de mucoviscidose, de diminuer l'inflammation et la production de radicaux libres²¹⁹. L'étude travaillant sur les mêmes lignées cellulaires a identifié que la surexpression de TG2 augmentait les taux de TGF- β 1 et le processus de transition épithélio-mésenchymateuse ce qui donne un argument pour une autre voie d'action possible de la TG2 dans cette maladie²²⁰.

Dans le contexte de la mucoviscidose la TG2 semble donc jouer un rôle particulier dans l'altération de l'autophagie, favorisant l'inflammation locale chronique et diminuant les capacités de clairance bactériennes. Elle pourrait jouer aussi un rôle dans le remodelage bronchique et la destruction broncho-parenchymateuse à l'œuvre dans cette maladie.

4. BPCO

La BPCO est une des principales causes de mortalité et de morbidité au niveau mondial. C'est une maladie hétérogène caractérisée par des symptômes respiratoires chroniques en lien avec une atteinte des voies aériennes et/ou des alvéoles pouvant causer une obstruction chronique et progressive des voies aériennes²²¹. Une équipe finlandaise a réalisé une analyse protéomique comparative de tissu pulmonaire humain provenant de patients fumeurs, non-fumeurs et atteints de BPCO. La TG2 faisait partie des 4 protéines identifiées comme spécifiques à la BPCO et sa présence n'était pas reliée au tabagisme mais était corrélée à la gravité de l'atteinte respiratoire²²².

5. Asthme

Le rôle de la TG2 dans l'asthme a été bien plus documenté que dans la BPCO. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes qui est responsable de symptômes respiratoires (sibilants, toux, oppression thoracique et dyspnée) variables dans le temps et

associés à un trouble ventilatoire obstructif en lien avec une bronchoconstriction, un épaissement de la paroi des voies aériennes et une augmentation du mucus²²³. Il semblerait que les cellules épithéliales pulmonaires abîmées par l'allergène soient capables de déclencher l'expression de l'IL-33 par l'intermédiaire de la TG2²²⁴. Une étude sur un modèle murin d'asthme allergique s'attachant plus spécifiquement au remodelage bronchique retrouvait des taux plus élevés de TG2 dans le LBA des souris exposées dont la source était les macrophages alvéolaires²²⁵. Une analyse phénotypique des macrophages pulmonaires interstitiels dérivés du modèle murin d'asthme allergique à l'ovalbumine retrouvait des macrophages activés qui exprimaient la TG2²²⁶. Par ailleurs, une étude plus ancienne retrouvait sur ce même modèle que la TG2 facilitait la production d'IgE via une augmentation de la molécule de co-stimulation CD40L sur les mastocytes et augmentait l'inflammation des voies aériennes et le remodelage des voies aériennes²²⁷. Plus récemment, Lee HS et al, sur des échantillons d'expectorations induites de patients asthmatiques, retrouvait une augmentation de l'expression de la TG2 et de marqueurs de macrophages activés M2 (porteurs des marqueurs CD206, MGL et ARG1) et l'utilisation de souris invalidée pour la TG2 (TG2 KO) dans le modèle ovalbumine montrait une réduction des marqueurs M2, suggérant un rôle important de la TG2 dans polarisation des macrophages et la physiopathologie de l'asthme allergique²²⁸. Une analyse *in vitro* a pu identifier que l'activité de la TG2 des M2 était régulée par la phospholipase A2 du groupe V, notamment par la génération de prostaglandine E2²²⁹. La TG2 était aussi retrouvée associée dans un modèle d'exposition prolongée à l'ovalbumine, probablement induite dans ce contexte par le relargage d'ostéopontine conduisant à l'inflammation et un remodelage médié par TGF- β et Smad3²³⁰. Finalement, il est à noter que la TG2 exprimée dans les cellules endothéliales pulmonaires est, dans le contexte d'asthme allergique, nécessaire au recrutement des éosinophiles²³¹.

La TG2 dans le contexte de l'asthme semble donc jouer différents rôles à plusieurs niveaux, à l'initiation de la réponse inflammatoire, au niveau épithélial et endothélial pulmonaire, dans les macrophages pulmonaires essentiels au maintien de l'inflammation et finalement dans le remodelage des voies aériennes.

6. Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HP) est une maladie vasculaire qui se caractérise par une élévation progressive des résistances vasculaires pulmonaires aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Il existe un remodelage vasculaire au niveau des artères pulmonaires de petit calibre qui est un des principaux mécanismes responsables de l'obstruction vasculaire. Ce remodelage implique l'ensemble des tuniques du vaisseau, il est caractérisé par la prolifération des cellules musculaires lisses de la media et l'accumulation de myofibroblastes et de matrice extracellulaire dans l'intima. La TG2 peut médier la transamidation de la sérotonine (ou 5-hydroxytryptamine, 5-HT) sur un résidu glutamine, processus appelé sérotonylation qui semble jouer un rôle important dans cette pathologie, à la fois sur la prolifération des muscles lisses et sur la contraction produite par le 5-HT. A partir d'un modèle murin d'HP induit par l'hypoxie, il a été démontré que l'expression et l'activité de la TG2 (notamment la sérotonylation de la fibronectine) étaient augmentées au niveau pulmonaire et du ventricule droit ainsi que l'expression de marqueurs fibrogéniques comme le collagène 1 et l'alpha-smooth actine muscle). L'utilisation d'un inhibiteur chimique (ERW1041E) de l'activité de la TG2 permettait de réduire la synthèse de marqueurs fibrogéniques et l'activité de sérotonylation de la TG2²³². La production de TG2 semble augmentée par l'hypoxie chronique et un mécanisme possible d'action dans ce modèle pourrait être l'inactivation par sérotonylation d'une pompe Ca^{2+} (SERCA2)²³³. Sur le modèle d'HP chez le rat induite par la monocrotaline l'utilisation de la cystamine, inhibiteur de la TG2, ralentissait le développement du phénotype d'HP, diminuait l'expression de la TG2, de l'Akt et de ERK²³⁴. Une autre équipe chinoise, sur un modèle d'HP induite par pneumonectomie et injection de monocrotaline, la cystamine avait aussi un effet bénéfique sur le phénotype d'HP, et notamment sur la prolifération néointimale. La diminution de l'expression de la TG2 dans le groupe traité était associée à une diminution de l'activation des voies de signalisations 5-hydroxytryptamine et RhoA/ROCK²³⁵. A l'inverse, une équipe Danoise, sur un modèle hypoxique, ne retrouvait d'efficacité de la cystamine sur le développement de l'HP et de l'hypertrophie ventriculaire droite²³⁶.

Ces informations regroupées permettent de proposer le schéma d'action suivant de la TG2 dans l'HP : la TG2 induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, la production de collagène 1 et réalise des liaisons croisées de ces protéines. Cela aboutit à une rigidification des vaisseaux sanguins pulmonaires. En parallèle, la 5-HT se fixe sur ses récepteurs au niveau

des cellules musculaires lisses, activant les voies Akt, ERK ou ROCK, augmente le Ca^{2+} intracellulaire, activant la TG2 cytosolique, favorisant la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses et la sérotonylation de la fibronectine²³⁷.

IV. MMP-9

Comme présenté précédemment, les MMPs sont présentes dans les processus de rejet de greffe. Les MMPs sont des endoprotéases dépendantes du zinc présentant de multiples rôles dans le remodelage et la dégradation de nombreuses protéines dans la matrice extracellulaire. Elles jouent un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire et semblent aussi intervenir dans l'apoptose, la réparation tissulaire, la réponse immune et l'angiogénèse. Les MMPs semblent aussi être capable d'affecter des molécules bioactive à la surface cellulaire et moduler des voies de signalisation cellulaire²³⁸. De façon intéressante, l'expression de MMP-2 et MMP-9 peut être régulée par la TG2 et nous avons également montré qu'elle était surexprimée dans un modèle *in vitro* d'allogreffe. MMP-9 apparaît comme un biomarqueur potentiellement prédictif de la DCG pulmonaire¹¹¹. Dans ce chapitre, je vais décrire dans un premier temps les propriétés biochimiques et biologiques des MMPs pour ensuite me focaliser sur le rôle des gélatinases MMP-2 et MMP-9 dans les pathologies pulmonaires.

A. Structure et mécanismes d'actions des MMPs

1. Structure

Les MMPs ont d'abord été identifiées par leur activité protéolytique du collagène causant la dégradation des protéines de la MEC. Les MMPs sont des protéases qui forment une famille d'endopeptidases, ou de matrixines, qui appartient à la superfamille des metzincines. Les MMPs sont des métalloprotéinases contenant des ions Zinc hautement homologues, multidomaine qui dégradent divers composants protéiques de la MEC. La famille des MMPs partage une structure commune consistant en un propeptide de 80 acides aminés, un domaine catalytique métallinoprotéinase d'environ 170 acides aminés, un peptide de liaison et un domaine hémapexine de 200 acides aminés (figure 6). Les MMPs partagent 3

caractéristiques importantes. Tout d'abord, toutes les MMPs sont homologues à la MMP-1 (ou collagénase) à l'exception des MMP-7, -23 et -26. Deuxièmement, les MMPs contiennent un interrupteur cystéine avec un motif PRCGXPD dont le groupe sulfhydryde ($-SH$) chélate le site actif Zn^{2+} maintenant la MMP dans une forme zymogène proMMP latente. Troisièmement, le domaine catalytique porte un motif de liaison au Zinc auquel l'ion est Zn^{2+} est lié par 3 histidines de la séquence HEXXHXXGXXH, avec l'aide d'une séquence glutamate et d'une séquence méthionine XBMX localisées 8 résidus en dessous du motif de liaison.

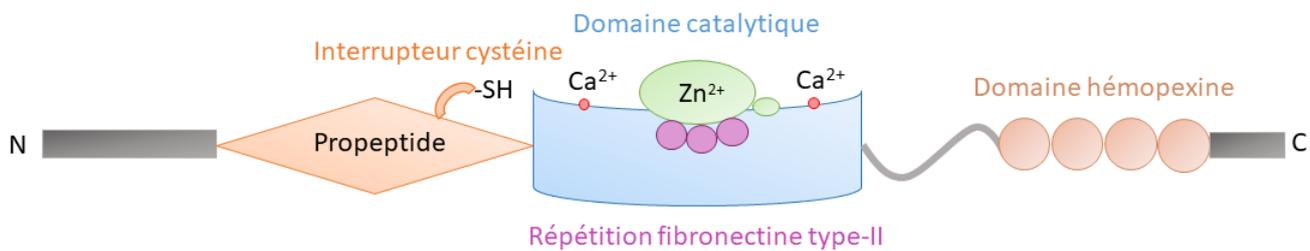


Figure 6. Structure commune des métalloprotéinases de matrice (MMP). La MMP contient un propeptide, un domaine catalytique métalloprotéinase, un peptide de liaison et un domaine hémopexine. Le propeptide contient un interrupteur cystéine avec un motif PRCGXPD dont le groupe sulfhydryde ($-SH$) chélate le site actif Zn^{2+} maintenant la MMP dans une forme zymogène proMMP latente. Le domaine catalytique contient un motif de liaison au Zinc HEXXHXXGXXH, 2 ions Zn^{2+} (1 catalytique et 1 structurel) et 2 ou 3 ions Ca^{2+} pour la stabilisation. Les gélatinases (dont la MMP-9) ont 3 répétitions fibronectine de type II.

Régulation et mécanismes d'actions

Chez les vertébrés, la famille des MMPs comprend 28 membres dont au moins 23 sont exprimés dans le tissu humain. Les MMPs sont classées, selon leur substrats et l'organisation de leur domaines structurels, en collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines, membrane-type MMPs et autres (tableau 3).

Nom MMP	Distribution tissulaire	Substrat collagène	Substrat MEC non collagène	Autres substrats et cibles
Collagénases				
MMP-1	Endothelium, intima, fibroblaste, muscle lisse, adventice vasculaire, plaquette, veine variqueuse.	I, II, III, VII, VIII, X, gélatine	Aggrecan, nidogène, perlecan, proteoglycan link protein, serpin, tenascin-C, versican	Caséine, α -1 antichymotrypsine, α -1 antitrypsine, 1-proteinase inhibitor, IGF-BP-3 et -5, IL-1 β , L-sélectine, ovostatine, pro-TNF- α , SDF-1
MMP-8	Macrophage, neutrophile	I, II, III, V, VII, VIII, X, gélatine	Aggrecan, élastine, fibronectine, laminine, nidogène	α -2 antiplasmine, proMMP-8
MMP-13	Muscle lisse, veine variqueuse, macrophage, cancer du sein, pré-eclampsie	I, II, III, IV, gélatine	Aggrecan, fibronectine, laminine, perlecan, tenascin	Caséine, plasminogen activator 2, proMMP-9 et -13, SDF-1
MMP-18	Cœur, poumon, colon	I, II, III, gélatine		α -1 antitrypsine
Gélatinases				
MMP-2	Muscle lisse vasculaire, endothelium, adventice, plaquette, leucocyte, veine variqueuse, anévrisme aortique	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gélatine	Aggrecan, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, proteoglycan link protein, versican	MMP-9 et -13 active, FGF-R1, IGF-BP-3 et -5, IL-1 β , proTNF- α , TGF- β
MMP-9	Muscle lisse vasculaire, endothelium, adventice, micovaisseaux, macrophages, veine variqueuse,	IV, V, VII, X, XIV, gélatine	Aggrecan, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, proteoglycan link protein, versican	CXCL5, IL-1, IL2-R, proTNF- α , plasminogen, TGF- β , SDF-1

	anévrisme aortique			
Stromélysines				
MMP-3	Endothelium, intima, muscle lisse vasculaire, plaquettes, maladie coronaire, hypertension fibroblaste synovial, tumeur	II, III, IV, IX, X, XI, gélatine	Aggrecan, décorine, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, perlacan, proteoglycan, proteoglycan link protein, versican	Caséine, α 1- antichymotrypsine, α 1- protease inhibitor, anti- thrombine III, E-cadhérine, fibrinogène; IGF-BP3, L- sélectine, ovastatine, pro- HP-EBF, pro IL-1 β , proMMP- 1, -8, -9, SDF-1, TNF- α
MMP-10	Athérosclérose, utérus, cellules carcinomateuses, arthrite, pré- éclampsie	III, IV, V, gélatine	Aggrecan, élastine, fibronectine, laminine, nidogène	Caséine, proMMP-1, -8, -10
MMP-11	Cerveau, utérus, angiogénèse	Ne fend pas	Aggrecan, fibronectine, laminine	α 1-protease inhibitor, α -1 antitrypsine, IGF-BP-1
Matrilysines				
MMP-7	Endothelium, intima, muscle lisse vasculaire, utérus, veine variqueuse	IV, X, gélatine	Aggrecan, élastine, énactine, fibronectine, laminine, proteoglycan link protein	Caséine, β 4-intégrine, décorine, défensine, E- cadhérine, Fas-ligand, plasminogène, proMMP-2, - 7, -8, proTNF- α , syndécan, transferrine
MMP-26	Cancer du sein, tumeur endométtrial	IV, gélatine	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine	Caséine, β 1-proteinase inhibitor, fibrine, fibronectine, pro-MMP-2

Tableau 3. Membres de la famille des métalloprotéases de matrice (MMPs) avec leur distribution tissulaire et leurs substrats. Membrane-type (TIMP) et autres MMPs non classiques non représentées.

Les MMPs jouent un rôle majeur dans le remodelage de la MEC et sont de ce fait exprimées de façon importante dans le tissu conjonctif. Elles sont aussi produites par de nombreux types cellulaires comme les leucocytes, les macrophages, les plaquettes, les cellules musculaires lisses ou encore les cellules endothéliales.

La plupart des MMPs ne sont pas produites, ou en faible quantité, en condition homéostatique mais cela peut changer de façon spectaculaire lorsqu'une cellule est stimulée par une cytokine, une chimiokine ou un facteur de croissance. D'autres facteurs peuvent influencer la transcription de MMPs comme la forme ou le stress cellulaire. Il est à noter que le facteur de transcription AP1 et son site de liaison sont présents dans la plupart des MMPs²³⁹. Le contrôle de la transcription des MMPs est complexe et de il y a de multiple facteurs nucléaires dont le rôle a été démontré comme l'erythroblast transformation specific, NF- κ B, transcription factors 4, STATs, CIZ, p53 ou core-binding factor α 1.

Les MMPs sont synthétisées sous la forme pré-proMMPs et pendant la translation est retiré le peptide de signal pour générer la proMMP. Le motif cystéine s'articule avec le site catalytique Zn^{2+} pour maintenir la forme inactive. Ce commutateur cystéine est fendu, le plus souvent par d'autres enzymes protéolytiques (sérine protéase, endopeptidase furine ou autres MMPs) pour produire la forme active. Les MMPs peuvent aussi être activées par des agents physico-chimique (chaleur, pH bas).

Un autre point critique de contrôle de l'activité des MMPs se fait par des inhibiteurs endogènes : les tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). Les TIMPs permettent un mécanisme d'équilibrage pour éviter la dégradation excessive de la MEC²⁴⁰. La famille des TIMPs présente 4 membres : TIMP-1 à -4. Les TIMPs ne présentent pas une haute affinité pour l'une ou l'autre des MMPs mais il existe une liaison préférentielle de TIMP-2 pour MMP-2 et de TIMP-1 pour MMP-9. Il est à noter que l'inhibition conférée par les TIMPs est réversible²⁴¹.

2. Substrats

La MEC présente 3 principaux composants : les fibres, les protéoglycanes et les polysaccharides. Les fibres sont principalement des glycoprotéines qui incluent le collagène et

l'élastine qui vont conférer la plasticité et la flexibilité de tissu comme le poumon ou la peau. Les protéoglycanes contiennent permettent d'attirer l'eau et de maintenir la MEC hydratée. Les MMPs jouent un rôle majeur dans le remodelage tissulaire en promouvant le renouvellement de plusieurs protéines de la MEC comme le collagène, l'élastine, la gélatine ou de protéoglycanes. C'est le domaine hémapexine qui semble conférer la spécificité des MMPs avec leur substrat²⁴². Plusieurs MMPs peuvent coopérer pour dégrader complètement une protéine substrat. Les gélatinases possèdent au niveau de leur domaine catalytique une répétition de trois fibronectines de type II qui leur permet de se lier non seulement à la gélatine mais aussi au collagène et à la laminine. Ainsi, la MMP-2 et la MMP-9, tout d'abord des gélatinases peuvent aussi dégrader le collagène, de façon plus faible cependant que la MMP-1²⁴⁰.

3. Rôle cellulaire

Les MMPs jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques comme la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, le remodelage de la MEC, l'invasion tissulaire et la vascularisation. Ces processus surviennent pendant le développement normal et l'organogénèse mais peut aussi contribuer dans des situations pathologiques comme le cancer. Par exemple, les MMPs peuvent être responsables du clivage protéolytique de facteurs de croissance, devant ainsi disponible pour des cellules non directement en contact, la dégradation de la MEC peut favoriser la mobilité de cellules à travers les tissus dans le stroma adjacent et la régulation de récepteur permettant de faire aboutir le signal cellulaire et de déclencher la migration cellulaire²⁴³. Les MMPs sont aussi importantes dans la réparation tissulaire après une lésion aiguë. Elles peuvent contribuer au désassemblage des jonctions intercellulaires et à la dégradation de la MEC permettant ainsi de le mouvement cellulaire. Les MMPs peuvent aussi jouer un rôle dans la diffusion de l'infection virale, l'inflammation, le remodelage et la fibrose des voies aériennes respiratoires²⁴⁴.

B. Les gélatinases dans les pathologies pulmonaires

En dehors de l'endothélium qui produit de façon constitutive MMP-2, les cellules du poumons en condition physiologique n'exprime pas de gélatinase²⁴⁵. En condition inflammatoire cependant, les cellules épithéliales bronchiques, les fibroblastes, les cellules alvéolaires de type II peuvent produire MMP-9. Les neutrophiles et éosinophiles sont une autre source majeure de gélatinase et les macrophages et les lymphocytes sont capables de relarguer MMP-9 en condition inflammatoire.

Dans la fibrose pulmonaire idiopathique, la MMP-9 semble principalement exprimée par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages alvéolaires. Il a été retrouvé que l'expression de MMP-9 était élevée, à la fois chez l'humain et sur des modèles expérimentaux de fibrose. Les niveaux et l'activité de MMP-9 dans le LBA sont plus importants chez les patients présentant des formes rapidement progressive de FPI possiblement en lien avec l'activité des neutrophiles²⁴⁶. Sur le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, les données de la littérature semblent cependant discordantes. Les souris MMP-9^{-/-} développent une fibrose similaire aux souris de type sauvage mais la surexpression de MMP-9 au niveau des macrophages semblerait atténuer l'induction de la fibrose. Cette diminution est précédée d'une réduction des neutrophiles, des lymphocytes et des taux de TIMP-1 retrouvés dans le LBA^{247,248}. De la même manière, MMP-2 a été signalée comme largement exprimée dans le poumon fibrotique²⁴⁹ et les mêmes données conflictuelles sont retrouvés. Deux études récentes illustrent bien cette problématique. A partir d'un modèle de fibrose induite par le TGF- β 1, Bormann *et al.* rapporte des niveaux élevés d'expression et d'activité de MMP-2 et MMP-9. Les souris MMP-9^{-/-} et MMP-2^{-/-} (et celles K.O. pour les 2 gènes) présentaient cependant une fibrose similaire aux souris sauvages²⁵⁰. Inoue *et al.* ont démontré que des souris surexprimant la MMP-2 développaient moins de fibrose et présentaient une réduction de l'infiltration par les cellules inflammatoires et l'expression de cytokines inflammatoires et profibrotiques²⁵¹.

Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, MMP-2 est détectée dans les myofibroblastes et les cellules endothéliales des lésions plexiformes. Une étude rapporte une expression augmentée et une activité augmentée de MMP-2 au niveau des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire de patients atteints d'hypertension pulmonaire²⁵². Par ailleurs, une étude

longitudinale retrouvait des taux sanguins de MMP-9 et de TIMP-1 élevés chez des patients porteurs d'une hypertension pulmonaire en comparaison de contrôles normotendus²⁵³.

La MMP-12 a un rôle qui a été bien étudié dans les modèles expérimentaux de BPCO induite par la fumée de tabac dans la physiopathologie de l'emphysème et des autres lésions constatées dans la BPCO²⁵⁴. L'exposition à la fumée induit la libération de MMP-12 qui attaque la matrice de la paroi alvéolaire et génère des molécules chimio-attractantes des neutrophiles et des macrophages, cellules qui vont-elles-mêmes relarguer des protéases. Il existe aussi des données pour envisager un rôle chez l'humain. MMP-9 est responsable de la production du tripeptide proline-glycine-proline, produit de dégradation du collagène et qui a une activité chimiotactique des neutrophiles²⁵⁵. Plusieurs études chez l'humain ont montré une relation entre la BPCO et MMP-9 avec notamment des corrélations entre le taux sanguin, le niveau et l'activité dans l'expectoration induite ou encore le niveau d'expression transcriptomique et la fonction respiratoire (VEMS et/ou capacité pulmonaire de diffusion du monoxyde de carbone.^{256,257} De façon tout à fait intéressante, les souris MMP-9^{-/-} développent le même niveau de sévérité d'emphysème que les souris sauvages²⁵⁸.

V. Objectifs de la thèse

Le rôle de la TG2 dans le contexte de la transplantation pulmonaire, et plus généralement de la transplantation solide d'organe, n'a pas été étudié de façon approfondie. A ma connaissance, il n'existe qu'une étude ayant travaillé sur ce sujet précis. Les auteurs rapportent sur le modèle de transplantation mono-pulmonaire gauche chez le rat l'expression de la TG2 sur le poumon allogreffé principalement au niveau des fibroblastes pulmonaires. L'utilisation de l'inhibiteur de tyrosine kinase Nintedanib entraînait une diminution du nombre de cellules positives à la TG2. L'analyse *in vivo* des fibroblastes pulmonaires soumis à des doses croissantes de Ciclosporine A, pour simuler le stress induit par la toxicité médicamenteuse, entraînait une augmentation du stress oxydatif et de l'expression de la TG2²⁵⁹.

Nous faisons donc l'hypothèse que la TG2 joue un rôle important dans la physiopathologie de la DCG par sa capacité à stabiliser la matrice extracellulaire et ainsi à favoriser son accumulation, par son rôle dans l'induction et la prolifération de myofibroblastes, cellules essentielles dans le processus de fibrose et par son interaction avec le TGF- β , cytokine importante de l'initiation et le développement du processus de fibrose au niveau des petites voies aériennes et des alvéoles. Les expérimentations seront basées sur des prélèvements issus de patients greffés pulmonaires, dans un modèle cellulaire *in vitro* et dans le modèle animal de BO de transplantation trachéale hétérotopique pour caractériser la présence de la TG2 et sa fonction dans la DCG pulmonaire. L'impact de l'inhibition de la TG2 sera étudié.

Une de ces cibles, la MMP-9 sera également étudiée. Cette protéase est en effet surexprimée lors de la DCG¹¹¹. Cette première étude montrait dans une cohorte pilote de patients greffés une augmentation des taux de MMP-9 sériques avant le diagnostic de DCG. L'objectif ici sera de confirmer sur une cohorte prospective d'envergure le potentiel pronostic de la MMP-9 comme biomarqueur de la survenue de la DCG.

VI. Résultats

A. Surexpression de la TG2 dans la DCG et interaction avec MMP-9

Le processus de fibrose est déterminant dans la compréhension de la physiopathologie de la DCG. Les différents travaux cités dans l'introduction de ce travail montrent que la TG2 joue un rôle important dans le remodelage de la MEC et la capacité de migration de cellules inflammatoires ou fibroblastiques. Nous présentons ci-dessous une analyse à 2 niveaux. Tout d'abord sur des prélèvements humains d'explants pulmonaires de patients ayant développé une DCG. Ensuite sur un modèle *in vitro* d'exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines primaires à du TGF- β 1 et à des lymphocytes T allogéniques.

1. Résumé en français

a. Contexte

La DCG est la principale cause de mortalité à long-terme des patients transplantés pulmonaires. La physiopathologie de cette complication n'est que partiellement élucidée. Il apparaît cependant que le processus de fibrose joue un rôle déterminant. La TG2 est une protéine multifonctionnelle dont le rôle a été démontré dans certaines pathologies fibrosantes pulmonaires. Notre objectif est d'explorer le rôle de la TG2 dans la DCG.

b. Méthodologie

L'expression de la TG2 a été évaluée par immunohistochimie sur des explants pulmonaires présentant une DCG, prélevés au moment d'une retransplantation, sur des explants de patients présentant une fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et sur des contrôles correspondant à des parties non utilisées de poumons de donneur sains. L'ARNm de TG2 et de MMP-9 a été détecté par analyse transcriptomique en cellule unique à partir de ces explants pulmonaires. Sur un modèle cellulaire allogénique dans lequel des cellules épithéliales bronchiques humaines (CEB) sont exposées à des lymphocytes T allogéniques et du TGF- β 1, l'ARNm TG2 a été mesuré par PCR quantitative et la protéine TG2 par Western blot. L'activité TG2 a été détectée *in vitro* en utilisant le substrat fluorescent T26. Une

inhibition de la TG2 a été réalisée en utilisant l'inhibiteur DON. L'ARNm et la protéine MMP-9 ont aussi été quantifiés par PCR quantitative et Western blot.

c. Résultats

Les analyses immunohistochimiques sur les explants pulmonaires de DCG montrent une expression élevée de TG2, comparable à celle des poumons de patients avec fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et augmentée en comparaison des poumons sains. L'analyse transcriptomique en cellule unique révèle une répartition spécifique des clusters cellulaires entre les DCG, les poumons sains et les FPI. Les clusters de macrophages/monocytes sont ceux qui expriment le plus TG2 et MMP-9. Les CEB exposées aux lymphocytes T allogéniques et au TGF- β 1 expriment des niveaux élevés d'ARNm et de protéine TG2, associés à une augmentation de l'expression de MMP-9, de la fibronectine et des intégrines. L'inhibition chimique de l'activité enzymatique est associée à une diminution de l'expression de MMP-9.

d. Conclusion

La TG2 est surexprimée dans les poumons présentant une DCG et son inhibition est associée à une diminution de l'expression de la MMP-9, un marqueur important de la DCG. La TG2 pourrait être une cible thérapeutique intéressante du processus fibrosant associé à la DCG .

2. Article en anglais

TG2 is overexpressed in chronic lung allograft dysfunction and its inhibition reduces MMP-9 expression

Adrien Tissot¹, Morgane Penhouet¹, Pierre Halitim², Richard Danger², Eugénie Durand², Léo Boussamet², Naila Benkalfate¹, Camille Mathé², Alexandra Garcia², Bérénice Reucherand¹, François-Xavier Blanc³, Sophie Brouard² and Laureline Berthelot²

¹Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, Service de Pneumologie, l'institut du thorax, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, Nantes, France

²*Centre de Recherche Translationnelle en Transplantation et Immunologie CR2TI, Nantes Université, Inserm, CHU de Nantes, France*

³*Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, Service de Pneumologie, Nantes, France*

Abbreviations

BEC: Bronchial epithelial cell

BOS: Bronchiolitis obliterans syndrome

CLAD: Chronic lung allograft dysfunction

ECM: Extracellular matrix

IPF : Idiopathic fibrosis

RAS: Restrictive allograft syndrome

TG2: Transglutaminase 2

ATL: Allogenic T lymphocytes

Abstract

Background

Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is the main long-term cause of death of lung transplantation recipients and its pathophysiology remains partially understood whereas always associated with tissue fibrosis. As transglutaminase 2 (TG2) is a multifunctional protein that has been shown to play a role in lung fibrotic disease, we here explore the role of TG2 in CLAD.

Methodology

TG2 expression was evaluated by immunohistochemistry on lung explants with CLAD, retrieved at the time of a retransplantation, lung from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and healthy donor lungs were used as controls. TG2 mRNA were detected by single cell RNA sequencing on lung explants. In a cellular allogenic model in which human bronchial epithelial cells (BEC) are exposed to allogenic T lymphocytes (ATL) and TGF- β 1, TG2 mRNA were measured by quantitative PCR and protein by Western blot. TG2 activity was detected *in vitro* using the substrate peptide T26. Inhibition of TG2 was performed using DON inhibitor. MMP-9 mRNA and protein were also quantified by qPCR and Western blot.

Results

Immunohistochemistry analysis of lung explants with CLAD showed high expression of TG2, comparable to lungs from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and increased as compared to healthy lungs. Single cell RNA sequencing analysis revealed differential distribution of cell clustering between CLAD, healthy lung and idiopathic pulmonary fibrosis. Clusters of macrophages and monocytes predominantly expressed TG2 and MMP-9. BECs exposed to ATL and TGF- β 1 expressed high levels of TG2 mRNA and protein which were associated with increased expression of MMP-9, fibronectin and integrin subunit. Chemical inhibition of TG2 enzymatic activity decreased significantly MMP9 expression.

Conclusion

TG2 is overexpressed in CLAD lung and its inhibition resulted in the decreased expression of MMP-9, a major marker of CLAD. TG2 could be a valuable target for therapies of fibrosis in CLAD.

Introduction

Almost 70,000 lung transplantation (LT) procedures have been reported worldwide in the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) registry and every year more than 4400 patients with terminal end-stage lung disease are benefiting from a LT^{1,2}. Short-term outcomes have greatly improved over the years due to surgical/anaesthesiologic innovations, better management of LT candidates and recipients in intensive care unit or refinement of immunosuppressive treatment³. However, long-term survival remains lower as compared to other solid organ transplants and the leading cause of death after the first year post LT is chronic lung allograft dysfunction (CLAD)¹. CLAD pathophysiology is only partially understood. There are identified risk factors in which some are of immune nature (acute cellular rejection and antibody mediated rejection) and other non-immune (air pollution, viral, bacterial, fungal infection, gastroesophageal reflux disease and primary graft dysfunction)^{4,5}. Those factors are believed to be the cause of repeated aggressions of the lung which activate the innate and adaptive immune system and are responsible for chronic allograft inflammation leading to fibrotic remodelling of the small airway in the case of the bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and subpleural/paraseptal alveolar fibroelastosis seen in restrictive allograft syndrome (RAS)⁵. A common general mechanism in CLAD is tissue fibrosis in which persistent myofibroblast activation and excessive extracellular matrix (ECM) deposition have a key role⁶.

Transglutaminases 2 (TG2), an ubiquitous enzyme, catalyses Ca²⁺-dependant post translational modification of proteins. TG2 is the most widely distributed members of the transglutaminase family being expressed in almost all cell types to varying extents and can be located in the cytosol, in the nucleus, associated with mitochondria, at the cell membrane, or in the ECM. This protein has multiple described functions such as transamidating/deaminating, GTPase/G-protein function, or protein disulphate isomerase^{7,8}. TG2 also mediates the crosslinking of ECM components such as collagen or fibronectin favouring ECM stabilization and resistance to degradation by proteases⁹. This function is thought to mediate ECM accumulation and tissue fibrosis development including in the lung. Indeed, accumulating evidence describe a possible role in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) with high expression seen in lung biopsies from patients with IPF, increased lung expression

on the bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model and the protection from fibrosis by TG2 ablation in mice^{10,11}. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is a secretory endopeptidase which has been identified as key mediator in processes associated with CLAD such as extracellular matrix reorganization, cell migration, epithelial to mesenchymal transition and immune response¹². There is also evidences of possible interactions between TG2 and MMP9. In the lung cancer context TG2 overexpression seems to be necessary for MMP9 increased production¹³. We hypothesized that TG2 has a role in the fibrotic process involved in CLAD and on MMP9 expression. We performed analysis: on explanted lung with a BOS diagnosis and on a cellular model of bronchial epithelial cell exposition to allo-reactive T lymphocytes.

Materials and methods

Participants

Lung transplanted recipients were recruited from two clinical studies. First, the COLT study (NCT00980967) which was approved by the ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ouest 1-Tours, 2009-A00036-51) and all participants provided a written informed consent. The overall description of the cohort has been previously reported and is briefly described in supplemental 1¹⁴. Second, the Programme cadre n°7 de l'Institut du THORAX: « pathologies cardiaques, vasculaires, respiratoires, endocriniennes, leurs facteurs de risque et leurs traitements - ITX », research program declared on 05/09/2011 under the n° DC-2011-1399 and in the following amending declarations (DC-2012-1555 ;DC-2013-1832; DC2014-2206 and DC-2017-2987 currently pending) at the Ministry of Research and having obtained a favorable decision from the CPP Ouest IV on 07/04/2015.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded sections lung recipient's explant were rehydrated and stained. Immunohistochemistry slides were incubated with primary antibody to TG2 (Covalab, France) and MMP-9 (Abcam) followed by secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Cellsignal), developed using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining solution and counterstained with hematoxylin.

Single cell RNA sequencing analysis on lung explant cells

Lung explants were retrieved at the time of transplantation and immediately transferred in Perfadex medium (XVIVO) on ice to the laboratory for cellular dissociation. Lungs were cut in 1x1cm pieces and put in digestion media (DMEM, collagenase 1mg/ml, DNase Deoxyribonuclease I from bovine pancreas 0,1mg/ml, penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (P/S) and amphotericin B 0,25µg/mL) for 45 min at 37°C. Cells were filtered through a 70-µm strainer then pelleted (360g, 10 min, 4°C) and resuspended in 10% fetal calf serum DMEM three times. Cells were then resuspended and incubated in red blood cell lysis buffer for 5 min at room temperature after which the buffer was inactivated by adding 50 ml of cold phosphate buffer saline (PBS) and pelleted again. Cells were counted and frozen at -80°C in Fetal bovine serum with 10% DMSO. Cells were thawed and sorting for living cells was performed by flow cytometry (ARIA III, BD Biosciences) using DAPI viability marker. Ten thousand living cells per explant were loaded and barcoded on the Chromium 10X chip (10X Genomics Technology). Sequencing was performed on Illumina by Nantes GenoBird platform. Data were verified with R Seurat package granted by New York Ben Satija laboratory from the New York Genome Center (<https://satijalab.org/seurat/>). Doublets and cells expressing over 15% of mitochondrial RNA were excluded. We performed unsupervised analysis using dimensional reduction techniques (Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP) and cell clustering based on their expression profil and transcriptomic proximity. Determination of cell type was performed with Azimuth - [NIH Human Biomolecular Atlas Project](#) (HuBMAP). In total, 6 lungs from different participants were analysed (2 with BOS, 2 with IPF, 2 healthy donor lungs).

Cellular allogenic model

Human bronchial epithelial cells (BEC) were dissociated from lung donor trachea and bronchi. Tracheal and bronchial rings were rinsed in RPMI 1640 + HEPES 25 mM (Gibco) then cut in pieces of 2 cm large. For dissociation, tracheal pieces were incubated 45 minutes at 37°C in PBS with 1 mg/ml collagenase, 0,1 mg/ml Deoxyribonuclease I, (P/S). BEC were cultured on type IV human collagen coated 6-wells plates with airway epithelial cell growth medium (Promocell) with P/S under submerged condition until they reached 80%

confluency. Medium was changed every 2-3 days. Allogeneic peripheral blood mononuclear cells were isolated from unrelated healthy donors via Ficoll density gradient centrifugation. CD3+ T cells separated with magnetic beads (CD3 isolation kit, Miltenyi) were stimulated for 48h with plastic-coated anti-CD3 (Affymetrix) in RPMI with 5% fetal calf serum, 1% pyruvate (Gibco), 100 IU/mL IL-2 (Immunotools), and P/S. Activated allogenic T lymphocytes (ATL) (800 000 cells/well) were then co-cultured for up to 5 days with confluent BECs with or without 10 ng/mL TGF- β 1 (R&D Systems). In some conditions, BECs were cultured with TG2 inhibitor DON (Covalab) at 100 μ M.

Immunoblotting

Proteins separated on a 10% acrylamide gel were transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, pH 7.5) with 5% bovine serum albumin (BSA) before incubation overnight at 4°C with primary antibodies directed against TG2 (Abcam), MMP-9 (Abcam) and beta-actin (Sigma-Aldrich). Detection was performed with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies and a chemiluminescence substrate SuperSignal West Pico or Femto (ThermoFisher). ImageJ software was used for analysis.

TG2 activity

For measurement of TG2 activity, we used the peptide T26 substrate (Covalab) on the allogenic model. BECs were seeded on collagen IV coated 4-wells glass slides until they reached 80% confluency. Exposition to activated T lymphocytes (100 000 cells/well) and TGF- β 1 (10 ng/ml) was then performed with T26 peptide (Covalab). We also performed analysis on cellular lysates with the Specific Tissue Transglutaminase Colorimetric Microassay Kit (Covalab) which uses a biotinylated T26 peptide as substrate of TG2. The kit was used following the manufacturer's instruction.

Zymography

Gelatinase activity of MMP-9 and MMP-2 from medium culture BEC supernatants was evaluated using Novex Zymogram Plus 10% gels (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Briefly, 1.5 μ g of protein were loaded in gel's wells. Proteins were separated by

electrophoresis (120V for 105 minutes). Gels were incubated in renaturing buffer for 30 minutes and then in developing buffer at 37°C for 4 hours. Densitometry was measured using ImageJ software for the mean intensity of each gelatinolytic band.

Quantitative Real Time Reverse Transcription-PCR

Total RNA from BECs with different treatments was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription was carried out using 1µg of total RNA using the M-MLV kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real time PCRs were performed with Master Mix PCR Power SYBR™ Green kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's protocol. The RNA concentrations were determined using Nanophotometer (Implen) and RNA integrity with Caliper LabChip GX (LifeScience). The following sequence-specific primers were used: TG2 forward CGT-GAC-CAA-CTA-CAA-CTC-GG, reverse CAT-CCA-CGA-CTC-CAC-CCA-G; MMP-9 forward ATG-CCT-GCA-ACG-TGA-ACA-TCT-TCG, reverse CAG-AGA-ATC-GCC-AGT-ACT-TCC-CAT; Fibronectin forward GCA-GGC-TCA-GCA-AAT-GGT-TCA-G, reverse AGG-TAG-GTC-CGC-TCC-CAC-TG; ZO-1 forward AAG-AAT-ATG-GTC-TTC-GAT-TGG-C, reverse ATT-TTC-TGT-CAC-AGT-ACC-ATT-TAT-CTT-C; E-cadherin forward GGC-CAG-GAA-ATC-ACA-TCC-TA, reverse GGC-AGT-GTC-TCT-CCA-AAT-CC; HPRT forward TGG-CCA-CAG-AAC-TAG-AAC-ATT-GA, reverse TTG-GAA-ACA-TCT-GGA-GTC-CTA-TTG. Gene expression normalized to HPRT was determined by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Student

Transcriptomic analysis using nCounter panel

The nCounter Myeloid Innate Immunity (human) panel (NanoString Technologies) which includes 770 genes was used to measure RNA expression. Samples were hybridised and then processed on the nCounter Prep Station (NanoString Technologies) and imaged on the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) according to the manufacturer's protocol. Data quality control and normalisation was performed using nSolver analysis software 4.0.

Statistical analysis

For quantitative PCR experiment, the Kruskal-Wallis non parametric test was used to compared mRNA expression between the 4 conditions (untreated BECs, BEC + TGF-β1, BEC +

ATL, BEC + TGF- β 1 + ATL). When comparing untreated BECs and BEC + TGF- β 1 + ATL conditions for RNA quantitative PCR analysis and in the Nanostring experiments we used the Wilcoxon-Mann-Whitney non parametric test. In the single cell RNA sequencing analysis, t-test was used to compared mRNA expression from one type of explants to another and ANOVA test when comparing differential expression across identified clusters.

Results

TG2 expression is increased in CLAD lungs

We examined expression of TG2 by immunohistochemistry of explanted lungs from 4 recipients with a diagnosis of late-stage BOS and 2 with IPF. Explanted lungs were retrieved at the time of a retransplantation. Normal lung section came from volume reduction of donor lungs performed just before implantation. A diffuse increased expression of TG2 in BOS lungs was observed as compared to normal lung with intense staining in fibrotic areas and zones of inflammatory infiltrates (figure 1) including in specific lesion of bronchiolitis obliterans (supplemental 3). In BOS patients, TG2 was also present in endothelial cells, alveolar macrophages. As expected, we also found TG2 highly expressed in IPF lungs, also present in interstitial fibrotic area and associated with inflammatory infiltrates (supplemental 3). We then examined transbronchial biopsies performed in 3 lung transplant recipients who developed BOS in order to have a longitudinal observation of TG2 expression. Biopsies performed at 6-months post transplantation already showed TG2 staining in the interstitium, in the alveolar wall and in bronchial epithelial cells (figure 2). The TG2 expression was also increased at the time of CLAD diagnosis (figure 2). For comparison we analysed sections from 2 recipients who did not developed CLAD within 5-year post transplantation. TG2 expression in those biopsies was low at 6-month and 30-month post transplantation as compared with CLAD patients.

Monocyte/macrophage and T lymphocyte populations are increased in CLAD lungs associated with MMP-9 overexpression

As TG2 is expressed by many different cell types, we performed a single cell RNA sequencing analysis on a total of 6 lungs from participants with BOS, IPF and healthy lungs (HL) to determine its expression in the different lung cell populations of and infiltrating immune

cells. Unsupervised analysis identified 17 different clusters with a large majority of immune cells (T cells, B cells, macrophages, monocytes and dendritic cells) and also pulmonary cells with epithelial cells and fibroblasts in a lesser extend (figure 3A, supplemental 3).

Distribution of clusters varied with the lung disease and specific clusters were associated with CLAD. Indeed, clusters 0, 2 and 3 (corresponding to monocytes and T lymphocytes) is almost exclusively found in BOS lungs (figure 3B). Despite total expression of TG2 mRNA was increased in healthy lung as compared to BOS, in BOS lungs, TG2 was clearly overexpressed in three clusters (2, 8 and 14) integrating monocytes, macrophages and endothelial cells/fibroblasts populations (figure 4). On the contrary, MMP-9 overall expression level was increased in BOS as compared to HL (figure 5A). In BOS lungs, MMP-9 was predominantly expressed in one cluster monocytes (figures 5B).

In an allogenic *in vitro* context, bronchial epithelial cells underwent a profibrotic process associated with overexpression of active TG2

To study the role of TG2 in epithelium fibrosis, we used an *in vitro* allogenic model as previously described¹⁵. Briefly, submerged monolayer of primary human BECs were exposed to allogenic activated T lymphocytes (ATL) and TGF- β 1. In this model, within 5 days, most cells have a fibroblastic appearance with increased alpha-smooth actine and fibronectin expression (supplemental 4, 5 and 6). We evaluated TG2 gene expression by quantitative PCR at 1, 3 and 5 days' post-exposition. There was no difference in TG2 mRNA levels at 5-day post-exposition but we found a significant increase in TG2 mRNA levels in BECs treated with TGF- β 1+ATL at 1- and 3-day post-exposition (figure 6A). TG2 protein expression was increased in BECs stimulated with TGF- β 1 or ATL compared to unstimulated BECs at day 5. The effect was even more important with costimulation of TGF- β 1 and ATL (figure 6B, $p=0.005$). Moreover, using a TG2 substrate (T26 peptide) we were able to detect TG2 crosslinking activity. TG2 enzymatic activity was increased with the 3 conditions: TGF- β 1 or ATL or combination of TGF- β 1 and ATL as compared to untreated BECs in which no fluorescence could be found (figure 6C). We also used the *in vitro* colorimetric assay for TG2 activity on cellular lysates and found increased TG2 activity in the treated condition (figure 6D). On the same cellular model we also assessed mRNA expression of MMP-9, Fibronectin, ZO-1 and E-cadherin and found similar results as previously described¹⁵. Briefly, we saw an increase (however not significant here, $n=4$) in MMP-9 and fibronectin mRNA fold change

comparing untreated and TGF- β 1+ATL treated BECs. No difference was seen for epithelial markers ZO-1 and E-cadherin (supplemental 7). Transcriptomic analysis of BECs using Nanostring panel at 24 hours confirmed increased expression of TG2 by BECs when exposed to TGF- β 1+ATL (data not shown). MMP-9, -10, -12, -13 and -19 mRNA were also increased (but not MMP-8) and we observed a decreased expression of MMP inhibitor TIMP3 (figure 6). Expression of mRNA cytokines involved in inflammation as TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in the allogenic condition along with genes associated with fibroblastic activity N-cadherin and fibronectin were increased whereas E-cadherin and IL-33 mRNA were decreased. Finally, the expression of several integrin subunit, including β 1, was increased with TGF- β 1+ATL stimulation (figure 7C). Altogether, in the *in vitro* allogenic model, markers of fibrosis and inflammation were increased associated with TG2 overexpression.

TG2 inhibition decrease MMP-9 protein expression

As described previously¹⁵, MMP-9 was a strong marker of the BECs modification when cells were exposed to activated T cells and TGF- β 1. We confirmed increased protein production of MMP-9 by BECs when treated with ATL and TGF- β 1 (figure 8A). We looked for the effect of an irreversible inhibitor of TG2 enzymatic activity, on MMP-9 protein expression by immunoblotting. The addition of DON seemed to be associated with a trend to decrease of MMP-9 protein expression, (figure 8B). In order to assess MMPs protease activity, we used the zymography technique which enable quantification of MMP-9 and MMP-2 gelatinase activities from cellular lysates. BECs treatment with ATL and TGF- β 1 was associated with increased MMP-9 gelatinase activity but addition of DON inhibitor did not modify this activity. MMP-2 gelatinase was not modified significantly in any condition (+ATL, +TGF- β 1 and/or DON).

Discussion

We described for the first time in this study the presence of TG2 at a high level in BOS phenotype and gave evidences on its role in the fibrotic process at stake in this disease. We indeed showed in a cellular allogenic model that TG2 activity modifies the expression of the metalloproteinase MMP-9 which is important for ECM turnover.

Tissue fibrosis corresponds to an impaired wound healing characterized by aberrant epithelial differentiation, persistent activation of myofibroblasts, and accumulation of ECM¹⁶. The ECM appears to be a major contributor to fibrosis progression in that it alters the normal architecture of the tissue and contributes to the dysregulation of surrounding cells. The formation of the pathological ECM is the result of a decrease in its degradation and an increase in its production⁶. The role of TG2 is potentially central to these processes, in particular through its ability to cross-link with major constituent proteins of the ECM, such as fibronectin or collagen, thereby increasing the resistance of the ECM to degradation by proteases⁹. TG2 implication in pulmonary fibrosis has been previously identified in idiopathic pulmonary fibrosis and in the bleomycin-induced lung fibrosis mouse model¹¹. Olsen et al found on pulmonary biopsies from IPF participants that TG2 was highly expressed as compared to normal lungs. They also showed the key role of TG2 in fibrosis development as TG2^{-/-} mice presented with drastically reduced pulmonary fibrosis secondary to Bleomycin exposition. As a matter of fact, we confirmed their findings by evaluation TG2 expression in explanted lung from patients with IPF. Interestingly, the level of expression of TG2 seemed to be more important in BOS lung as compared to IPF. It should be noted as well that looking at transbronchial biopsies from LT recipients who developed BOS, TG2 could be identified without difficulty at the time of BOS diagnosis but was also present at 6-months post-transplantation, long before the BOS diagnosis. There can be two explanations to this observation: first TG2 is an upstream key protein in BOS pathophysiology or second, TG2 is present at a low level in lung allograft, whether recipients will develop CLAD or remain stable. To answer this problematic further, a comparison should be made with lung biopsies from LT recipients who did not develop BOS (at least within 5-years post-transplantation). The cellular model of BECs exposition to TGF- β 1 and allogenic TL enables the analysis of BEC role in a simplified condition of the rejection process. Our team previously found on this model evidence of *in vitro* epithelial to mesenchymal transition that could participate to fibroblast proliferation in CLAD lung along with *in situ* proliferation and recruitment of peripheral fibrocytes^{15,17}. At five-day post-exposition, optical microscopic aspect shows cells not joined and of fibroblast phenotype with decreased cytokeratin and increased alpha-smooth muscle actin and fibronectin Immunofluorescence staining (supplemental 2, 3 and 4). In this context, TG2 is involved as soon as 24-hours post-exposition with increased mRNA expression and increased protein expression. However, even if TG2 seems to be associated

with MMP9 transcription, TG2 inhibition of its enzymatic activity did not reverse the fibroblastic evolution in the cellular model and decreased in MMP9 production was not significant. Our primary hypothesis is that TG2 participates to BOS fibrosis associated process of BOS physiopathology by crosslinking of ECM protein, stabilizing its structure and so favouring its accumulation. In this aspect, the cysteine active site inhibition by DON, on which the crosslinking activity rely on should have been efficient in reducing the mesenchymal evolution. However, it should be reminded that TG2 is a multifunctional protein and its role in BOS might not only rely on its transamidation/deamidation activity which is specifically inhibited by DON^{18,19}. TG2 can act in this context by other means. For example, TG2 has been shown to be involved in cell death/survival mediation, direct transcriptional regulation of MMP9 or capable to induce the myofibroblast phenotype²⁰⁻²². Moreover, more than a hundred of TG2 substrates have been identified making it still difficult at present to identify TG2 role in a specific context, especially transplantation involving highly complex allo-immune interaction, inflammation and drug related toxicities¹⁰. This is a limitation in our work, we should have used the cellular model with either TG2 silencing RNA or knock-out BEC for TG2 to verify how far is TG2 involved in the *in vitro* fibrotic process. A unique work, to our knowledge, analysed TG2 involvement in CLAD working on the single left lung transplantation rat model²³. They found increased expression of TG2 in transplanted lung as compared to non-transplanted lung which seemed to be originated mainly from fibroblast and not endothelial cells or alveolar macrophages. Another important information from this work was that immunosuppressive treatment (in this case, cyclosporine) induced production of reactive oxygen species and an overexpression of TG2 in rat fibroblasts.

Conclusion

We found an increased lung expression of TG2 in recipients with BOS. TG2 can participate to the fibrotic process at stake in CLAD by crosslinking enzymatic activity and its effect on MMP-9 expression and probably by other TG2 functions that need to be further explored. Inhibition of TG2 could be a potential therapy for CLAD.

References

1. Chambers, D. C. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart–lung transplantation Report—2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J. Heart Lung Transplant.* **38**, 1042–1055 (2019).
2. Perch, M. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-ninth adult lung transplantation report-2022; focus on lung transplant recipients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **41**, 1335–1347 (2022).
3. Young, K. A. & Dilling, D. F. The Future of Lung Transplantation. *Chest* **155**, 465–473 (2019).
4. Royer, P.-J. *et al.* Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. *Transplantation* **100**, 1803–1814 (2016).
5. Verleden, S. E. *et al.* When tissue is the issue: A histological review of chronic lung allograft dysfunction. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **20**, 2644–2651 (2020).
6. Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801 (2014).
7. Eckert, R. L. *et al.* Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol. Rev.* **94**, 383–417 (2014).
8. Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J. & Johnson, G. V. W. Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 406–419 (2012).
9. Philp, C. J. *et al.* Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **58**, 594–603 (2018).
10. Takeuchi, T. *et al.* Spatially Resolved Identification of Transglutaminase Substrates by Proteomics in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **65**, 319–330 (2021).

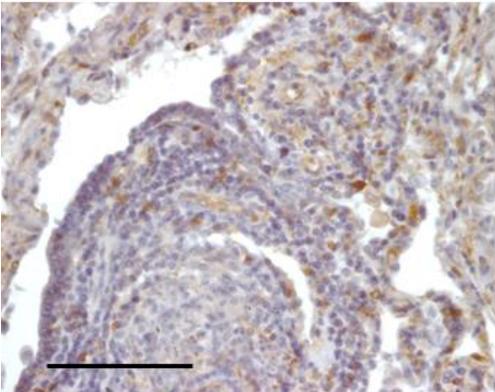
11. Olsen, K. C. *et al.* Transglutaminase 2 and its role in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 699–707 (2011).
12. Augoff, K., Hryniewicz-Jankowska, A., Tabola, R. & Stach, K. MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers* **14**, 1847 (2022).
13. Li, Z., Xu, X., Bai, L., Chen, W. & Lin, Y. Epidermal growth factor receptor-mediated tissue transglutaminase overexpression couples acquired tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance and migration through c-FLIP and MMP-9 proteins in lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 21164–21172 (2011).
14. Koutsokera, A. *et al.* Development of a Multivariate Prediction Model for Early-Onset Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Restrictive Allograft Syndrome in Lung Transplantation. *Front. Med.* **4**, 109 (2017).
15. Pain, M. *et al.* T Cells Promote Bronchial Epithelial Cell Secretion of Matrix Metalloproteinase-9 via a C-C Chemokine Receptor Type 2 Pathway: Implications for Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am. J. Transplant.* n/a-n/a (2017) doi:10.1111/ajt.14166.
16. Basil, M. C. *et al.* The Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* **26**, 482–502 (2020).
17. Pain, M. *et al.* Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **23**, 118–130 (2014).
18. Tatsukawa, H. & Hitomi, K. Role of Transglutaminase 2 in Cell Death, Survival, and Fibrosis. *Cells* **10**, 1842 (2021).
19. Hausch, F., Halttunen, T., Mäki, M. & Khosla, C. Design, synthesis, and evaluation of gluten peptide analogs as selective inhibitors of human tissue transglutaminase. *Chem. Biol.* **10**, 225–231 (2003).
20. D’Eletto, M. *et al.* Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation. *Autophagy* **5**, 1145–1154 (2009).
21. Ahn, J.-S. *et al.* Tissue transglutaminase-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 743–747 (2008).

22. Fell, S., Wang, Z., Blanchard, A., Nanthakumar, C. & Griffin, M. Transglutaminase 2: a novel therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis using selective small molecule inhibitors. *Amino Acids* **53**, 205–217 (2021).
23. Boxhammer, E., Lehle, K., Schmid, C. & von Suesskind-Schwendi, M. Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction? *Exp. Lung Res.* **46**, 128–145 (2020).

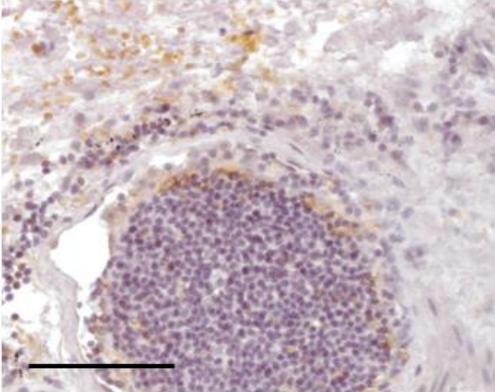
Figures

A.

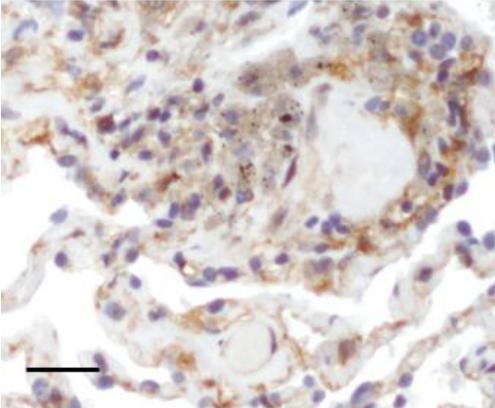
BOS 1



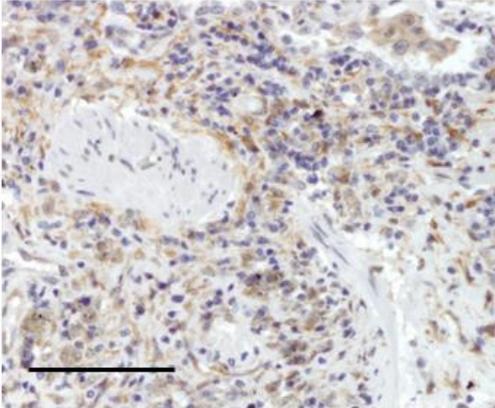
BOS 2



BOS 3



BOS 4



B.

Healthy lung

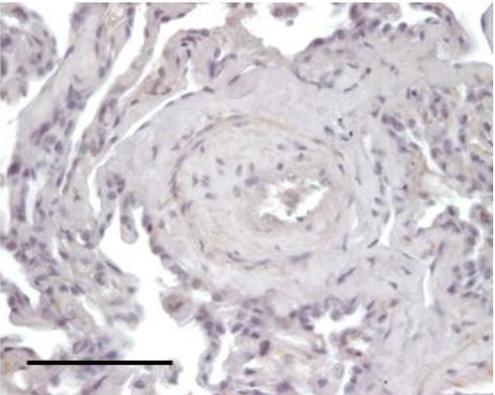
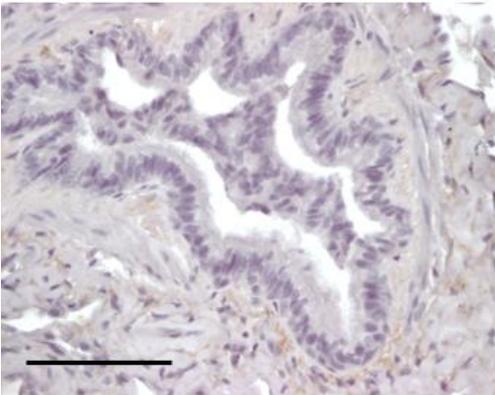


Figure 1. Immunohistological staining for transglutaminase 2 (TG2). Samples from lung explants retrieved at the time of transplantation. (A) chronic lung allograft dysfunction (bronchiolitis obliterans syndrome phenotype). Representative sections from 4 explants (BOS 1 to 4). (B) healthy lung. Representative sections from 2 explants. Scale bar = 100µm

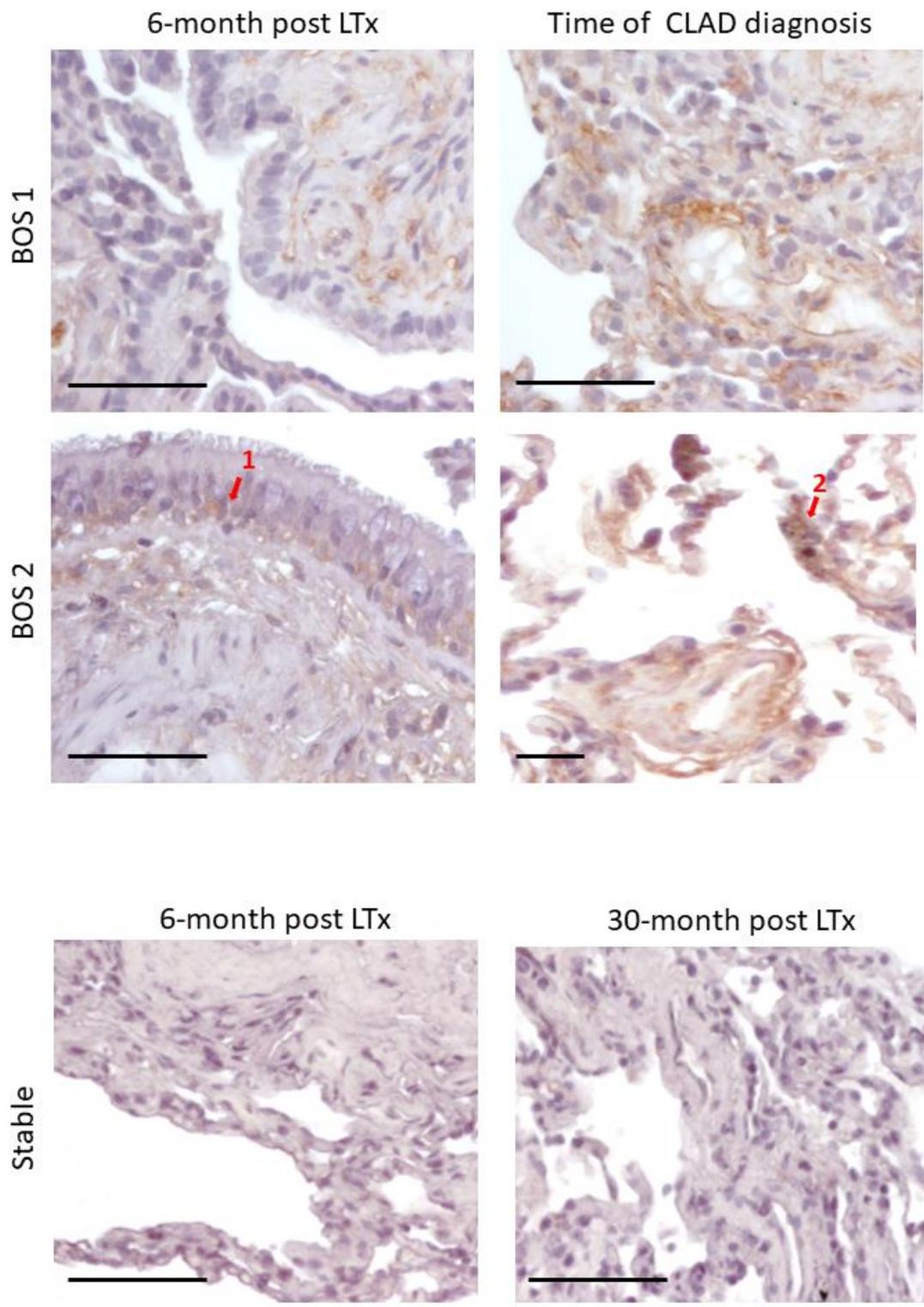
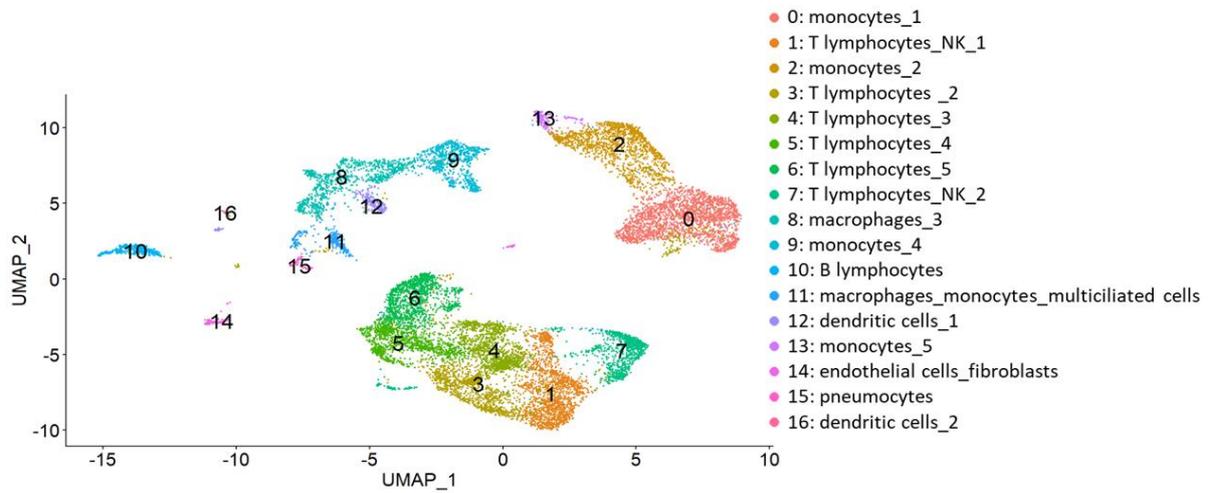


Figure 2. Immunohistological staining for TG2 on transbronchial biopsies performed on lung transplant recipients 6-month post lung transplantation (LTx) and at the time of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) diagnosis. Representative sections from 2 lung transplant recipients (BOS 1 and BOS 2) who developed CLAD by 3 years post LTx. Arrow 1: bronchial

epithelial cells. Arrow 2: alveolar wall. Comparative slides at 6-month and 30-month post LTx from a lung transplant recipient who did not developed CLAD within 5 years (Stable). Scale bar 100 μ m

A.



B.

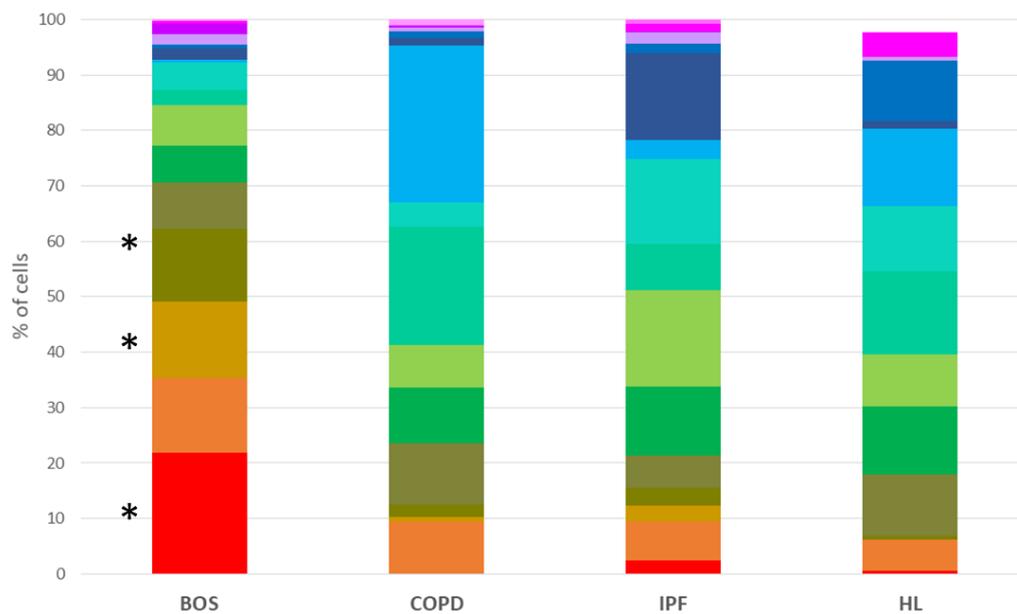
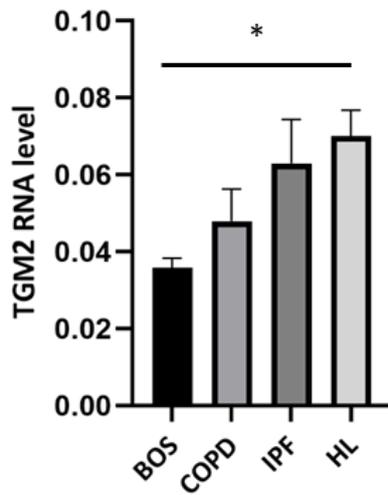


Figure 3. (A) Dimensional representation of unsupervised clustering of lung explants cells from participants with bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) (n=2), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (n=2), healthy lung (HL) (n=2) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=1). t-distributed stochastic neighbour embedding plot showing 17 distinct cell populations in lung explants. Functional annotation of cells was performed based on top

differentially expressed genes and pathway analysis. (B) Differential cell cluster distribution according to lung disease. Clusters 0 (monocytes_1), 2 (monocytes_2) and 3 (T lymphocytes_2) were significantly overrepresented in the BOS (*)

A.



B.

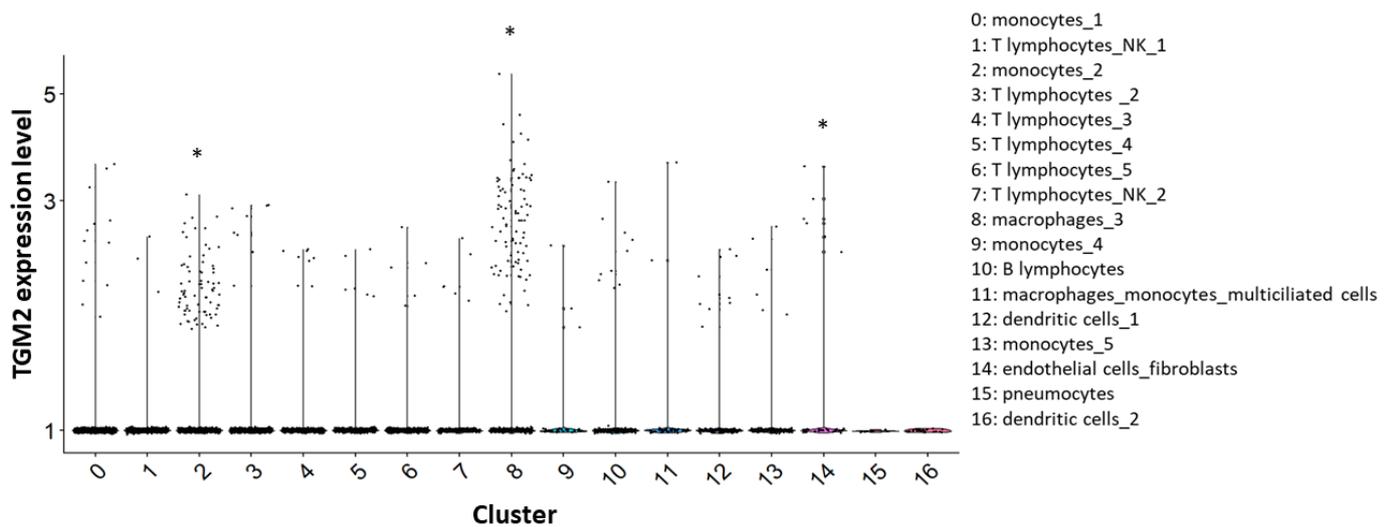
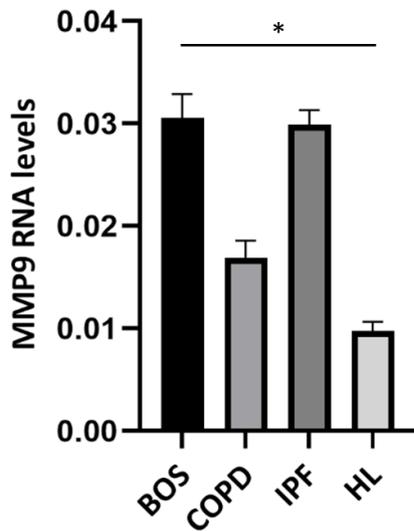


Figure 4. (A). *TGM2* RNA level by single cell RNA sequencing analysis according to disease. bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) (n=2), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (n=2), healthy lung (HL) (n=2) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=1). (B). Differential expression level of *TGM2* in cell clusters for bronchiolitis obliterans syndrome (n=2). Cluster 2 (monocytes_2), 8 (macrophages_3) and 14 (endothelial cells_fibroblasts) predominantly expressed TG2 (Anova test then Tukey test comparing cluster 2 by 2)

A.



B.

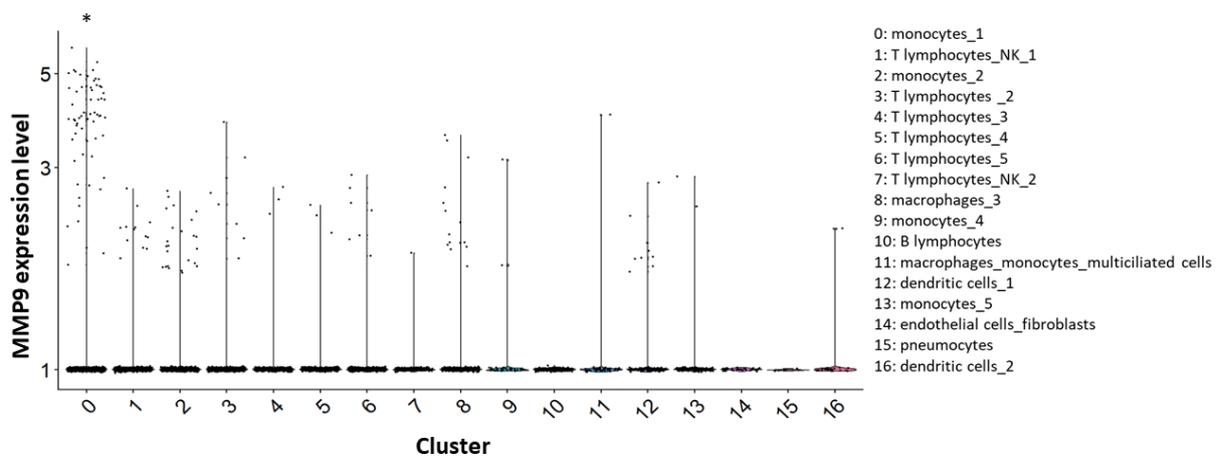
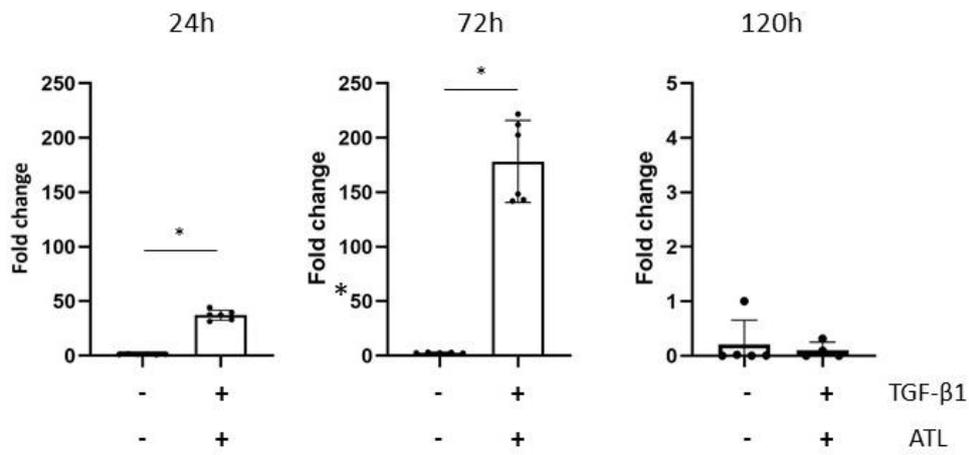
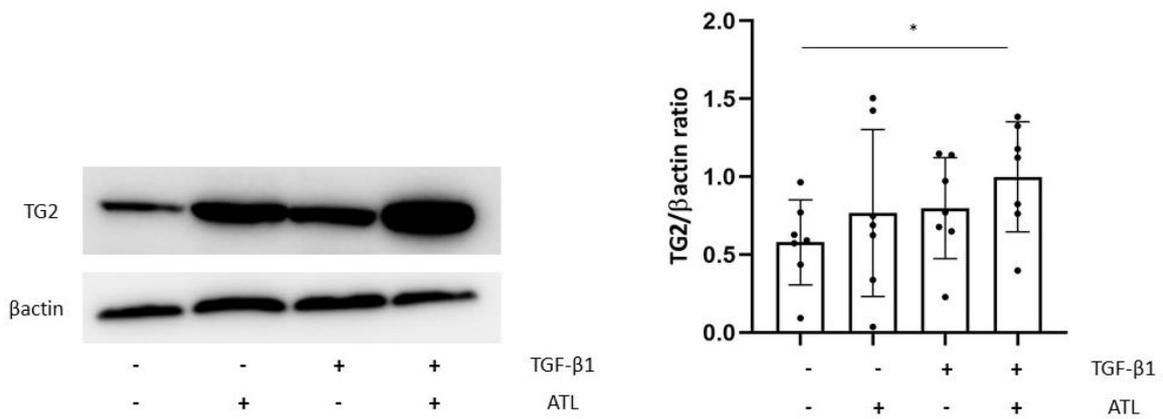


Figure 5. (A). MMP-9 RNA level by single cell RNA sequencing analysis according to disease. bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) (n=2), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (n=2), healthy lung (HL) (n=2) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=1). MMP-9 expression is increased in BOS as compared to HL ($p < 0.001$). (B). Differential expression level of TGM2 in cell clusters for bronchiolitis obliterans syndrome (n=2). Cluster 0 (monocytes_1) predominantly express MMP-9 (Anova test then Tukey test comparing cluster 2 by 2).

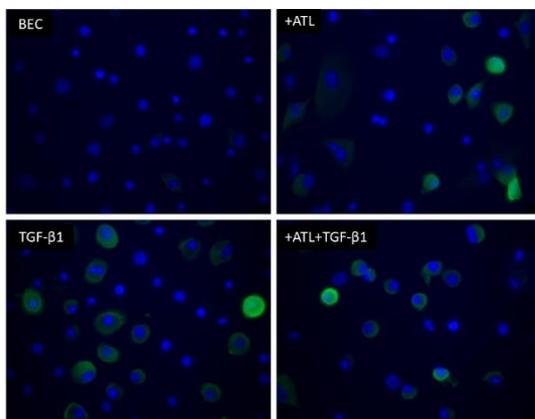
A.



B.



C.



D.

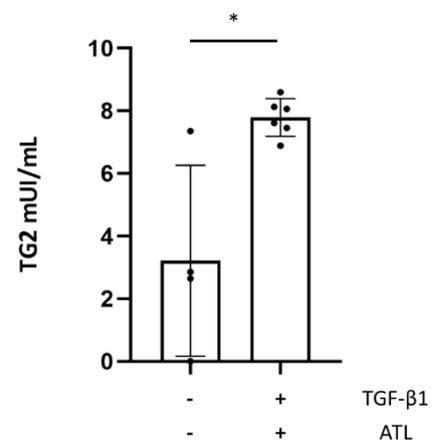


Figure 6. TG2 expression and activity in the allogenic *in vitro* model of human primary BECs exposed to TGF- β 1 and activated allogenic T lymphocytes (ATL). (A) mRNA expression of TG2 detected by quantitative PCR (n=6). (B) TG2 protein expression at day 5 of co-culture detected with anti-human TG2 by Western blot with one representative blot (n=7). (C) TG2 cross-linking activity detected with fluorescent T26 peptide (green). DAPI (blue). Day 5 of culture. (D) TG2 enzymatic activity analysed *in vitro* from BEC lysates treated or not with ATL and TGF- β 1. *p<0.01

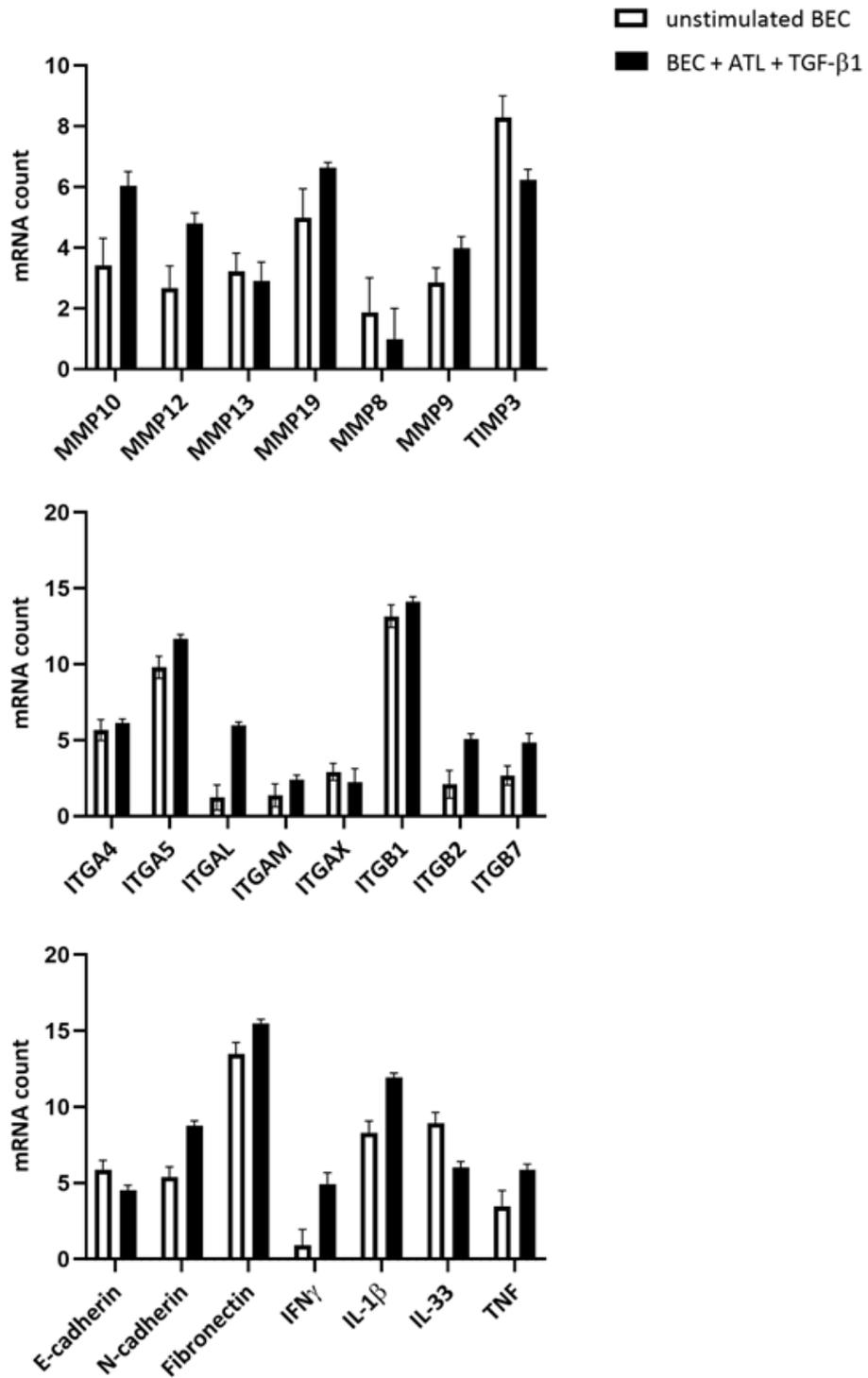
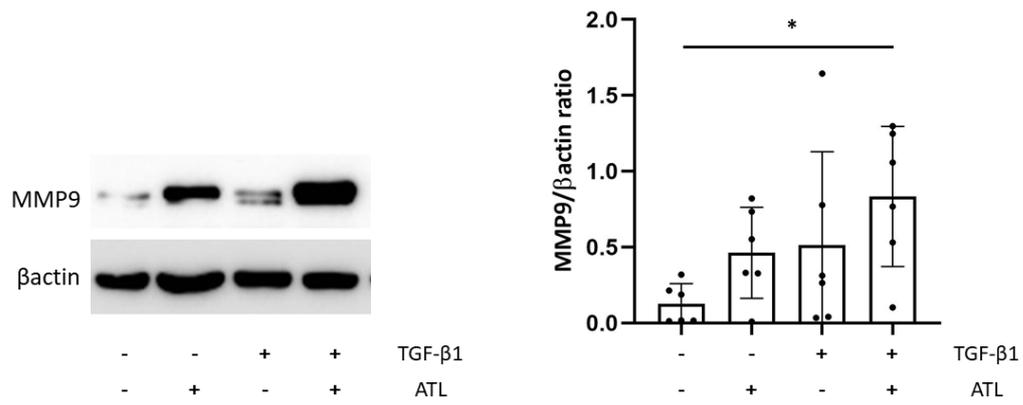
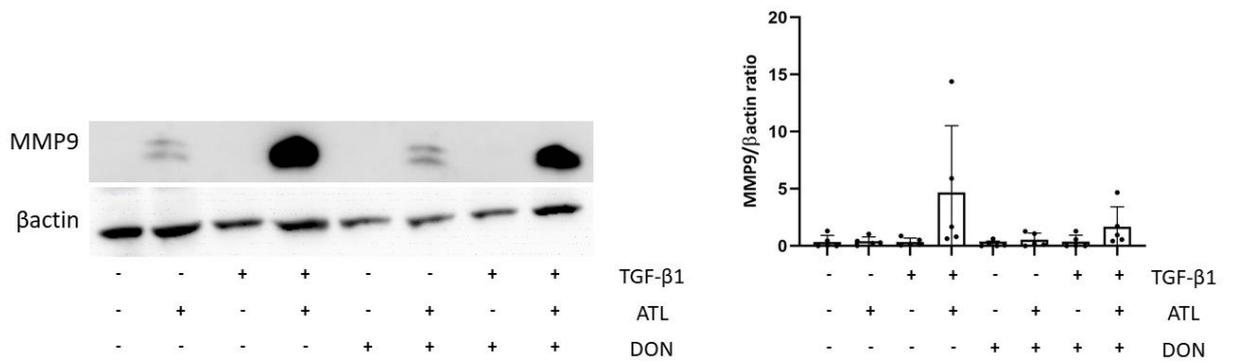


Figure 7. Transcriptomic expression of bronchial epithelial cells (BEC) unstimulated or exposed to allogenic T lymphocytes (TL) and TGF-β1 for 24 hours.

A.



B.



C.

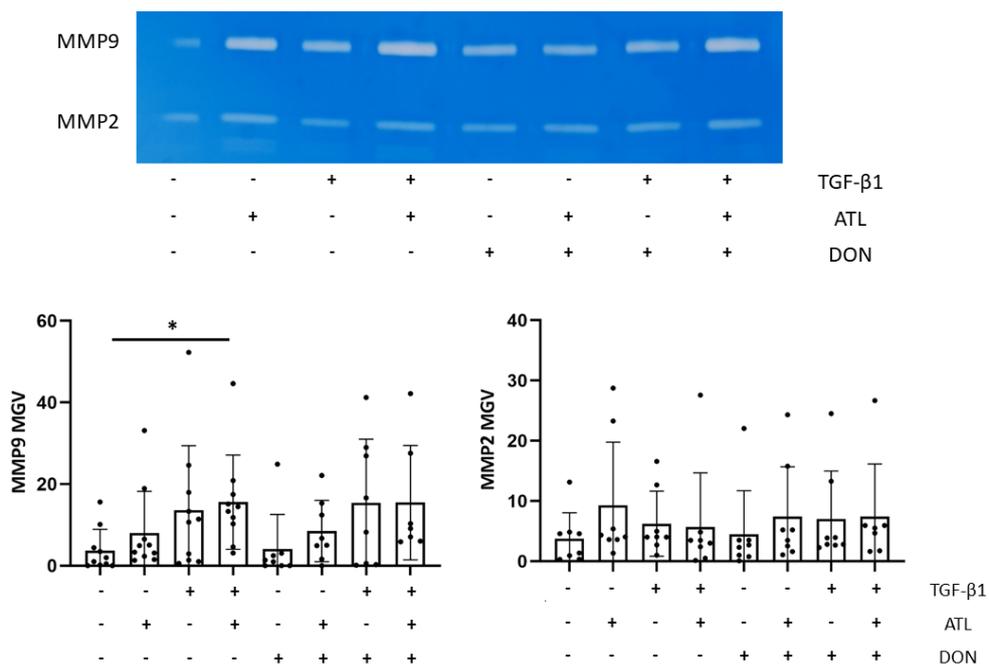


Figure 8. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is involved in the fibrotic process in the cellular model of human primary epithelial cell exposed to TGF- β 1 (TGF) and allogenic T lymphocytes (ATL). (A) MMP-9 protein expression by western blot analysis. (B) MMP-9 protein expression by western blot analysis with addition of transglutaminase 2 enzymatic inhibitor DON. (C) Gelatinase activity of MMP-9 and MMP-2 assessed by zymography, results are expressed in mean grey value (MGV).

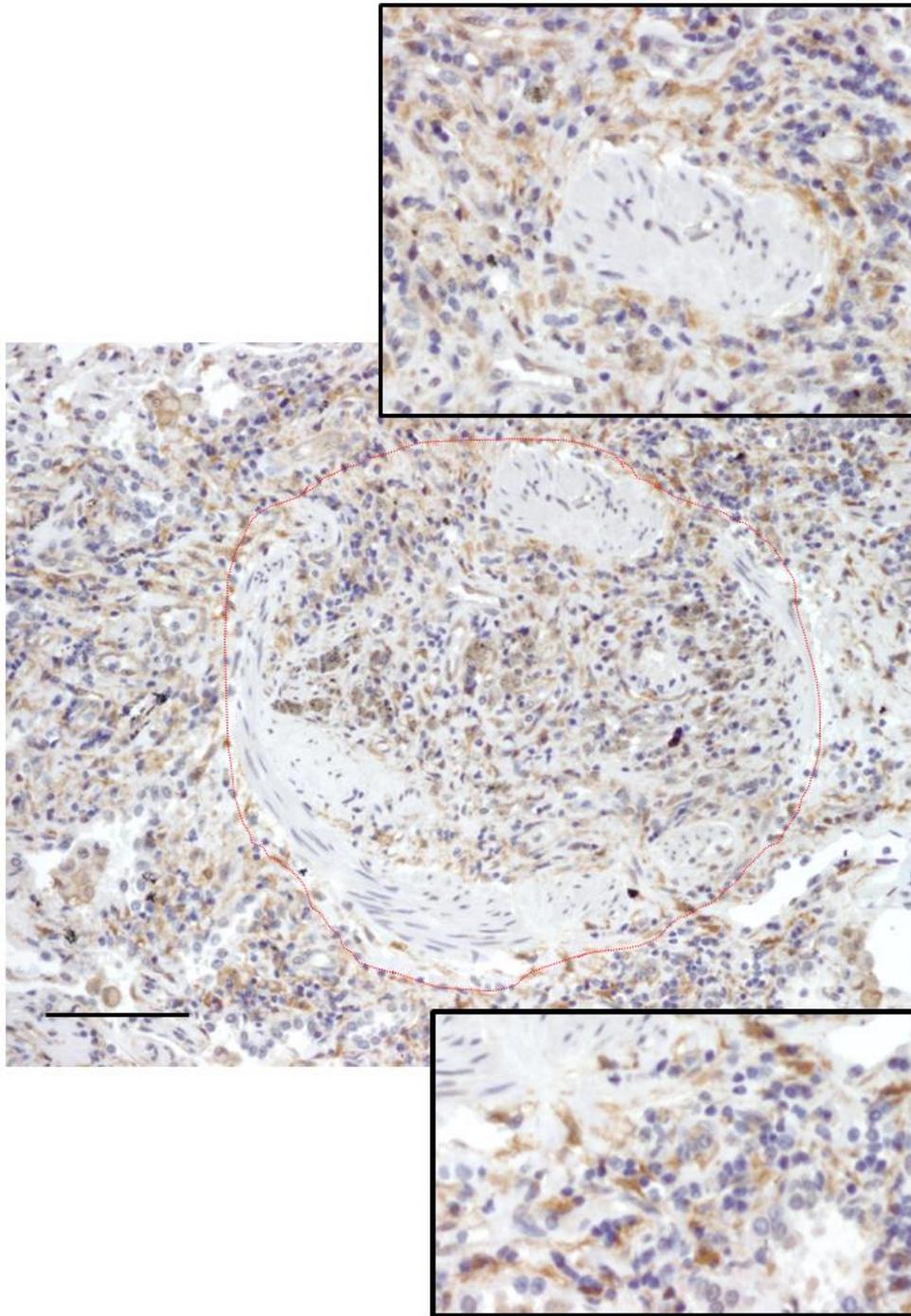
TG2 is overexpressed in chronic lung allograft dysfunction and its inhibition reduces MMP-9 expression

Supplemental material

Supplemental 1. COLT constitution and protocol

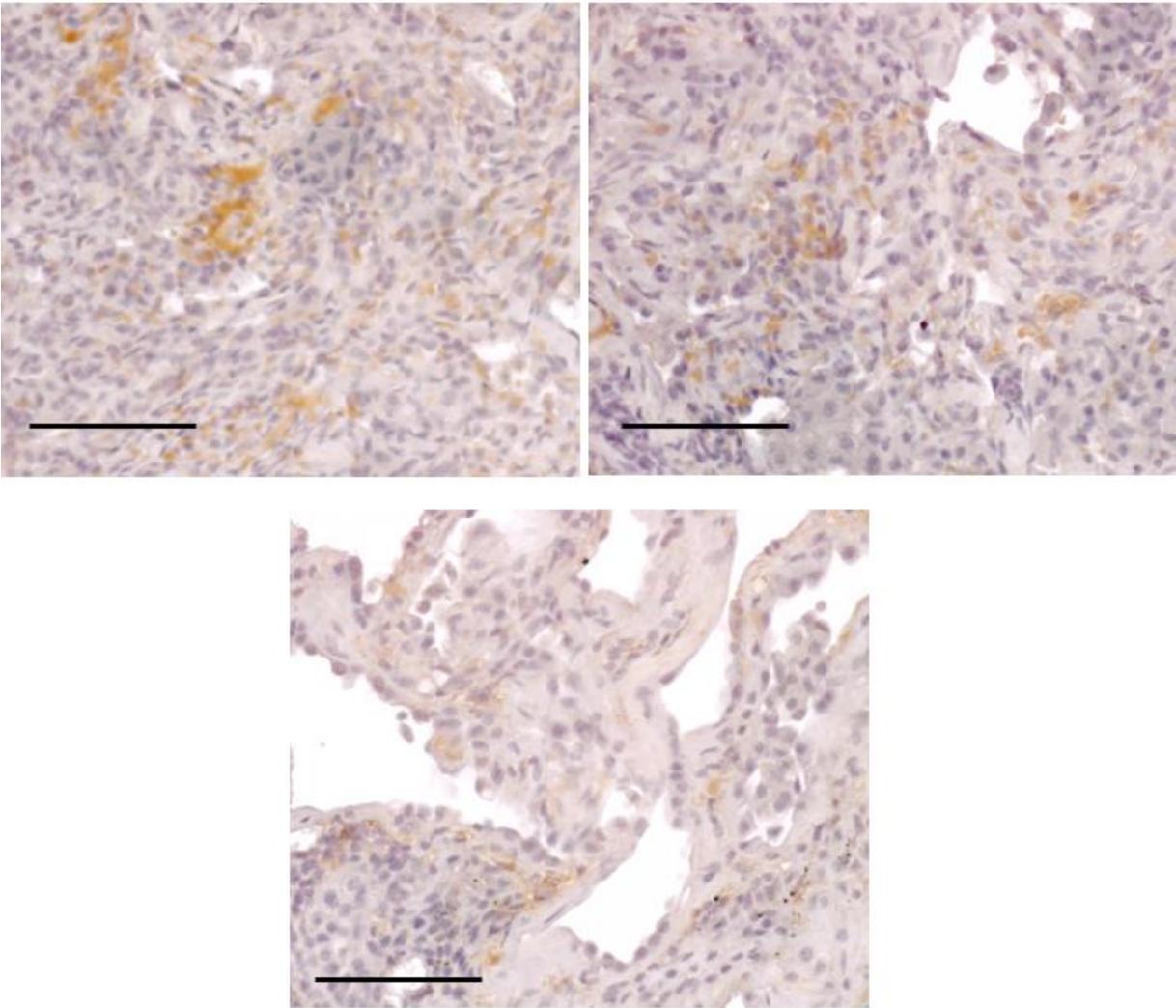
COLT is a prospective multicentric cohort study of CLAD development in patients followed-up 10 years post transplantation. All French lung transplantation teams plus the Belgium center of Brussels do participate. The cohort protocol involves planned follow-up visit every 6 months in which clinical, biological and functional data are implemented. The protocol received the approval of the Ethic Committee on 24th February 2009, and the authorization from the French regulatory authority (AFSSASP/ANSM) on 5th February 2009. The protocol is also registered to the CNIL (French national committee for data processing and liberties) and approved on 16th September 2011. The University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks approved this study. Inclusions started in September 2009 and stopped in December 2018. Patients without a social insurance, unable to follow the protocol or to give an informed consent were not included, as nursing or pregnant women or patients with a concomitant inflammatory disease.

Supplemental 2



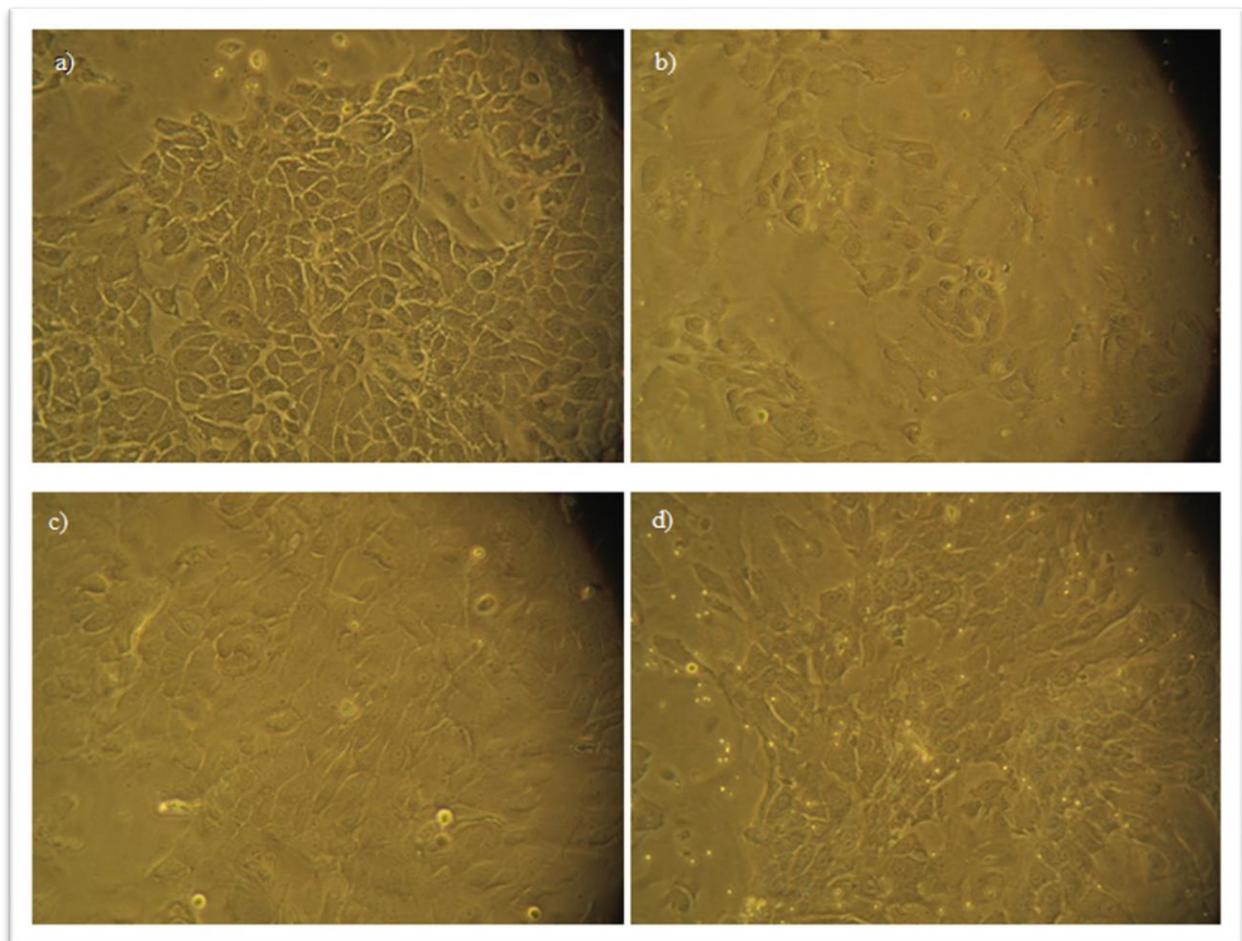
Immunohistological staining for transglutaminase 2 (TG2). Sample from lung explants retrieved at the time of transplantation with chronic lung allograft dysfunction (bronchiolitis obliterans syndrome phenotype). Area represented a specific lesion of bronchiolitis obliterans. Circled zone in red corresponding to the obliterated small airway with fibrotic tissue and inflammatory cells. Scale bar = 100 μ m

Supplemental 3



Immunohistological staining for transglutaminase 2 (TG2). Sample from lung explants retrieved at the time of transplantation with idiopathic pulmonary fibrosis phenotype). Scale bar = 100µm

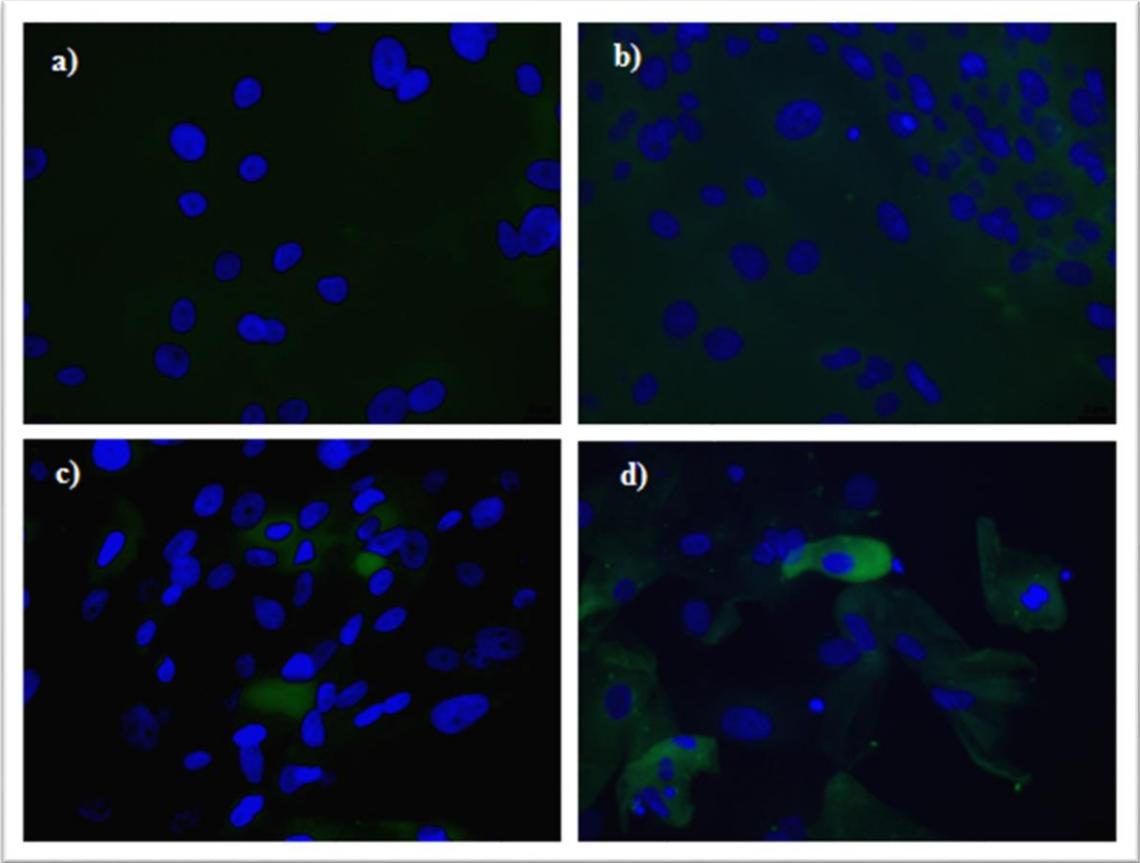
Supplemental 4



Optical microscopic aspect of cellular model under different treatments

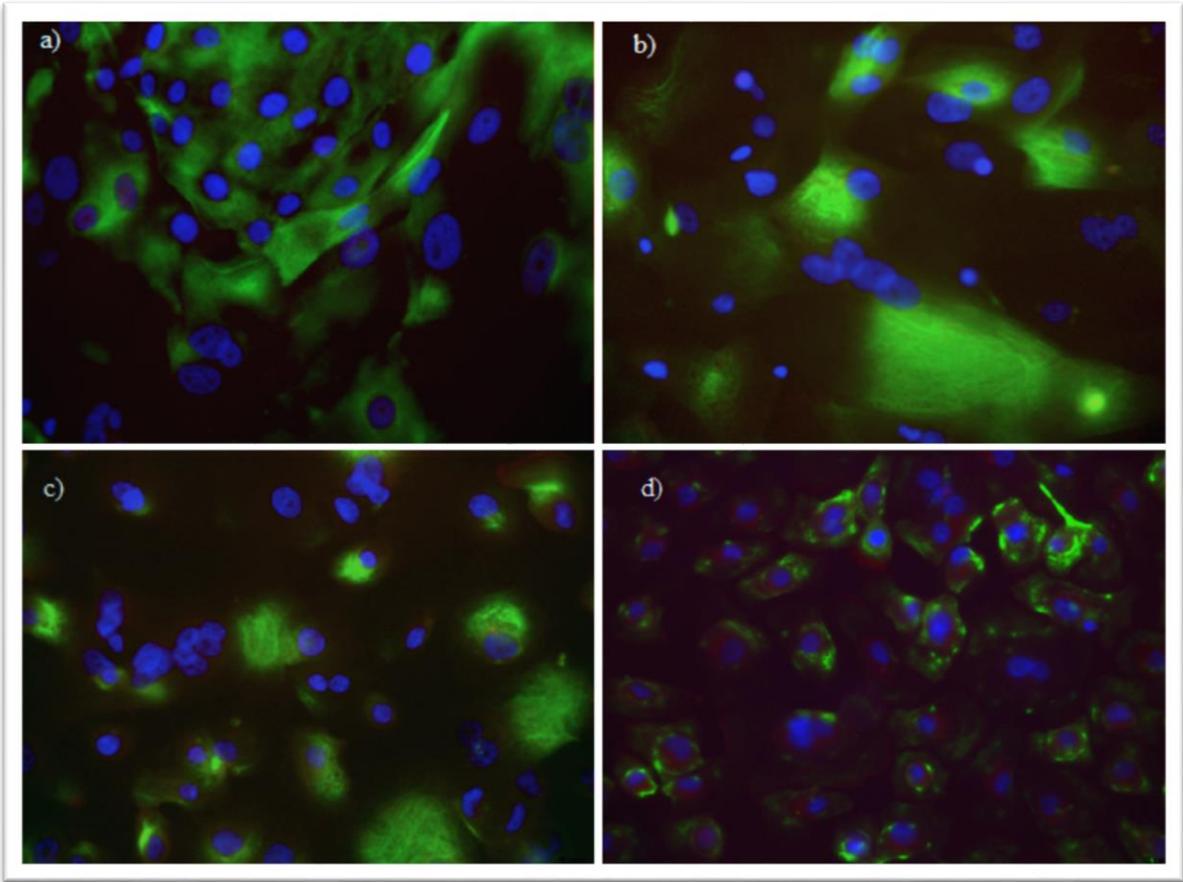
a) BEC alone ; b) BEC and activated TL ; c) BEC and TGF- β 1 ; d) BEC and activated TL and TGF- β 1. 20X. Cells are not joined and exhibit similar characteristics than fibroblasts in d). BEC: bronchial epithelial cell. TL: T lymphocytes.

Supplemental 5



Immunofluorescence in different culture conditions with fibronectin staining (green) and DAPI (blue). a) BEC alone ; b) BEC and activated TL ; c) BEC and TGF-β1 ; d) BEC and activated TL and TGF-β1. 40X. BEC: bronchial epithelial cell. TL: T lymphocytes.

Supplemental 6



Immunofluorescence in different culture conditions with cyokeratin staining (green), alpha smooth actin (red) and DAPI (blue) a) BEC alone ; b) BEC and activated TL ; c) BEC and TGF-β1 ; d) BEC and activated TL and TGF-β1. 40X. BEC: bronchial epithelial cell. TL: T lymphocytes.

Supplemental 7

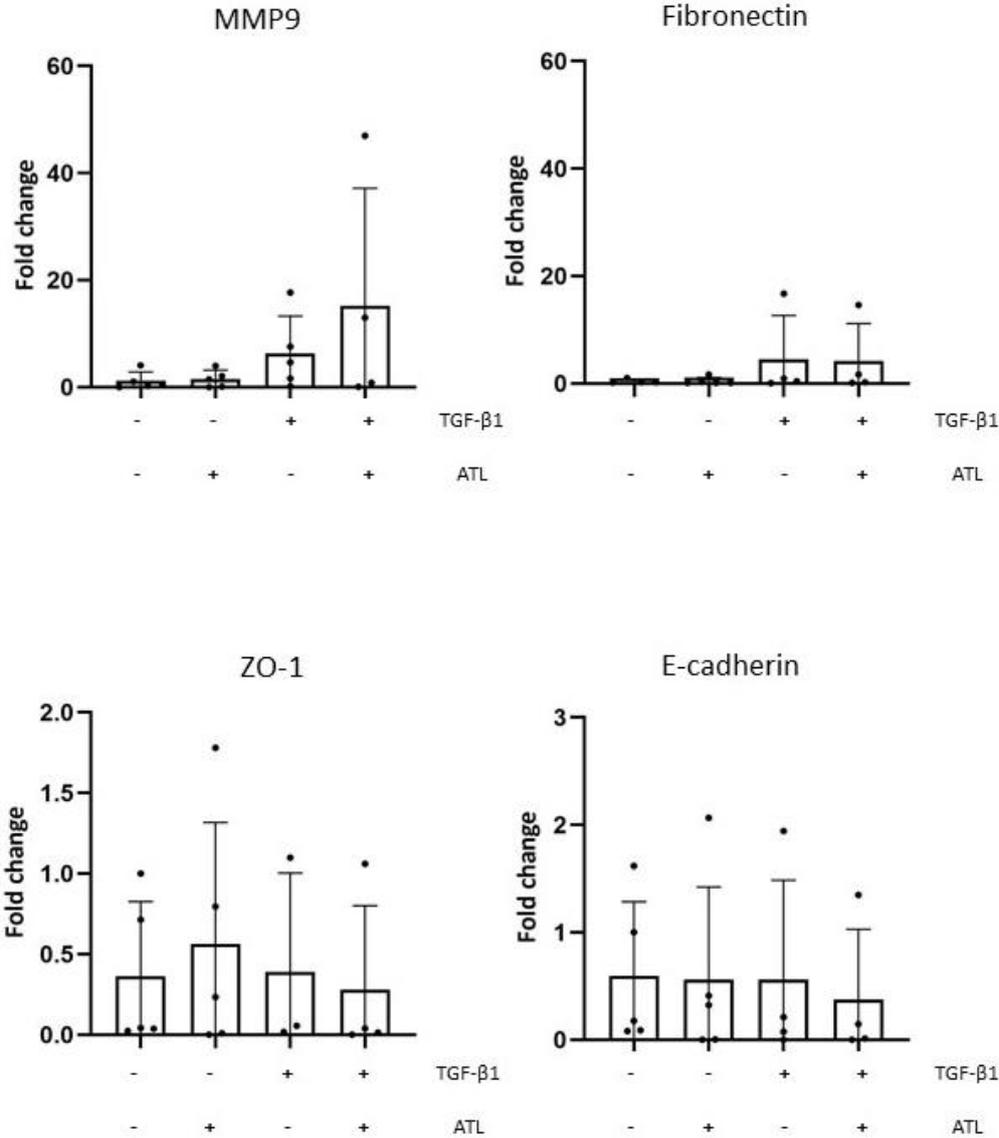


Figure 7. Expression of epithelial, mesenchymal and extra-cellular matrix markers by BECs following exposition to T lymphocytes and TGF-β1. Quantitative polymerase chain reaction for MMP9, fibronectin, ZO-1 and E-cadherin. Results expressed in fold change using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. BEC: bronchial epithelial cell. ATL: activated T lymphocytes

B. Le taux de MMP-9 plasmatique mesuré à 2 ans post Tx est un marqueur pronostique de la survenue d'une DCG.

La MMP-9 ainsi que d'autres MMPs ont été identifiées depuis longtemps comme des acteurs importants de la physiopathologie de la DCG. Elles possèdent une capacité protéolytique des constituants principaux de la MEC comme le collagène ou la fibronectine. Cette fonction permet de comprendre leur rôle indispensable dans remodelage de la MEC, phénomène constaté dans la plupart des processus fibrosants. Plusieurs travaux ont pu identifier MMP-9 dans le LBA comme un biomarqueur diagnostique de la DCG voire prédictif dans certains cas. Ces données cependant ne reposent que sur des effectifs restreints et aucune donnée solide n'existe en ce qui concerne le potentiel prédictif de la MMP-9 plasmatique. Le compartiment sanguin permettrait d'envisager en effet une surveillance non invasive, ce qui n'est pas le cas du LBA, impliquant la réalisation d'une endoscopie bronchique. Nous rapportons dans l'étude ci-dessous le potentiel pronostique de la MMP-9 sanguine dosée à 1 an et à 2 ans post-transplantation en ce qui concerne la survenue de la DCG.

1. Résumé en français

a. Contexte

Les résultats à long terme de la transplantation pulmonaire restent limités par la DCG. MMP-9 est une endopeptidase identifiée comme un médiateur clé dans les processus de fibrose associés à la DCG. L'objectif de cette étude est d'explorer si la MMP-9 plasmatique peut être pronostique du développement de la DCG.

b. Méthodologie

Les patients ont été sélectionnés à partir de la cohorte COLT (Cohort in Lung Transplantation) pour laquelle une biocollection est associée. Nous avons envisagé 2 temps pour les mesures de MMP-9 plasmatique, à 1 an (Y1) et à 2 ans (Y2) après transplantation. Nous avons analysé des patients stables à ces temps là en comparant ceux qui allaient développer une DCG dans les 2 ans suivant la mesure (DCG) à ceux qui restaient stable 2 ans après (Stable).

c. Résultats

Les niveaux de MMP-9 à Y1 n'étaient pas différents significativement entre les groupes DCG et Stables (230ng/ml vs 160ng/ml, p=0.4). Pour l'analyse Y2, 129 receveurs ont été inclus dont 50 ont développé une DCG dans les 2 ans et 79 sont restés stables. La concentration plasmatique médiane de MMP-9 était plus élevée chez les receveurs qui allaient développer une DCG en comparaison du groupe Stable (230ng/ml vs 118ng/ml, p=0.003). Sur l'analyse multivariée Y2, le taux de MMP-9 était associé de façon indépendante avec la DCG avec une augmentation moyenne de 150ng/ml (95%CI [0-253], p=0.05). La courbe ROC Y2 révèle une capacité discriminative de la MMP-9 sanguine avec une aire sous la courbe de 66%.

d. Conclusions

La MMP-9 plasmatique mesurée à 2 ans après transplantation à une valeur pronostique pour la DCG.

1. Article en anglais

Blood MMP-9 measured at two-year post lung transplantation as a prognostic biomarker of chronic lung allograft dysfunction.

Adrien Tissot, MD,¹ Eugénie Durand,² Thomas Goronflot,³ Benjamin Coiffard, MD, PhD,⁴ Benjamin Renaud-Picard, MD, PhD,⁵ Antoine Roux, MD, PhD,⁶ Xavier Demant, MD,⁷ Jean-François Mornex, MD, PhD,⁸ Loïc Falque, MD,⁹ Mathilde Salpin, MD,¹⁰ Jérôme Le Pavec, MD, PhD,¹¹ Thomas Villeneuve, MD,¹² Véronique Boussaud, MD,¹³ Christiane Knoop, MD,¹⁴ David Lair, PhD,¹⁵ Laureline Berthelot, PhD,² Richard Danger, PhD,², Sophie Brouard, PhD,²; the COLT consortium.

¹Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, Service de Pneumologie, l'institut du thorax, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology (CR2TI), UMR 1064, Nantes, France

² Nantes Université, CHU de Nantes, Inserm, Centre de Recherche Translationnelle en Transplantation et Immunologie (CR2TI), Nantes, France

³Nantes Université, CHU Nantes, Pôle Hospitalo-Universitaire 11 : Santé Publique, Clinique des données, INSERM, CIC 1413, Nantes, France

⁴Aix Marseille Univ, Department of Respiratory Medicine and Lung Transplantation, APHM, Hôpital Nord, Marseille, France

⁵Department of Respiratory Medicine and Strasbourg Lung Transplant Program, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; Université de Strasbourg, Inserm UMR 1260, Strasbourg, France

⁶Pneumology, Adult Cystic Fibrosis Center and Lung Transplantation Department Hôpital Foch, Suresnes, Université de Versailles Saint Quentin Paris-Saclay, INRAE UMR 0892, Paris Transplant Group, Paris, France

⁷Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Pessac, France

⁸Université de Lyon, Université Lyon 1, PSL, EPHE, INRAE, IVPC, hospices civils de Lyon, groupement hospitalier est, service de pneumologie, Orphalung, RESPIFIL Lyon, France

⁹Service Hospitalier Universitaire de Pneumologie et Physiologie, CHU Grenoble Alpes, Pôle Thorax et Vaisseaux, Grenoble, France

¹⁰APHP Nord-Université Paris Cité, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie B et Transplantation Pulmonaire, Université Paris Cité, PHERE UMRS 1152, Paris, France

¹¹Service de Pneumologie et Transplantation Pulmonaire, Groupe hospitalier Marie-Lannelongue -Saint Joseph, Le Plessis-Robinson, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, UMR_S 999, Université Paris-Sud, INSERM France

¹²CHU Toulouse, Service de Pneumologie, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France

¹³APHP, Service de Pneumologie, Hôpital Cochin, Paris, France

¹⁴Service de Pneumologie, CHU Erasme, Bruxelles, Belgium

¹⁵CHU Nantes, Nantes Université, Institut du thorax, Lung O2, Nantes, France

Corresponding author

Adrien Tissot, Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, 44093 Nantes Cedex. Phone :+33240165231, Email : adrien.tissot@chu-nantes.fr

Running Title : MMP-9 as prognostic biomarker of CLAD

Abbreviations

ARAD: azithromycin-responsive allograft dysfunction

AUC: area under curve

BAL: broncho-alveolar lavage

BOS: bronchiolitis obliterans syndrome

CLAD: chronic lung allograft dysfunction
COLT: cohort in lung transplantation
COPD: chronic obstructive pulmonary disease
ILD: interstitial lung disease
LTx: lung transplantation
MMP-9: matrix metalloproteinase 9
PR: precision-recall
RAS: restrictive allograft syndrome

Word count : 2820

Abstract

Background: lung transplantation (LTx) long term outcomes remain hampered by chronic lung allograft dysfunction (CLAD). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is a secretory endopeptidase identified as a key mediator in fibrosis processes associated with CLAD. The objective of this study was to investigate whether if MMP9 plasma level may be prognostic of CLAD development.

Methods: Participants were selected among the Cohort in Lung Transplantation (COLT) for which a biocollection was associated. We considered two time points, year 1 (Y1) and year 2 (Y2) post transplantation, for plasma MMP-9 measurements. We analysed stable recipients at those time points comparing those who will develop a CLAD within the 2 years following the measurement to those who will remain stable 2 years after.

Results: MMP-9 levels at Y1 were not significantly different between the CLAD and Stable groups (230ng/ml vs 160ng/ml, $p=0.4$). For the Y2 analysis, 129 recipients were included of whom 50 developed CLAD within 2 years and 79 remained stable within 2 years. MMP-9 plasma median concentrations were higher in recipients who then developed CLAD as compared to the Stable group (230ng/ml vs 118ng/ml, $p=0.003$). On multivariate analysis Y2 MMP-9 level was independently associated with CLAD with an average increase of 150ng/ml (95%CI [0-253], $p=0.05$) as compared to Stable group. The Y2 ROC curve revealed a discriminating capacity of blood MMP-9 with an area under the curve of 66%.

Conclusion: Plasmatic MMP-9 level measured two years after lung transplantation has a prognostic value for CLAD.

Introduction

Lung transplantation (LTx) has the potential to bring survival benefit and improve quality of life in selected candidates^{1,2}. However, long term outcomes remain low with an overall survival of 63% at 5 years post transplantation³. The main long term limitation is chronic lung allograft dysfunction (CLAD) which is responsible for most deaths after the first post-transplant years⁴. A large part of CLAD pathophysiology remains unclear but significant advances have been made to better understand the two clinically and functionally well-defined phenotypes of CLAD: the bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and the restrictive allograft syndrome (RAS). Briefly, repeated injuries of the airway epithelium, the alveoli or lung endothelial cells result in chronic inflammation, wound healing, recruitment and proliferation of fibroblasts and aberrant deposition of extra-cellular matrix leading ultimately in small airway fibrotic obliteration in BOS and in alveolar fibro-elastosis in RAS⁵. CLAD risk stratification of LTx recipients is presently an unmet need. A multisystemic approach is certainly the way forward in a highly complex situation in which immunology, medications, environment and patient's behaviours have an important impact on outcomes. Matrix metalloproteinases (MMP) are a family of zinc-dependant endopeptidase involved in the degradation of various proteins of the extracellular matrix. MMPs play a role in tissue remodelling during various physiological processes such as angiogenesis, embryogenesis, morphogenesis and wound repair, as well as in pathological conditions such as fibrotic disorders and cancer. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is part of the gelatinase subfamily which have a distinct collagen-binding domain. It can be secreted by a variety of cells including epithelial cells, fibroblasts, macrophages and T cells⁶. MMP-9 has been identified as a key mediator in processes associated with CLAD such as extracellular matrix reorganization, cell migration, epithelial to mesenchymal transition and immune response⁷. Interestingly, MMP-9 is an old suspect in BOS and several works has found increase gelatinolytic activity and/or MMP-9 concentrations in broncho-alveolar lavage (BAL) from recipients with BOS⁸⁻¹¹. Two studies reported almost 6 months before diagnosis of BOS increase BAL MMP-9 activity^{12,13}. However, MMP-9 relevance in peripheral blood remains debated whereas the clinical need for minimally invasive biomarker of CLAD is high¹⁴. Previous data from our group showed that blood MMP-9 levels could be higher in CLAD recipients¹⁵. In order to set an evaluation of CLAD risk factors which could enable preventive

intervention, we considered the following time points of analysis: one and two years post transplantation. Our objective in this study is to validate if plasma MMP-9 levels at one-year and two-year post transplantation are able to predict future CLAD onset.

Materials and Methods

Participants

Lung transplant recipients (LTRs) were recruited within the multicenter COhort in Lung Transplantation [COLT], NCT00980967) study (Comité de Protection des Personnes Ouest 1-Tours, 2009-A00036-51). The study was approved by the local ethical committee, and all participants provided written informed consent. The COLT study protocol was previously described (supplemental 1) ¹⁶. Briefly, participants were included in the cohort before transplantation. Planned visits were at the time of transplantation and then every 6 months up to 5 years post transplantation. Blood samples were taken at each visit. This study complies with the International Society for Heart and Lung Transplantation statement on Transplant Ethics.

Clinical phenotype

All patients within the COLT study underwent individual phenotyping by an adjudication committee which gathered at least 5 investigator physicians from the different participating centres. Pulmonary function tests, relevant chest computed tomography and medical history, especially potential confounding factors were reviewed for a collegial decision on phenotype initially based on the 2014 proposed classification, then on the 2019 ISHLT consensus report on CLAD ^{17,18}. Recipients were classified as followed: BOS, RAS, azithromycin responsive allograft dysfunction (ARAD), Stable and Other (death before 3-months post transplantation, death without CLAD, insufficient data to conclude or confounding factors).

Design of the study and recipient's selection.

The objective of this study was to evaluate MMP-9 blood level ability to prognostic CLAD. We designed a comparative analysis of plasma MMP-9 concentrations at year 1 post transplantation (Y1) between stable recipients at this time point who will develop CLAD within two years (*i.e.* by 3 years post transplantation) and those who remained without CLAD for the same two years follow-up (Stable). Similarly, we designed a comparative analysis of plasma MMP-9 concentrations at year 2 post transplantation (Y2) from stable recipients at this time point comparing those who will developed CLAD within two years of the sampling (*i.e.* by 4 years post transplantation) and those who remained stable (figure S1).

For this purpose, we identified every COLT participant with stable lung function at Y1 for whom we had a plasma sample available and we then selected those who presented a CLAD phenotype by year 3. Then, we matched up to 2 Stable controls for each CLAD recipient on age at transplantation and gender (variable ratio matching) (figure 1). We excluded COLT participants who were not transplanted, recipients with other phenotypes and those with no phenotype. We also excluded recipients who were included in our previous MMP-9 analysis (n=94)¹⁵. According to the study design, recipients who developed CLAD before one-year post transplantation were not included in the Y1 analysis (n=35) and similarly recipients who developed CLAD before 2 years post transplantation were not included in the Y2 analysis (n=124). Flowcharts are represented in figure 1 for the Y1 analysis and figure 2 for the Y2 analysis. Overall, median follow-up time from LTx was 45 months.

MMP-9 detection

All plasma samples were obtained in heparined tubes, stored at -80°C in Nantes University Hospital Biological Resource Center and never thawed before use. MMP-9 concentrations were determined with the quantitative MMP-9 Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, BMS2016-2) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

For descriptive analysis, normally distributed continuous variables were summarized by mean plus standard deviation, whereas non-normally distributed continuous variables were summarized using median and interquartile range (IQR). Categorical variables were presented with effective and percentage of modalities. We used usual statistical tests to compare distributions between two groups (Student's t-test, Mann-Whitney-Wilcoxon test and Fisher exact test, respectively). Missing values were systematically presented. No imputation was performed.

To assess whether MMP-9 could be prognostic of CLAD, we only consider measures which have been made before the diagnosis. In addition, we have drawn the ROC and Precision-Recall (PR) curves to investigate with appropriate metrics if MMP-9 concentrations could be relevant in predicting CLAD in these patients. The confidence interval of the ROC Area Under the Curve (AUC) and PR-AUC was computed using 3000 bootstrap iterations of the corresponding study sample. Finally, a multivariate linear regression model was fit to explain MMP-9 concentrations at Y1 by the status regarding CLAD 2 years after, plus susceptible confounders identified by a group of clinicians. Additional description of variables of interest are provided in supplemental 3. We also fitted a model for MMP-9 concentrations at Y2 explained by the status regarding CLAD 2 years after, plus the same confounders. Due to a lack of data, we were unable to split our dataset into trainset and testset. Analyses were performed using R package version 4.2.2, especially using *tidyverse* package for data manipulation and visualisation, and also *tidymodels* for predictive modeling.

Results

Prognostic value of MMP-9 at Y1

190 Stable recipients were included for the analysis of MMP-9 at Y1 post transplantation of whom 86 developed CLAD (68 BOS, 9 RAS and 9 mixed) and 104 remained Stable within the next 2 years (figure 2). Pre-transplant characteristics, per-transplantation data and early post transplantation outcomes (within the first year post Tx) are presented in table 1. The distribution of underlying disease was significantly different between Stable and CLAD group with less patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)/emphysema and more with interstitial lung disease (ILD) and Other diagnosis in the CLAD group ($p=0.01$). Median

height was lower in the CLAD group (165 cm vs 168 cm, $p=0.05$) and more patients in the Stable group had pre Tx pulmonary colonization to *Candida Albicans* (37% vs 18%, $p=0.04$). There was also less recipients in the CLAD group who benefited from an induction treatment after transplantation (70% vs 84%, $p=0.03$). Finally, there was a tendency for an increased number of experienced acute cellular rejections in the CLAD group (43% vs 30%, $p=0.08$). The 2 groups were comparable in terms of gender, age, type of procedure, donor and graft characteristics or infection post transplantation outcomes.

Before transplantation, MMP-9 levels were statistically similar in both CLAD and Stable group (386ng/ml $IQR[174-757]$ vs 349ng/ml $IQR[162-822]$, $p=0.8$). MMP-9 plasmatic median concentration at Y1 was 237ng/ml $IQR[72-551]$ for recipients who developed CLAD within the next 2 years and 165ng/ml $IQR[75-317]$ for those who remained stable (figure 3). The difference was not significant ($p=0.2$). Also, there was no significant difference according to CLAD phenotype (figure S2). We also distinguished in this analysis those who developed CLAD within the year that follow the Y1 measurement (sample close to CLAD) and those who developed CLAD at least one year after (sample distant from CLAD). In this setting, MMP-9 blood concentration was slightly higher when sample was close to CLAD as compared to sample distant from CLAD diagnosis (248ng/ml vs 225ng/ml, $p=0.9$) (figure 3). The multivariate analysis revealed that CLAD phenotype was associated with an increase of MMP-9 plasma level, however not reaching statistical significance (average increase of 126, 95%CI [-32 – 284], $p=0.1$) (table 2). To test the discriminating capacity of Y2 MMP-9 blood measurement for CLAD prediction we performed a PR curve which showed an AUC of 53% (95%CI [43-65]). For the ROC curve we found an AUC of 55% (95%CI [47-63]) (figure S3).

Prognostic value of MMP-9 at Y2

For this analysis, 129 LTx recipients were included of whom 50 developed CLAD and 79 remained Stable within the next 2 years (*i.e.* up to 4 years post transplantation) (figure 2). To note, one patient was initially adjudicated as ARAD (and thus, not included in the Stable group) but later developed CLAD and was included in the CLAD Y2 group. Pre transplantation characteristics, per transplantation data and early post transplantation outcomes are presented in table 3. Few differences can be noted as compared to the Y1 analysis. Underlying diseases were not differently distributed between CLAD and Stable and there was no difference in recipient's height. Interestingly, there were more CLAD patients with

pre Tx colonization with *Pseudomonas Aeruginosa* (46% vs 27%, $p=0.04$) and less with *Candida Albicans* (16% vs 37%, $p=0.02$). The 2 groups were comparable in terms of gender, age, type of procedure, donor and graft characteristics, infection and acute rejection outcomes post transplantation.

Before transplantation, MMP-9 levels was 419ng/ml IQR[242-675] in CLAD and 345ng/ml IQR[162-861] in Stable group ($p=0.6$). Interestingly, MMP-9 plasmatic median concentration at Y2 was significantly higher for recipients who developed CLAD within the next 2 years as compared to those who remained stable (230ng/ml IQR[105-376] vs 118ng/ml IQR[64-218], $p=0.003$) (figure 4). BOS, RAS and mixed MMP-9 values were all above the Stable group but the difference was significant only for recipients with RAS (265ng/ml vs 119 ng/ml, $p=0.02$) (figure S4). Among the CLAD group, those with a sample close to CLAD diagnostic date (within one year of measurement) had a higher blood MMP-9 level as compared to those with a sample distant to CLAD (at least one year after measurement) (224ng/ml vs 182ng/ml, figure 4). On the multivariate analysis, MMP-9 higher levels at Y2 was independently and significantly associated with future CLAD diagnosis (estimate increase of 151ng/ml, 95%CI [20-281], $p=0.02$) (table 2). The only other factor for which a significant difference was observed was the pre transplantation colonization with *Candida Albicans* which resulted in an average increase in MMP-9 concentration at Y1 of 129ng/mL (95%CI [2-257], ($p=0.04$) (table 3). To test the discriminating capacity of Y2 MMP-9 blood measurement for CLAD prediction we performed a PR curve which showed an AUC of 53% (95%CI [43-65]). For the ROC curve we found an AUC of 66% (95%CI [56-75]) (figure 5). The prognostic power of blood MMP-9 can be seen in higher values. For example, a MMP-9 blood level higher than 314 ng/ml in our cohort enable to identify 40% of CLAD (recall or sensitivity) with a precision (positive predictive value) of 65%.

Discussion

We report in this study increased MMP-9 plasma concentrations at two years post transplantation in patients who are perfectly functionally stable at that time but who will develop a CLAD as compared to recipients who remained stable. On a smaller set of patients, our team with a different methodology in which the reference time point was CLAD diagnosis, found increased levels of plasma MMP-9 one year before CLAD diagnosis as compared to recipients without CLAD ¹⁵. It was however essential to validate the prognostic

potential of blood MMP-9 in a setting that could enable risk stratification and thus therapeutic intervention. To do that, we chose two post-transplantation time points, Y1 and Y2, that have clinical relevance because they are sufficiently distant from the lung transplantation surgery, early infection and immune complications that could strongly interfere on inflammatory or wound-healing-related biomarkers but also early enough regarding the time of CLAD onset to allow early intervention in the lung transplant population. The Louven group indeed described a median time of CLAD onset of 3.2 years post transplantation and in a north american population, Kulkarni *et al* reported a median BOS-free survival of 3.6 years for double lung transplant recipients^{19,20}. The only study that evaluated prospectively MMP-9 levels after transplantation was performed by Kastelijn *et al* on 10 LTx recipients who developed BOS and 10 matched controls recipients without BOS. They found that the MMP-9 median concentrations of all serial samples were significantly higher in BOS patients (190ng/ml (163 - 238) versus 128ng/ml (106 - 162), $p < 0.0001$) but longitudinal analysis of MMP-9 serum levels from the time of transplantation onwards did not reveal a significant difference in serum levels in the period preceding BOS²¹. More recently, a study using a high-component multiplex immunoassay identified in a set of patients (n=46), MMP-9, among other proteins, as a diagnostic biomarker of BOS. This finding was confirmed on another set of patients from different centres by ELISA⁸. In the different context of BOS related to chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation, plasma MMP-9 was also found at a higher concentration in 33 patients with BOS at the time of diagnosis as compared to 60 recipients without BOS and elevated MMP-9 was thought to be associated with treatment failure and worse prognosis²². In the literature, more data are available for MMP-9 in BAL. In a cohort of 45 recipients, Vandemeulen *et al.* found that MMP9 levels were increased in RAS and BOS at the time of diagnosis²³. Similarly, Heijink *et al.* have found increased levels of MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 and the MMPs endogenous inhibitor TIMP1, in this case again, at the time of diagnosis¹¹. Older works have shown predictive potential of MMP-9 in BAL in relatively smaller cohort of less than 25 patients and not at a pre-specified time point that could apply in real-life surveillance^{12,13}. Thus, regarding all those data, we are the first to describe blood MMP-9 levels, in a large cohort of LTx recipients, as prognostic of CLAD onset with a 66% AUC on the ROC analysis and 53% on the PR analysis. Those figures may appear as low, likely due to the high variability of MMP-9 blood levels within each group of patients. Whereas

remaining a limitation, if considered alone for a given patient, no parameter use at present, actually enable prognostic of CLAD. Also, one important point is that given the time points chosen, one and two years for MMP-9 measurement, early CLAD (before one-year post transplantation) were not in the spectrum of this study. To answer those limitations, first, we would not consider MMP-9 “alone” to be used as a predictive biomarker of CLAD but this work clearly demonstrates its potential to increase the efficiency of a CLAD multidimensional score. As it is, our group has previously reported a blood gene expression analysis in which we identified three genes, POU class 2 associating factor 1, T-cell leukemia/lymphoma protein 1A and B cell lymphocyte kinase, which were validated as predictive biomarkers of BOS more than 6 months before diagnosis ²⁴. We also found differential T and B lymphocytes phenotyping between CLAD and stable recipients, again upstream CLAD diagnosis ^{25,26}. Analysis of those potential biomarkers with blood MMP-9 at this specific Y2 time point in particular will be of interest in the ongoing new prospective multicentric study to build multidimensional risk stratification for CLAD, along with demographic, clinical and environmental data (PRELUD study, NCT03967340).

Conclusion

We described here in a large cohort, the interesting prognostic potential of blood MMP-9 measured at one and two years post transplantation. The implementation of this mini-invasive biomarkers into a multidimensional score, along with transcriptomic and immune phenotyping has the potential to bring an efficient risk-stratification tool to patients and clinicians.

Authors Contribution: A.T., R.D. and S.B. developed concept and designed experiments. E. D. processed samples and performed experiments. A.T. and T.G. analysed data. A.T. wrote the manuscript. R.D., S.B., L.B. and D.L. performed a critical review of the manuscript. B.R.P, B.C., A.R., J.L, T.V., L.F., X.D. revised the manuscript. A.R, B.R.P., B.C., J.L., M.S., J.F.M., L.F., V.B., C.K., T.V., A.T. included participants and collected samples.

Acknowledgments

We thank the participating patients and their families, whose trust, support, and cooperation were essential for the collection of the data used in this study. We thank the COLT Consortium for their organizational achievement. The authors thank the Centre de Ressources Biologiques du CHU De Nantes, the cluster LUNG innOvatiOn (LUNG O2).

Financial disclosure statement : This work was supported by the ANR project PRELUD (ANR-18-CE17-0019), The Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de Loire, the Fondation du Souffle and the Fonds de Recherche en Santé Respiratoire according the fundings Cohorte en Pneumologie 2017 and Plates-Formes et Recherche en Santé Respiratoire 2020. Cohort in Lung Transplantation was funded by Vaincre La Mucoviscidose and l'Association Grégory Lemarchal, the French Research Ministry (Agence Nationale de la Recherche grant), the French Government (Programme Hospitalier de Recherche Clinique - DGOS 20-11), the European Union (FP7 collaborative project HEALTH.2012.2.1.2-1 - grant agreement number: 305457) and Nantes Metropole.

The study sponsor(s) or funder(s) had no role in the study design, the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the article for publication. Researchers were independent from funders and all authors, external and internal, had full access to all of the data (including statistical reports and tables) in the study and can take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Competing interests: AT and BC declared competing interest with Biotest. tSB and RD have ownership interests in the BioMAdvanced Diagnostics company. TV declared competing interest with Boeringer Ingelheim and Mauna Kea, The other authors declared no competing interests. All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form.

References

1. Vock DM, Durheim MT, Tsuang WM, et al. Survival Benefit of Lung Transplantation in the Modern Era of Lung Allocation. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(2):172-181.
2. Timofte I, Wijesinha M, Vesselinov R, et al. Survival benefit of lung transplantation compared with medical management and pulmonary rehabilitation for patients with end-stage COPD. *ERJ Open Res*. 2020;6(2):00177-02019.
3. Agence de la biomédecine.
4. Chambers DC, Zuckermann A, Cherikh WS, et al. 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. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2020;39(10):1016-1027.
5. Verleden SE, Von der Thüsen J, Roux A, et al. When tissue is the issue: A histological review of chronic lung allograft dysfunction. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2020;20(10):2644-2651.
6. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.
7. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Stach K. MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers*. 2022;14(7):1847.
8. Niroomand A, Ghaidan H, Hallgren O, et al. Corticotropin releasing hormone as an identifier of bronchiolitis obliterans syndrome. *Sci Rep*. 2022;12(1):8413.
9. Vandermeulen E, Verleden SE, Ruttens D, et al. BAL neutrophilia in azithromycin-treated lung transplant recipients: Clinical significance. *Transpl Immunol*. 2015;33(1):37-44.
10. Verleden SE, Vandooren J, Vos R, et al. Azithromycin decreases MMP-9 expression in the airways of lung transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2011;25(2-3):159-162.
11. Heijink IH, Rozeveld D, van der Heide S, et al. Metalloproteinase Profiling in Lung Transplant Recipients With Good Outcome and Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Transplantation*. 2015;99(9):1946.
12. Ramirez AM, Nunley DR, Rojas M, Roman J. Activation of Tissue Remodeling Precedes Obliterative Bronchiolitis in Lung Transplant Recipients. *Biomark Insights*. 2008;3:351-359.
13. Smith Jr GN, Mickler EA, Payne KK, et al. Lung Transplant Metalloproteinase Levels Are Elevated Prior to Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Am J Transplant*. 2007;7(7):1856-1861.
14. Kennedy VE, Todd JL, Palmer SM. Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose and understand bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013;13(3):552-561.
15. Pain M, Royer PJ, Loy J, et al. T Cells Promote Bronchial Epithelial Cell Secretion of Matrix Metalloproteinase-9 via a C-C Chemokine Receptor Type 2 Pathway: Implications for Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am J Transplant*. Published online January 1, 2017

16. Koutsokera A, Royer PJ, Antonietti JP, et al. Development of a Multivariate Prediction Model for Early-Onset Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Restrictive Allograft Syndrome in Lung Transplantation. *Front Med*. 2017;4:109.
17. Verleden GM, Glanville AR, Lease ED, et al. Chronic lung allograft dysfunction: Definition, diagnostic criteria, and approaches to treatment-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2019;38(5):493-503.
18. Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2014;33(2):127-133.
19. Kulkarni HS, Cherikh WS, Chambers DC, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome-free survival after lung transplantation: An International Society for Heart and Lung Transplantation Thoracic Transplant Registry analysis. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. Published online September 25, 2018.
20. Van Herck A, Verleden SE, Sacreas A, et al. Validation of a post-transplant chronic lung allograft dysfunction classification system. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2019;38(2):166-173.
21. Kastelijin EA, van Moorsel CHM, Ruven HJT, et al. YKL-40 and matrix metalloproteinases as potential biomarkers of inflammation and fibrosis in the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG*. 2013;30(1):28-35.
22. Inamoto Y, Martin PJ, Onstad LE, et al. Relevance of plasma matrix metalloproteinase-9 for bronchiolitis obliterans syndrome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(9):759.e1-759.e8.
23. Vandermeulen E, Verleden SE, Bellon H, et al. Humoral immunity in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction: A broncho-alveolar lavage fluid analysis. *Transpl Immunol*. 2016;38:27-32.
24. Danger R, Royer PJ, Reboulleau D, et al. Blood Gene Expression Predicts Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Front Immunol*. 2017;8:1841.
25. Durand M, Lacoste P, Danger R, et al. High circulating CD4+CD25hiFOXP3+ T-cell sub-population early after lung transplantation is associated with development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2018;37(6):770-781.
26. Brosseau C, Danger R, Durand M, et al. Blood CD9+ B cell, a biomarker of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2019;19(11):3162-3175.

Figures

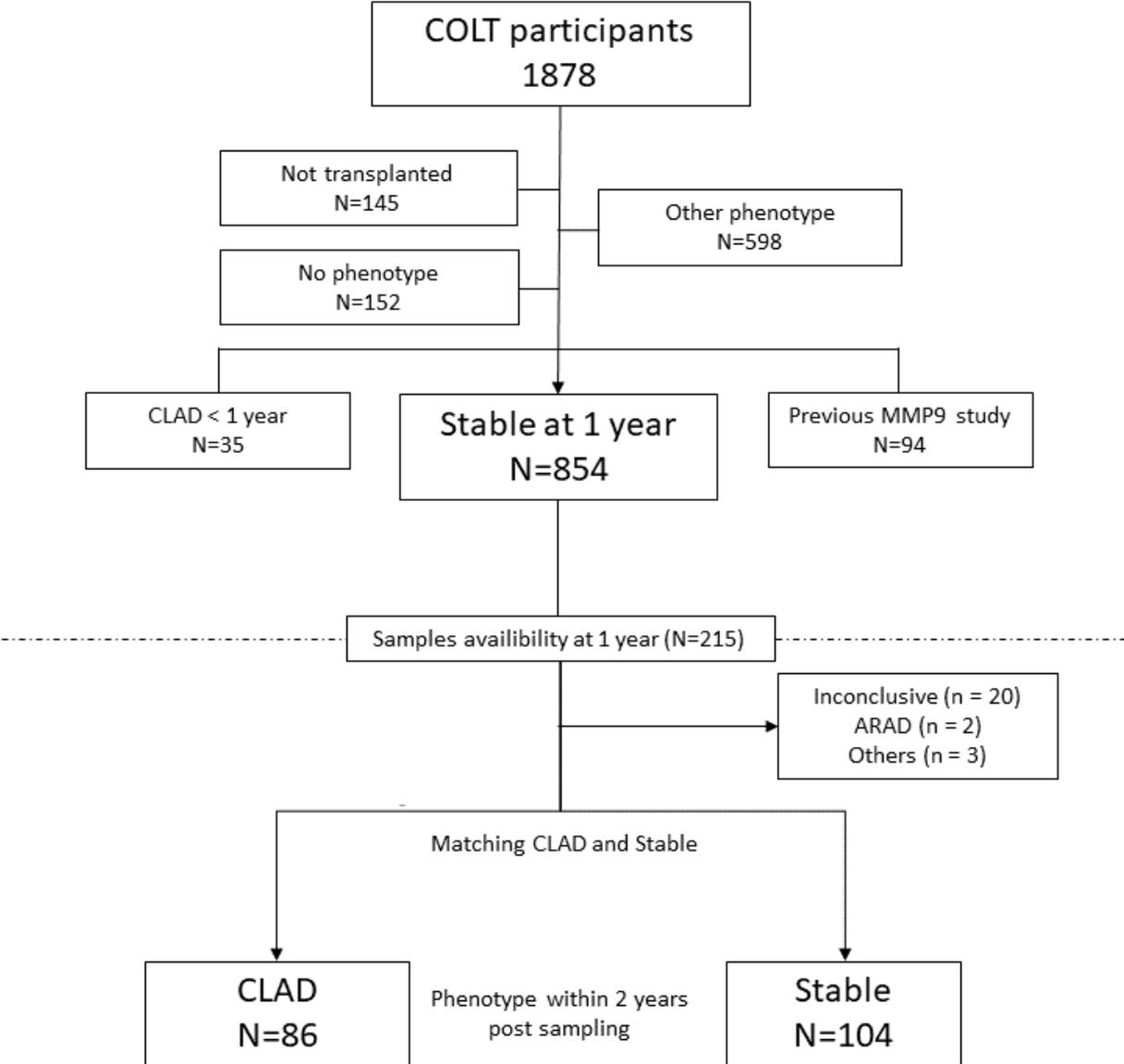


Figure 1. Year 1 sample analysis flowchart

Selection of COLT lung transplant recipients with CLAD or Stable phenotype. Other phenotype included death before 3 months, death without CLAD and patients with an inconclusive phenotype (insufficient data or cofounding factors affecting the adjudication). No phenotype refers to recipients awaiting adjudication.

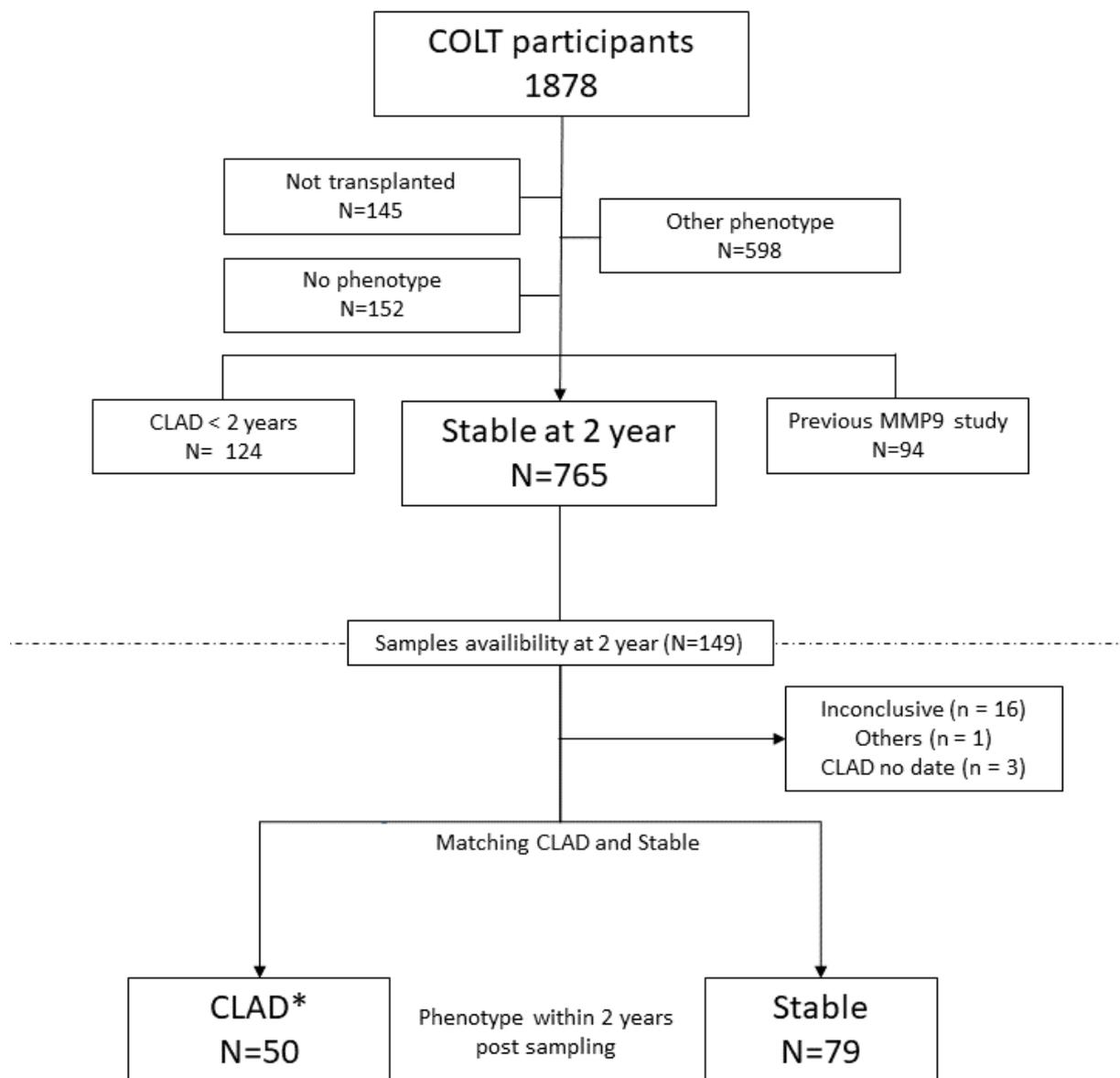
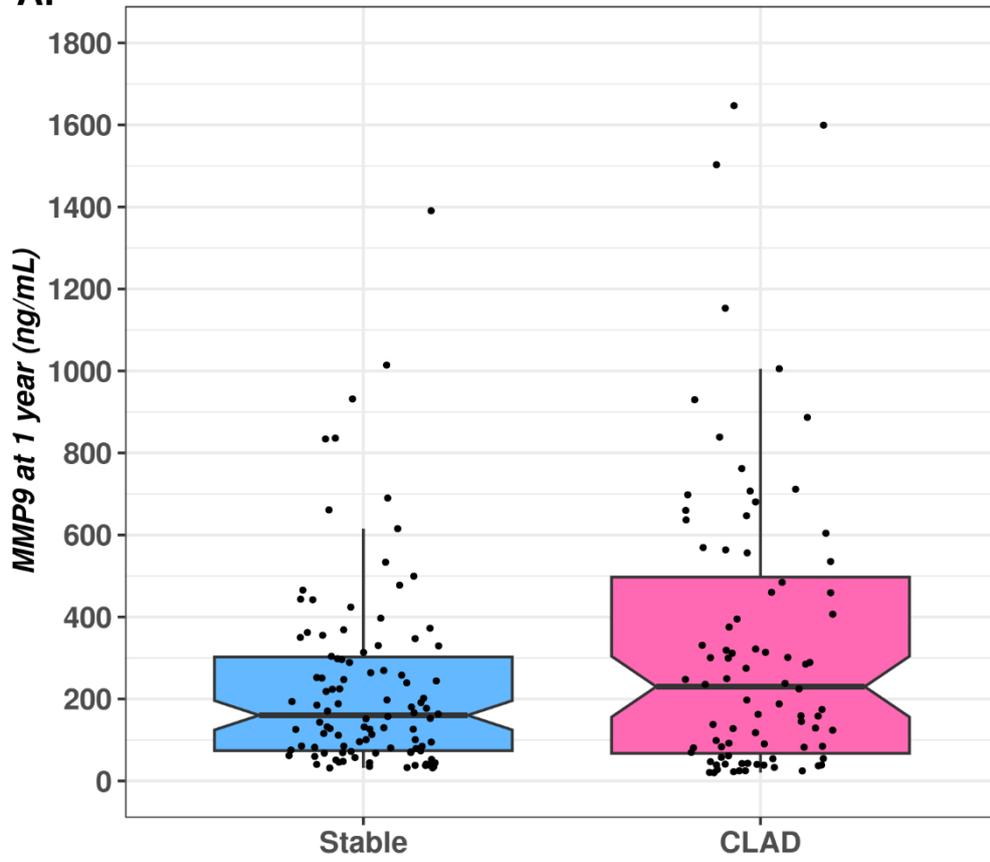


Figure 2. Year 2 sample flowchart

Selection of COLT lung transplant recipients with CLAD or Stable phenotype. Other phenotypes included death before 3 months, death without CLAD and patients with an inconclusive phenotype (insufficient data or confounding factors affecting the adjudication). No phenotypes refers to recipients awaiting adjudication. * 1 recipient was initially classified as Azithromycin responsive allograft dysfunction and was not included in the Stable group for the year 1 sample analysis but later developed CLAD and was included in the CLAD group for the year 2 sample analysis.

A.



B.

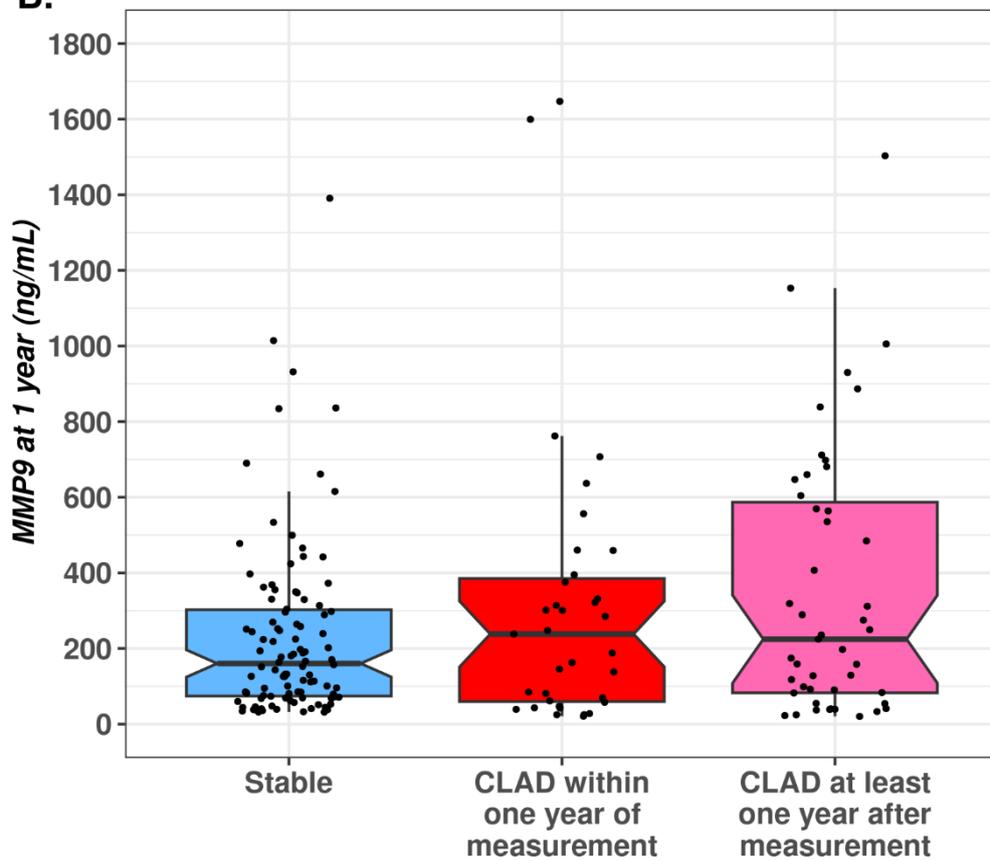
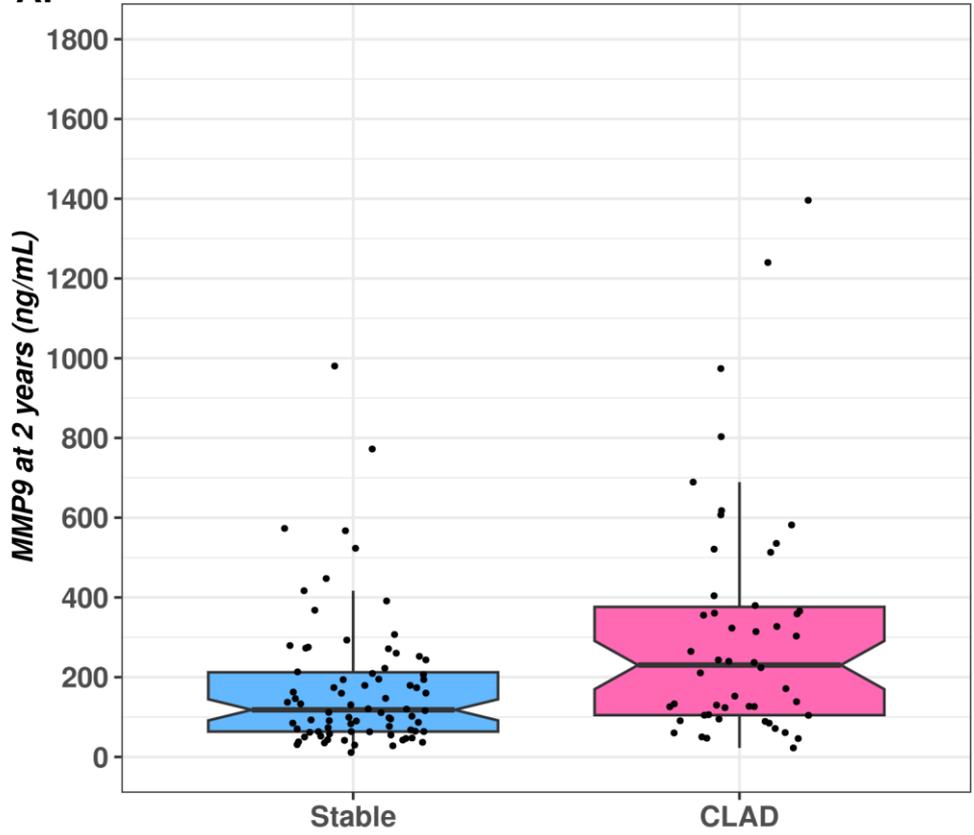


Figure 3. Blood MMP-9 value at Y1. A) comparison of MMP-9 plasmatic concentration at Y1 between recipients who then developed CLAD and those who remained Stable in the next 2 years ($p=0.2$). B) comparison of sample close to CLAD and distant to CLAD. Comparison of MMP-9 plasmatic concentration at Y1 between recipients who developed CLAD within one year of measurement, those who developed CLAD at least one year after measurement and those who remained Stable at least 2 years after measurement. No statistical difference seen.

A.



B.

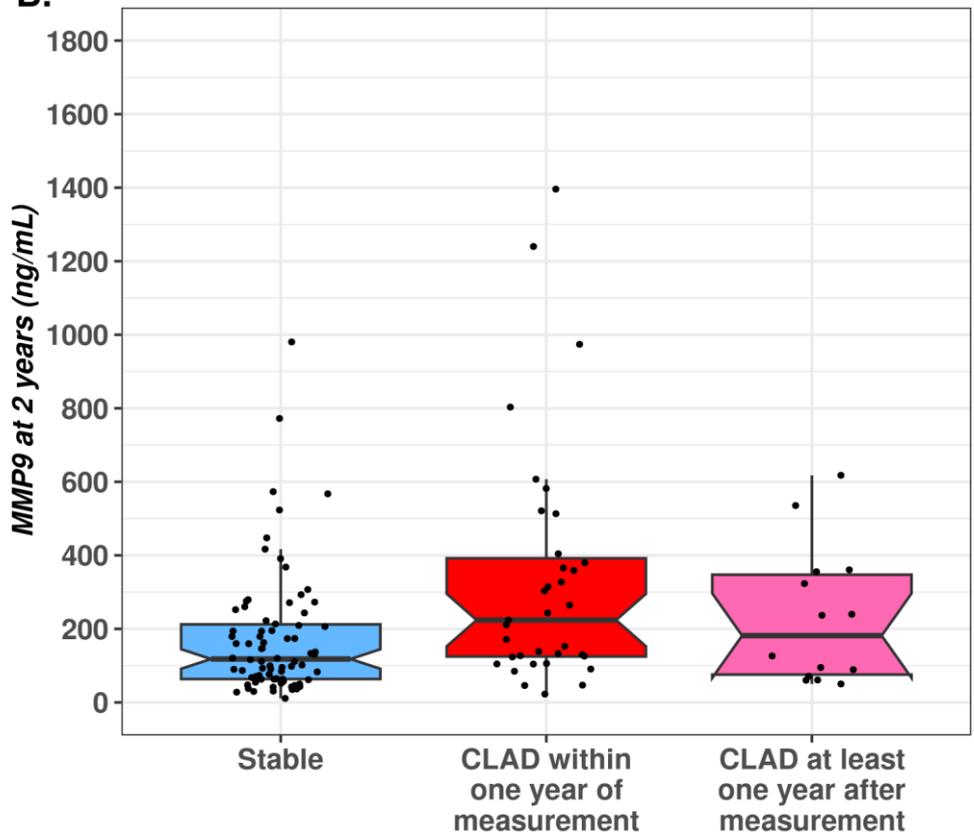
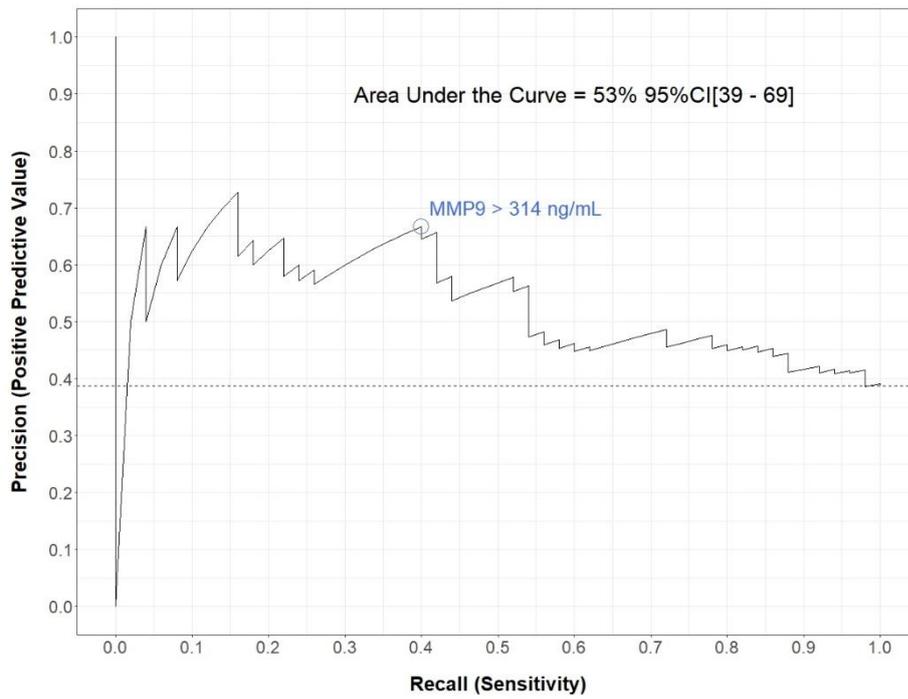


Figure 4. Blood MMP-9 value at Y2. A) comparison of MMP-9 plasmatic concentration at Y2 between recipients who then developed CLAD and those who remained Stable in the next 2 years ($p=0.003$). B) blood MMP-9 value at Y2 with comparison of sample close to CLAD and distant to CLAD. Comparison of MMP-9 plasmatic concentration at Y2 between recipients who developed CLAD within one year of measurement, those who developed CLAD at least one year after measurement and those who remained Stable at least 2 years after measurement with significant difference between Stable and CLAD within one year ($p=0.003$)

A



B

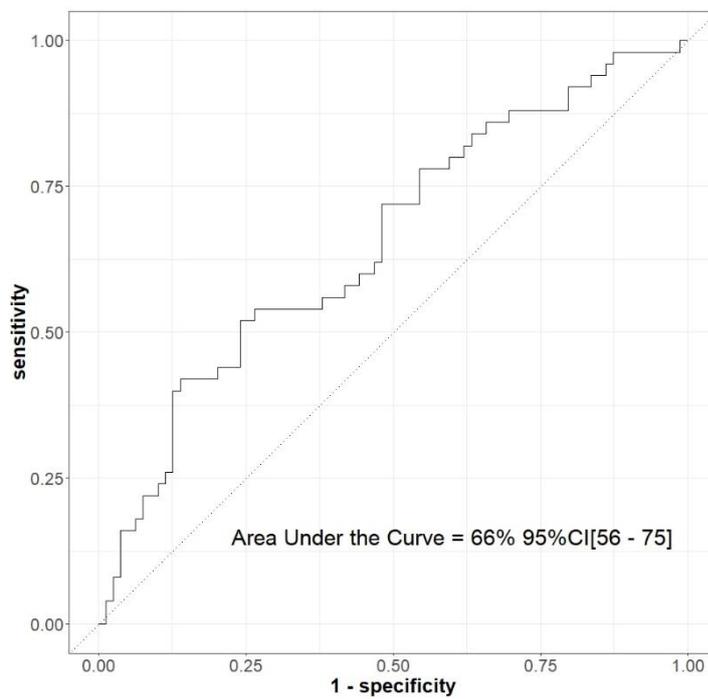


Figure 5. Precision-Recall (A) and ROC (B) curves for the Y1 MMP-9 analysis

The precision-recall curve represents for each available value of MMP-9 its positive predictive value and its sensitivity for CLAD onset within the next 2 years.

Tables

	Stable (n = 104)	CLAD (n = 86)	p value	missing value (%)
Gender male	61 (58.7)	45 (52.3)	0,5	0
Age	52 [36, 60]	51 [28, 58]	0,4	0
Height (cm)	168 (8)	165 (8)	0,05	0,5
Weight (kg)	61(15)	59 (13)	0,3	0,5
Underlying disease			0,01	0
<i>COPD/emphysema</i>	55 (52.9)	33 (38.4)		
<i>Cystic fibrosis</i>	30 (28.8)	23 (26.7)		
<i>ILD</i>	16 (15.4)	17 (19.8)		
<i>Other</i>	3 (2.9)	13 (15.1)		
Bacterial colo. pre Tx	51 (49.0)	43 (50.0)	1	0
Fungal colo. pre Tx	55 (52.9)	39 (45.3)	0,4	0
C. Albicans colo. pre Tx	37 (35.6)	18 (20.9)	0.04	0
DSA pre Tx	19 (24.7)	21 (32.8)	0,4	25,8
High emergency	8 (7.7)	6 (7.0)	1	0
Procedure			0,3	1,1
<i>Double lung</i>	87 (84.5)	70 (82.4)		
<i>Heart and lung</i>	0 (0.0)	2 (2.4)		
<i>Single lung</i>	16 (15.5)	13 (15.3)		
Surgical approach			0,2	4,7

<i>Clam shell</i>	18 (18.2)	8 (9.8)		
<i>Sternotomy</i>	2 (2.0)	4 (4.9)		
<i>Thoracotomy</i>	79 (79.8)	70 (85.4)		
ECLS	42 (42.0)	30 (35.7)	0,5	3,2
Graft cold ischemia (min)	322 [270, 380]	345 [280, 405]	0,12	3,7
Donor age	44 [30, 54]	46 [25, 57]	0,7	0,5
Donor gender male	62 (59.6)	53 (62.4)	0,8	0,5
Donor smoking habit	37 (35.9)	30 (36.6)	1	2,6
PaO2/FiO2	400 (106)	380 (107)	0,2	0,5
Mismatch CMV	16 (15.4)	16 (18.6)	0,7	0
Mismatch EBV	6 (5.8)	7 (8.1)	0,7	0
Dialysis	5 (5.1)	2 (2.4)	0,6	3,7
Induction treatment	87 (83.7)	60 (69.8)	0,03	0
Type of Induction			0,03	0
<i>anti-IL2</i>	36 (34.6)	20 (23.3)		
<i>ATG</i>	51 (49.0)	39 (45.3)		
<i>None</i>	17 (16.3)	27 (31.4)		
Resp bacterial inf post Tx			0,3	0
<i>0</i>	19 (18.3)	21 (24.4)		
<i>1</i>	40 (38.5)	24 (27.9)		
<i>2</i>	31 (29.8)	24 (27.9)		

3	14 (13.5)	17 (19.8)		
Resp fungal inf post Tx			0,7	0
0	55 (52.9)	43 (50.0)		
1	34 (32.7)	34 (39.5)		
2	12 (11.5)	7 (8.1)		
3	3 (2.9)	2 (2.3)		
Resp viral inf post Tx			0,3	0
0	66 (63.5)	50 (58.1)		
1	28 (26.9)	25 (29.1)		
2	6 (5.8)	10 (11.6)		
3	4 (3.8)	1 (1.2)		
ACR (≥ 1)	31 (29.8)	37 (43.0)	0,08	0
AMR	3 (2.9)	7 (8.1)	0,2	0

Table 1. Recipients and donor characteristics for the year-1 MMP-9 comparative analysis.

Results are expressed in median with interquartile range, mean with standard deviation or n and %. CLAD: chronic lung allograft dysfunction. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. ILD: interstitial lung disease. Other: other underlying diagnosis (pulmonary hypertension, sarcoidosis, connective tissue disease, bronchiectasis). Bacterial colo. pre Tx: bacterial colonization pre transplantation. Fungal colo. pre Tx. Fungal colonization pre transplantation. DSA: donor specific antibody. ECLS: extracorporeal life support per transplantation. CMV: cytomegalovirus. EBV: Epstein-Barr virus. ATG: rabbit antithymoglobulin. Anti-IL2: anti interleukine-2. Resp bacterial inf post Tx: lower respiratory tract bacterial infection in the first year post transplantation, number of episode. Resp fungal inf post Tx: lower respiratory tract fungal infection in the first year post transplantation, number of episode. ACR: acute cellular rejection, number of patients with one or more

episode in the first year post transplantation. AMR: antibody mediated rejection, number of patients with one or more episode in the first year post transplantation

<i>Predictors</i>	<i>Y1 analysis</i>			<i>Y2 analysis</i>		
	<i>MMP-9 estimates</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>	<i>MMP-9 estimates</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>
CLAD (vs Stable)	123,32	-34 – 281	0,1	150,9	20 – 281	0,02
Cystic Fibrosis	1,08	- 193 – 195	1	-112,51	-254 – 29	0,1
ILD	-39,11	- 247 – 169	0,7	21,73	- 149 – 192	0,8
Other	-18,32	- 301 – 264	0,9	-186,44	- 481 – 108	0,2
CMV mismatch	-56,47	- 260 – 147	0,6	-36,83	- 191 – 117	0,6
Fungal colo. pre Tx	-12,69	- 163 – 138	0,9	129,13	1.7 – 257	0,05
Graft cold ischemia	-0,51	-1.3 – 0.3	0,2	-0,46	-1.2 – 0.3	0,2
Donor PaO ₂ /FiO ₂	-0,53	-1.2 – 0.2	0,1	0,2	-0.4 – 0.8	0,5
Induction treatment	-61,32	- 241 – 118	0,5	-108,01	-260 – 44	0,1
ACR (>1)	-98,6	-257 – 60	0,2	40,23	-92 – 173	0,5
Bacterial infection (>1)	-6,23	- 197 – 184	0,9	97,94	-59 – 255	0,2
Fungal infection (>1)	147,54	-10 – 305	0,07	-28,73	-156 – 98	0,6
Viral infection (>1)	46,46	- 106 – 199	0,5	-60,8	-187 – 66	0,3

Table 2. Multivariate analysis of factors influencing MMP-9 blood levels at Y1 and Y2

CLAD: chronic lung allograft dysfunction. ILD: interstitial lung disease. Other: other underlying diagnosis (pulmonary hypertension, sarcoidosis, connective tissue disease, bronchiectasis). The reference chose for underlying disease was COPD/emphysema. CMV: cytomegalovirus, mismatch referring to a transplantation with a recipient with negative serology and a donor with positive serology to CMV. ACR: acute cellular rejection, one or more episode within the first year post transplantation. The infection factors refers to bacterial, fungal or viral infection of the lower respiratory tract, one or more episode within the first year post transplantation

	Stable (n = 79)	CLAD (n = 50)	P	Missing (%)
Gender male	49 (62.0)	32 (64.0)	1	0
Age	49 [31, 59]	46.50 [27.25, 58.00]	0,4	0
Height (cm)	167.23 (7.44)	168.70 (9.09)	0,3	0
Weight (kg)	58.37 (14.27)	58.86 (13.64)	0,8	0
Underlying disease			0,06	0
<i>COPD/emphysema</i>	34 (43.0)	17 (34.0)		
<i>Cystic fibrosis</i>	28 (35.4)	19 (38.0)		
<i>ILD</i>	16 (20.3)	8 (16.0)		
<i>Other</i>	1 (1.3)	6 (12.0)		
Bacterial colo. pre Tx	42 (53.2)	28 (56.0)	0,9	0
<i>S. Aureus</i> colo. pre Tx	13 (16.5)	7 (14.0)	0,9	0
<i>P. Aeruginosa</i> colo. pre Tx	21 (27)	23 (46)	0,04	0
Fungal colo. pre Tx	40 (50.6)	22 (44.0)	0,6	0
<i>A. fumigatus</i> colo. pre Tx	14 (17.7)	11 (22.0)	0,7	0
<i>C. Albicans</i> colo. pre Tx	29 (37)	8 (16)	0,02	0
DSA pre TX	17 (27.9)	15 (36.6)	0,5	20,9
High emergency	9 (11.4)	2 (4.0)	0,2	0
Procedure	12 (15.6)	8 (16.3)	1	2,3
<i>Double lung</i>				

<i>Heart and lung</i>				
<i>Single lung</i>				
Surgical approach			0,6	1,6
<i>Clam shell</i>	15 (19.2)	8 (16.3)		
<i>Sternotomy</i>	1 (1.3)	2 (4.1)		
<i>Thoracotomy</i>	62 (79.5)	39 (79.6)		
ECLS	36 (46.8)	22 (44.0)	0,9	1,6
Cold ischemia (min)	330 [275, 380]	340 [260, 395]	0,8	2,3
Donor age	44 [26, 53]	46 [36, 57]	0,3	0
Donor gender male	45 (57)	33 (66)	0,4	0
Donor smoking habit	28 (35.4)	19 (38.8)	0,8	0,8
PaO₂/FiO₂	393.27 (104.85)	392.46 (96.27)	1	1,6
Mismatch CMV	17 (21.5)	11 (22.0)	1	0
Mismatch EBV	6 (7.6)	8 (16.0)	0,2	0
Dialysis	4 (5.3)	3 (6.1)	1	3,9
Induction treatment	63 (79.7)	37 (74.0)	0,6	0
Type of Induction			0,4	0
<i>anti-IL2</i>	28 (35.4)	12 (24.0)		
<i>ATG</i>	35 (44.3)	25 (50.0)		
<i>None</i>	16 (20.3)	13 (26.0)		
Resp bacterial inf post Tx			0,1	0
<i>0</i>	13 (16.5)	11 (22.0)		

1	32 (40.5)	14 (28.0)		
2	24 (30.4)	12 (24.0)		
3	10 (12.7)	13 (26.0)		
Resp fungal inf post Tx			0,3	0
0	46 (58.2)	21 (42.0)		
1	23 (29.1)	19 (38.0)		
2	8 (10.1)	7 (14.0)		
3	2 (2.5)	3 (6.0)		
Resp viral inf post Tx			0,1	0
0	55 (69.6)	25 (50.0)		
1	18 (22.8)	19 (38.0)		
2	4 (5.1)	5 (10.0)		
3	2 (2.5)	1 (2.0)		
ACR (≥ 1)	24 (30.4)	22 (44.0)	0,2	0
AMR	4 (5.1)	3 (6.0)	1	0

Table 3. Recipients and donor characteristics for the year-2 MMP-9 comparative analysis

Results are expressed in median with interquartile range, mean with standard deviation or n and %. CLAD: chronic lung allograft dysfunction. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. ILD: interstitial lung disease. Other: other underlying diagnosis (pulmonary hypertension, sarcoidosis, connective tissue disease, bronchiectasis). Bacterial colo. pre Tx: bacterial colonization pre transplantation. Fungal colo. pre Tx. Fungal colonization pre transplantation. DSA: donor specific antibody. ECLS: extracorporeal life support per transplantation. CMV: cytomegalovirus. EBV: Epstein-Barr virus. ATG: rabbit antithymoglobulin. Anti-IL2: anti interleukine-2. Resp bacterial inf post Tx: lower respiratory

tract bacterial infection in the first year post transplantation, number of episode. Resp fungal inf post Tx: lower respiratory tract fungal infection in the first year post transplantation, number of episode. ACR: acute cellular rejection, number of patients with one or more episode in the first year post transplantation. AMR: antibody mediated rejection, number of patients with one or more episode in the first year post transplantation

Blood MMP-9 measured at two-year post lung transplantation as a prognostic biomarker of chronic lung allograft dysfunction.

Adrien Tissot, MD, Eugénie Durand, Thomas Goronflot, Benjamin Coiffard, MD, PhD, Benjamin Renaud-Picard, MD, PhD, Antoine Roux, MD, PhD, Xavier Demant, MD, Jean-François Mornex, MD, PhD, Loïc Falque, MD, Mathilde Salpin, MD, Jérôme Le Pavec, MD, PhD, Thomas Villeneuve, MD, Véronique Boussaud, MD, Christiane Knoop, MD, David Lair, PhD, Laureline Berthelot, PhD,² Richard Danger, PhD, Sophie Brouard, PhD, the COLT consortium.

Supplementary Appendix Material

Supplemental 1. COLT study protocol

Study Objective

The goal of the COLT study is to investigate predictive factors for chronic lung allograft dysfunction. It relies on two cornerstones: to share between centers relevant clinical, biological and functional data and to create a prospective biocollection. The main objective is to identify biomarkers of CLAD. Secondary objectives are to investigate the precise pathophysiology of CLAD and to enable studies on lung transplantation on other theme (cancer or infectious disease related to transplantation)

Methodology

Study Design

COLT is a prospective multicentric cohort study of CLAD development in patients followed-up 10 years post transplantation. All French lung transplantation team participate plus the Belgium centre of Brussels. Nantes is the coordinator centre and Pr Antoine Magnan is the principal investigator. The COLT study involves the pooling by all participant centres of clinical, functional, radiological and biological data in a prospective, homogenous and standardized manner in a dedicated shared database. It is associated with a prospectively set up biocollection including plasma, serum, tissu, bronchio-alveolar lavage (BAL), RNA and

DNA samples. The study protocol involves planned follow-up visit in which clinical, biological and functional data are implemented in the electronic case report form and blood samples are taken from patient. The protocol does not interfere further with the usual centre's medical care. The protocol has received the approval of the Ethic Committee on 24th February 2009, and the authorization from the French regulatory authority (AFSSASP/ANSM) on 5th February 2009. The protocol is also registered to the CNIL (national committee for data processing and liberties) and approved on 16th September 2011. The University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks approved this study.

Study population

The study aims to include every patient eligible for lung transplantation in any of the adult lung transplantation centres of Hôpital Foch (Suresnes), Marseille, Strasbourg, Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis Robinson), Nantes, Hôpital Bichat (Paris), Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris), Bordeaux, Lyon, Toulouse, Grenoble and Brussels. Information on data collection and final use of samples are given and the written consent obtained during the pre-transplantation assessment and patients are included at the time of listing, *i.e.* before transplantation. Patients without a social insurance, unable to follow the protocol, to give an informed consent for the biocollection, nursing or pregnant women or patient with a concomitant inflammatory disease were not included. In the specific situation of the high-emergency list, the consent is gathered from the patient's trust person or the closest next of kin after information on the study and the patient's consent is obtain after transplantation. In case of refusal to carry on the study, the patient is withdrew and all samples associated are destroyed.

Data collection

At inclusion (V0) a physical examination and pulmonary function test are performed. Demographic, biological and clinical data are compiled. The first visit (V1) is at the time of transplantation, specific information on the recipient, the donor, the surgery and immediate post-operative outcomes are implemented. The time of the following visits depends on which group the patient belongs to. There are three sets of patients: A) from the 1st to the 500th transplanted patients were included in the biomedical research with visits every 6

months with sample collection, additional blood samples were done for the PBMC B) from the 501st to 1200th patient were included in the non-interventional research with visit every year with sample collection C) from the 1201st transplanted patient, follow-up every year without sample collection. Each follow-up visit gathered clinical, biological and functional information with specific items on allograft dysfunction (acute cellular rejection, chronic lung allograft dysfunction and antibody mediated rejection), complications (bronchial anastomosis, infection, renal dysfunction and tumor) and maintenance immunosuppression regimen (with mention of azithromycin) (Table 1)

CLAD adjudication committee

When the database was initially build in 2008, the CLAD entity was not yet described (verleden). In 2013, to enable a homogenous classification of our patients, we organized the first adjudication committee to ascertain their phenotype at 3 years post transplantation or before 3 years if they had died or developed CLAD. Those meeting were held face-to-face or by means of videoconference. At least seven centres were represented for each committee. Decision was based on PFTs, radiological findings (chest computed tomography scan for most, standard chest x-ray if not available), information extracted from the database for confounding factors and diagnosis according to the centre providing care to the specific patient. Phenotypes were defined as follow:

BOS: persistent decline of FEV1 \geq 20% from baseline with FEV1/FVC $<$ 0,70

RAS: persistent decline of FEV1 \geq 20% from baseline with decline of TLC \geq 10% (or FVC \geq 20% if not available) and radiological fibrotic changes

Mixed: RAS phenotype with an obstructive component or BOS phenotype with clear pulmonary fibrotic infiltrates

Stable: FEV1 at the time of adjudication \geq 90% of baseline without any life-threatening condition (*e.g.* cancer)

Inconclusive: possible CLAD or stable but with major confounding factor (concurrent cancer, severe bronchial stenosis) or insufficient data

Other: death before 3 months post transplantation or from another cause without evidence for CLAD

Other subtypes were identified regarding the azithromycin status: the well-defined azithromycin-responsive allograft dysfunction and patient with stable lung function on azithromycin (treatment started from transplantation or without significant identified decline of FEV1). Baseline value is the mean of the two best FEV1 value performed at least 3 weeks apart. The first committee assessing patient at five years post lung transplantation was held in November 2017.

Sample collection

The biocollection concerns the first 1200 transplanted patients of the cohort (group A and B). The schedule is identical for V0 and V1, then from V2 patient from group A have a follow-up every 6 month and for group B every year. Collection of samples ends when the patient reaches 5 years post-transplant. Patient from group A, have additional blood samples (for the PBMC), 3 Li-Hep tubes of 9 ml were necessary.

At inclusion, a blood sample of 41ml is collected from the patient. Specific analysis of lymphocyte population, transcriptome and genome are provided for. Distribution is as follow:

2 EDTA tubes of 5 ml

2 Li-Hep tubes of 9 ml

1 Paxgene® of 3 ml

1 dry tube of 10 ml

At the time of transplantation, a lung biopsy of the explanted lung is performed for transcriptomic analysis. A 31 ml blood sample is gathered from the recipient just before transplantation (same distribution as in V0 without the 2 EDTA tubes). Blood sample is also retrieve from the donor with family agreement with planned lymphocyte population study. Distribution is as follow:

1 EDTA tubes of 4 ml

1 Paxgene® of 3 ml

1 dry tube of 9 ml

From the donor, tracheal ring can be retrieved for immediate airway epithelial cells dissociation and further primary culture. Those are carried out as needed depending on specific associated studies.

For the following visits and up to 5 years post-transplantation, blood sample is collected as in V1. BAL, transbronchial biopsies, induced sputum and exhaled breath condensate are collected as per centre protocol according to their own follow-up schedules. Some centres will performed systematic bronchoscopy with sampling of BAL and transbronchial biopsies as some will do it only if lung function alteration.

All samples are stored at -80°C by the Biological Resources Centre of Nantes University Hospital.

Supplemental 2. Description of variables of interest

Age: age of recipients in years at the time of transplantation (similar for height and weight)

Other underlying disease: group I pulmonary hypertension, pulmonary disease related to connective tissue disease (including scleroderma and rheumatoid arthritis), sarcoidosis, lymphagiomyomatosis, Langherans histiocytosis, non-cystic fibrosis bronchiectasis.

Bacterial colonization pre transplantation included colonization to pseudomonas aeruginosa, staphylococcus aureus, stenotrophomonas maltophilia, achromobacter xylosoxydans and haemophilus influenza.

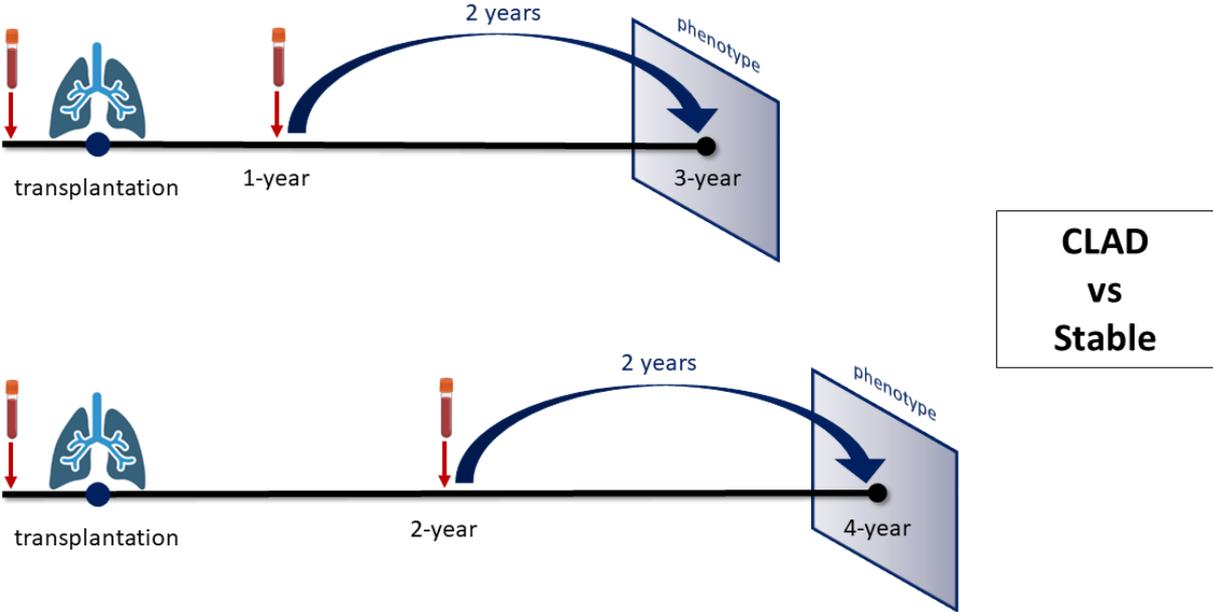
Fungal colonization pretransplantation included candida albicans and other candida species, aspergillus fumigatus, niger, terreus and scedosporium

High emergency: correspond to candidates listed on the french national priority list (also known as the “high emergency list”). Only candidates with interstitial lung disease, cystic fibrosis and pulmonary hypertension are eligible if they present specific criteria of severity (*e.g.* for candidates with cystic fibrosis, PaO₂ of > 55 mmHg despite over 18h/day of non-invasive ventilation) associated with short high risk of death. The candidates listed are prioritized at the national level for 16 days.

Dialysis corresponds to recipients who required dialysis immediately after transplantation, before the first discharge from hospital.

Induction treatment: medical treatment first administrated during transplantation procedure to avoid hyperacute allograft rejection and immediate post-operative acute cellular rejection. The only two drugs used in this study were the monoclonal anti-IL-2 antibody Basiliximab and rabbit anti-thymoglobuline.

Figure S1. Study protocol



Recipients had blood taken at 1-year and/or at 2-year post transplantation and before transplantation. We considered the participant’s phenotype 2 years after the sampling, i.e. at 3 years post transplantation for the one-year sample and at 4 years post transplantation for the two years sample. At the time of the sampling, all patients included were Stable

Figure S2. Comparison of MMP-9 blood levels of Y2 analysis according to CLAD phenotypes. p-value corresponds to comparison of MMP-9 value between CLAD type (BOS, RAS or mixed) with Stable

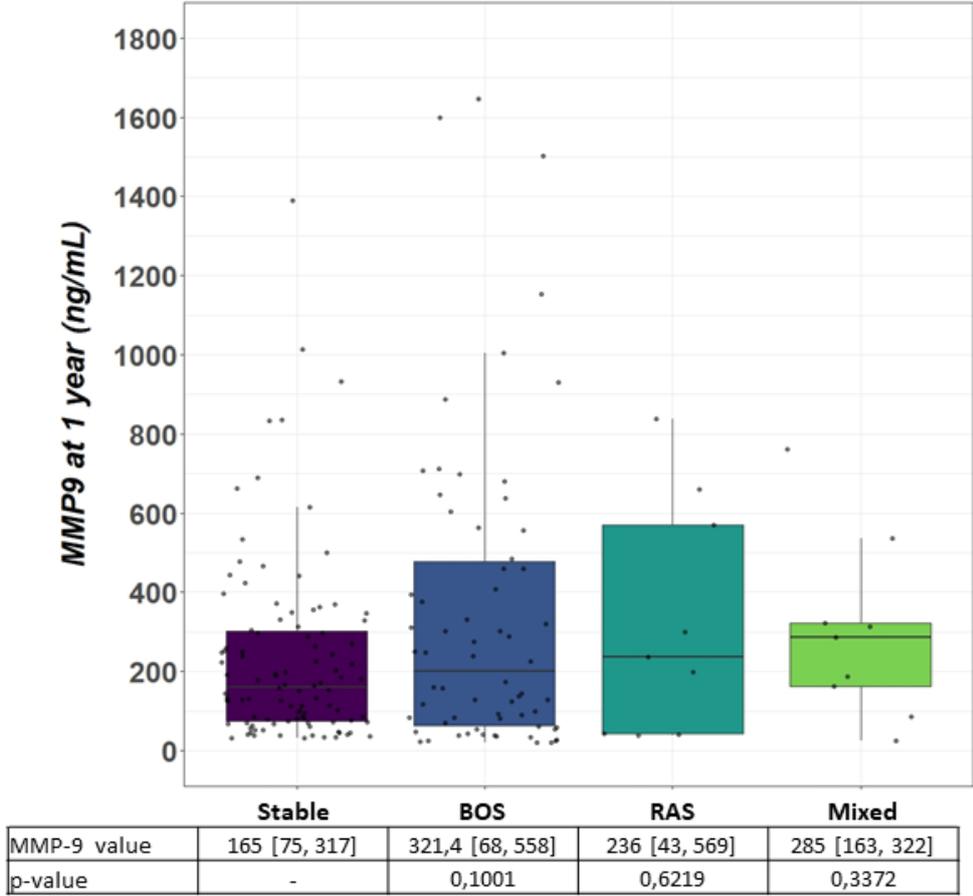
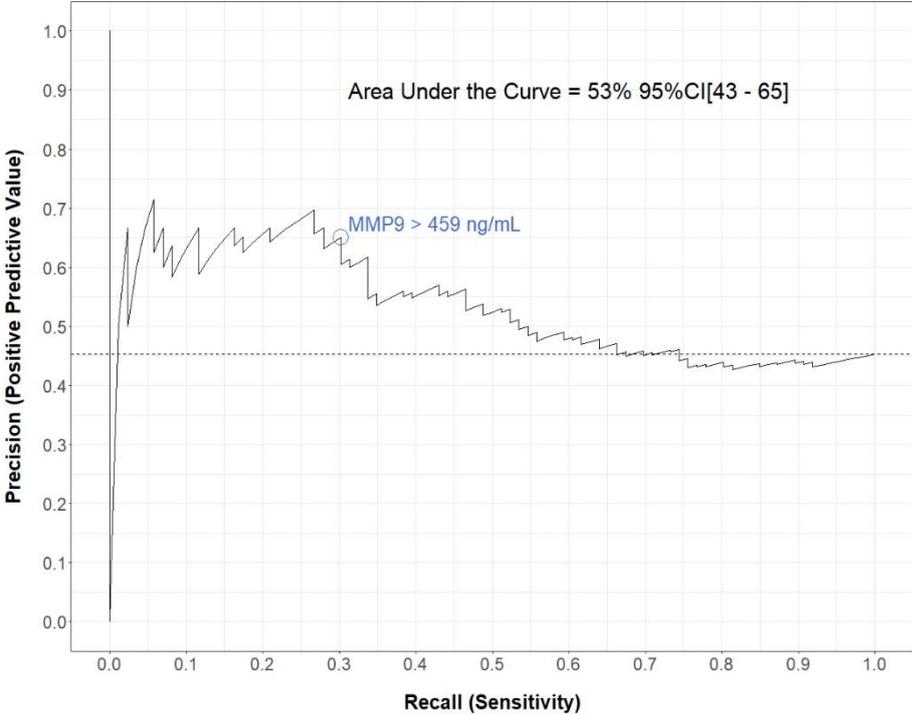
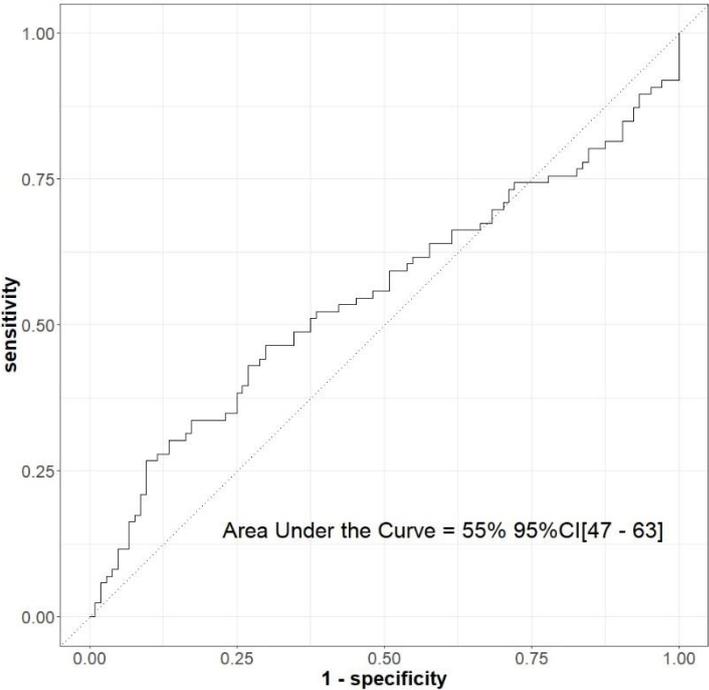


Figure S3. Precision-Recall (A) and ROC (B) curves for the Y1 MMP-9 analysis

A

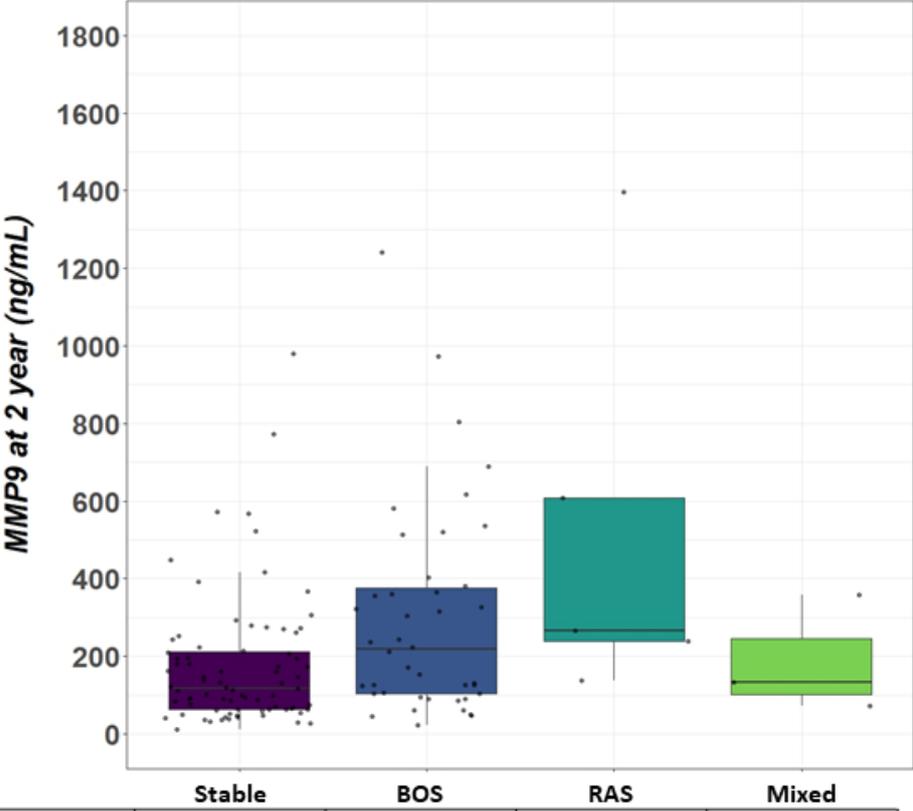


B



The precision-recall curve represents for each available value of MMP-9 its positive predictive value and its sensitivity for CLAD onset within the next 2 years

Figure S4. Comparison of MMP-9 blood levels of Y2 analysis according to CLAD phenotypes. p-value corresponds to comparison of MMP-9 value between CLAD type (BOS, RAS or mixed) with Stable



	Stable	BOS	RAS	Mixed
MMP-9 value	119 [64, 218]	217 [104, 376]	265 [240, 607]	133 [102, 245]
p-value	-	0,1443	0,0201	0,6927

VII. Discussion et perspectives

Les premières descriptions de la DCG, alors nommée rejet chronique, ont été réalisées dès les premiers temps de l'histoire de la transplantation pulmonaire. Les analyses histologiques ont d'abord identifié la bronchiolite oblitérante, puis plus tardivement le RAS. A ce jour, de nombreux points des mécanismes physiopathologique de la DCG restent obscurs mais la description des deux phénotypes est cependant cliniquement précise et un schéma général semble se dégager et faire consensus. La BOS est constituée d'une oblitération fibreuse des petites voies aériennes. Les lésions répétées de l'épithélium respiratoire de différentes nature (infectieuse, immunitaire, toxique) vont être responsable d'une activation de la réponse immunitaire innée avec notamment une implication initiale des neutrophiles et des macrophages puis une inflammation chronique locale, une altération des processus de réparations lésionnels et une prolifération fibroblastique aboutissant à l'obstruction des petites voies aériennes. Dans le cadre du RAS, la lésion principale est la fibro-élastose alvéolaire de localisation sous-pleurale et paraseptale. L'évènement initial peut aussi être infectieux ou immunitaire (notamment le rejet humoral) entraînant des lésions épithéliales et vasculaires et aboutissant *in fine* à une fibrose intra-alvéolaire avec un rôle important, là aussi, des macrophages. A ce jour, il n'existe pas de traitement dont l'efficacité ai été démontrée pour prévenir ou traiter la DCG. Le processus fibrosant est central dans cette pathologie et la recherche de nouvelle cibles thérapeutiques semble capitale pour permettre d'en améliorer un jour le pronostic. A ce titre, la TG2 est une cible potentielle particulièrement intéressante. Cette protéine présente de multiples fonctions dont notamment celle de réaliser des liaisons croisées covalentes entres différentes protéines. Cette fonction joue un rôle déterminant dans les processus de dégradation renouvellement de la MEC. La formation de liaisons avec des protéines constitutives de cette matrice, principalement la fibronectine mais aussi le collagène participe à une stabilisation de la MEC et ainsi à favoriser son accumulation mais aussi le recrutement et la prolifération des fibroblastes. Des interactions étroites ont aussi été décrites avec deux types de molécules clés des processus fibrosants, le TGF- β qui est un régulateur central du remodelage de la MEC et les MMP (notamment la MMP-9) principales actrices de la dégradation de la MEC. Finalement, la TG2 semble impliquée dans deux pathologies dans lesquelles on retrouve des mécanismes communs à la DCG : la fibrose pulmonaire idiopathique et l'hypertension artérielle pulmonaire. Certains aspects des paradigmes de la

fibrose pulmonaire idiopathique et de la DCG sont très proches : l'échec ou l'altération de réparation lésionnelle, l'activation persistante des myofibroblastes et la production en excès de MEC. Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, les mêmes mécanismes de remodelage, d'accumulation de MEC et de prolifération fibroblastique sont retrouvés sur le versant vasculaire. Dans l'étude des modèles animaux de ces pathologies, l'absence de TG2 ou son inhibition pharmacologique est associée à une amélioration des marqueurs de sévérité, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle essentiel de la TG2 dans ces deux maladies. Dans le travail présenté dans ce mémoire, je rapporte une analyse à deux niveaux de la présence de la TG2 dans la DCG. Tout d'abord l'analyse immunohistochimique de poumons explantés de patients présentant un BOS retrouve une expression intense, diffuse dans les macrophages alvéolaires, dans la paroi des alvéoles et des capillaires pulmonaires, dans l'épithélium bronchique et dans les zones de fibroses. La détection de la TG2 étant quasi nulle sur les lames de poumons non pathologiques. Ensuite, l'analyse transcriptomique en cellule unique des mêmes explants nous a permis d'identifier les macrophages comme une des possibles sources de production de la TG2. Sur un modèle cellulaire *in vitro*, l'exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines primaires à des lymphocytes T activés et à du TGF- β est associée à un phénomène de fibrose avec une expression importante de la TG2 et MMP-9. L'inhibition enzymatique de la TG2 résulte en une diminution de l'expression de la MMP-9 sans modifier son activité.

Pour rappel, Olsen et al. avaient déjà identifié la présence importante de la TG2 sur des analyses immunohistochimiques de biopsies pulmonaires issues de patients atteints de FPI. Les analyses que je présente confirment cette observation puisque la TG2 est aussi retrouvée sur les échantillons de patients atteints de FPI. Je démontre pour la première fois qu'il existe une forte expression de la TG2 sur des poumons de patients atteints de DCG de type BOS et il est à noter que sur les échantillons analysés, l'expression de la TG2 semble plus importante dans la DCG que dans la FPI. Un point à soulever est que l'analyse d'explants concerne des patients bénéficiant d'une transplantation et donc au stade d'insuffisance respiratoire chronique terminale, dans les deux cas à un stade très avancée de la maladie. Pour étudier l'expression de la TG2 dans les poumons de patients transplantés sans DCG ou présentant une DCG à un stade précoce, les seuls échantillons de tissus pulmonaires disponibles (prélevés dans le cadre de la surveillance en routine) sont les biopsies transbronchiques. Afin d'étudier l'expression de la TG2 de façon plus précoce dans l'évolution de la maladie, nous avons donc

sélectionné des lames histologiques de biopsies transbronchiques de patients greffés pulmonaires, au moment du diagnostic de la DCG et 6 mois après la transplantation. Je retrouve sur les échantillons correspondant au diagnostic de la DCG une expression forte de la TG2 mais aussi, avec une moindre intensité sur des échantillons prélevés 6 mois après la transplantation, bien avant le diagnostic clinique de la DCG. A cette observation, deux explications peuvent être avancées. Tout d'abord la TG2 pourrait être une protéine clé de la DCG agissant très en amont dans le processus pathologique. La deuxième hypothèse est que la TG2 pourrait être exprimée de façon « physiologique », à faible niveau dans l'allogreffe pulmonaire que le patient développe une DCG ou qu'il reste stable du point de vue respiratoire. L'analyse de patients restant stable (au moins à 3 ans de transplantation) montre que l'expression de TG2 est faible visuellement à 6 mois et à 24 mois post-transplantation. Cependant pour répondre formellement à ce point, un plus grand nombre de patients ainsi qu'une analyse quantitative serait nécessaire.

Le modèle cellulaire d'exposition de cellules épithéliales bronchiques au TGF- β 1 et à des lymphocytes T allogéniques décrit dans ce travail permet une analyse du rôle des cellules épithéliales bronchique dans un contexte simplifié de processus de rejet. Notre équipe a précédemment mis en évidence sur ce modèle que la transition épithélio-mésenchymateuse pouvait être un des modes de prolifération des fibroblastes dans la DCG. Les autres modes suspectés sont la prolifération in situ des fibroblastes et le recrutement des fibrocytes périphériques^{111,260}. Cinq jours après exposition, l'aspect en microscopie optique montre des cellules épithéliales non jointives et d'aspect fibroblastique avec une diminution de l'expression cytokératine et une augmentation de celle de l'alpha smooth actin muscle et de la fibronectine en analyse par immunofluorescence (article I, supplemental 2, 3 et 4). Dans ce modèle, la TG2 est impliquée dès 24 heures après l'exposition avec une augmentation de l'expression de l'ARNm. et de l'expression de la protéine. Cependant, même si TG2 semble être associée à la transcription de MMP9, l'inhibition de l'activité enzymatique de TG2 n'inverse pas l'évolution fibroblastique dans le modèle cellulaire et la diminution de production protéique de MMP9 ainsi que de son activité n'est pas significative. Notre hypothèse principale est que la TG2 participe au processus de fibrose associée à la physiopathologie de la BOS en réticulant les protéines de la MEC, stabilisant sa structure et favorisant ainsi son accumulation. Dans cette optique, l'inhibition du site actif de la cystéine par le peptide Z- DON,

sur lequel repose l'activité de réticulation, aurait dû être efficace pour réduire l'évolution mésoenchymateuse. Cependant, il faut rappeler que la TG2 est une protéine multifonctionnelle et que son rôle dans la DCG pourrait ne pas reposer uniquement sur son activité de transamidation/désamidation qui est spécifiquement inhibée par le Z-DON^{215,261}. La TG2 peut agir dans ce contexte par d'autres moyens. Par exemple, il a été démontré que la TG2 est impliquée dans la médiation de la mort/survie cellulaire, la régulation transcriptionnelle directe de MMP-9 ou qu'elle est capable d'induire le phénotype myofibroblaste^{198,214,262}. En outre, plus d'une centaine de substrats de TG2 ont été identifiés, ce qui rend encore difficile l'identification du rôle de TG2 dans un contexte spécifique, en particulier la transplantation qui implique une interaction allo-immune complexe, l'inflammation et des toxicités liées aux médicaments. Il s'agit d'une limite de mon travail, nous voulons maintenant étudier sur le modèle cellulaire les conséquences de l'utilisation d'un ARN interférant de la TG2 ou de cellules bronchiques invalidées pour la TG2 afin de vérifier dans quelle mesure la TG2 est impliquée dans le processus fibrotique *in vitro*. À ma connaissance, un seul travail a analysé l'implication de TG2 dans la DCG en travaillant sur le modèle de transplantation mono-pulmonaire gauche chez le rat²⁵⁹. Les auteurs ont constaté une augmentation de l'expression de TG2 dans les poumons transplantés par rapport aux poumons non transplantés de rat, qui semble provenir principalement des fibroblastes et non des cellules endothéliales ou des macrophages alvéolaires. Une autre information importante de ce travail est que le traitement immunosuppresseur (dans ce cas, la ciclosporine) induit la production d'espèces réactives de l'oxygène et une surexpression de la TG2 dans les fibroblastes de rats. Ces constatations amènent deux potentielles réponses aux questions que soulèvent nos résultats. D'une part, si la ciclosporine est effectivement responsable d'une surexpression de la TG2, cela peut expliquer l'expression pulmonaire de TG2 observée dans les biopsies transbronchiques de patients à l'état stable (soit sans DCG, soit bien en amont du diagnostic clinique). Ensuite, les résultats de notre analyse transcriptomique d'explants pulmonaire en cellule unique montrent une expression d'ARNm TG2 inférieure sur les poumons DCG en comparaison des poumons sains. Dans l'hypothèse que dans la DCG chez l'humain les fibroblastes pulmonaires, et dans une moindre mesure les cellules épithéliales, sont les principales sources de TG2, il est important de rappeler que notre analyse comprend une grande majorité de cellules immunitaires et ne retrouve que très peu de cellules épithéliales, endothéliales ou fibroblastiques. Notre analyse n'a possiblement pas ciblé les cellules les plus pertinentes pour

la TG2. En 2020, une équipe américaine s'est attachée à réaliser un atlas cellulaire moléculaire du poumon humain en utilisant cette technique de séquençage transcriptomique à cellule unique. On peut noter dans leur méthodologie qu'après dissociation cellulaire, les suspensions cellulaires étaient séparées en 3 populations : cellules endothéliales, cellules immunitaires/endothéliales et cellules stromales. Un équilibrage de la représentation des compartiments tissulaires était ensuite réalisé pour le séquençage²⁶³. Effectivement, selon notre expérience, la technique de séquençage sur cellule unique sélectionne très faiblement les cellules stromales et épithéliales et nous ne sommes pas encore parvenus à réaliser les enrichissements décrits dans le travail de cette équipe.

Nous avons pu mettre au point dans le cadre de ce travail de thèse le modèle de transplantation trachéale hétérotopique. Brièvement, dans ce modèle des segments de trachée des souris donneuses ont été transplantés de manière hétérotopique, dans une poche sous-cutanée dorsale, sur des souris receveuses C57BL/6j. Pour les allogreffes, des trachées de souris BALB/c ont été transplantées chez des receveurs C57BL/6j et pour les isogreffes les donneurs étaient des souris C57BL/6j. Les souris receveuses ont été euthanasiées au 28ème jour pour récupérer le greffon trachéal (figure 8). Les trachées avec isogreffe ont un aspect histologique similaire à ce qui peut être constaté sur une trachée explantée non greffée, en dehors d'une accumulation de mucus dans la lumière, de la présence d'une néovascularisation pérित्रachéale et de tissu conjonctif pérित्रachéal. Sur les coupes histologiques d'allogreffe (coloration hématoxyline et éosine) les caractéristiques suivantes sont retrouvées systématiquement :

Destruction complète de l'épithélium

Obstruction de la lumière trachéale par du tissu conjonctif et infiltrat inflammatoire

Perte de la structure arrondie de la trachée avec déformation par traction des cartilages

Epaississement chorion

Ce modèle est décrit depuis 1993 et est toujours largement utilisé dans les travaux récents de recherche sur la DCG^{264,265}

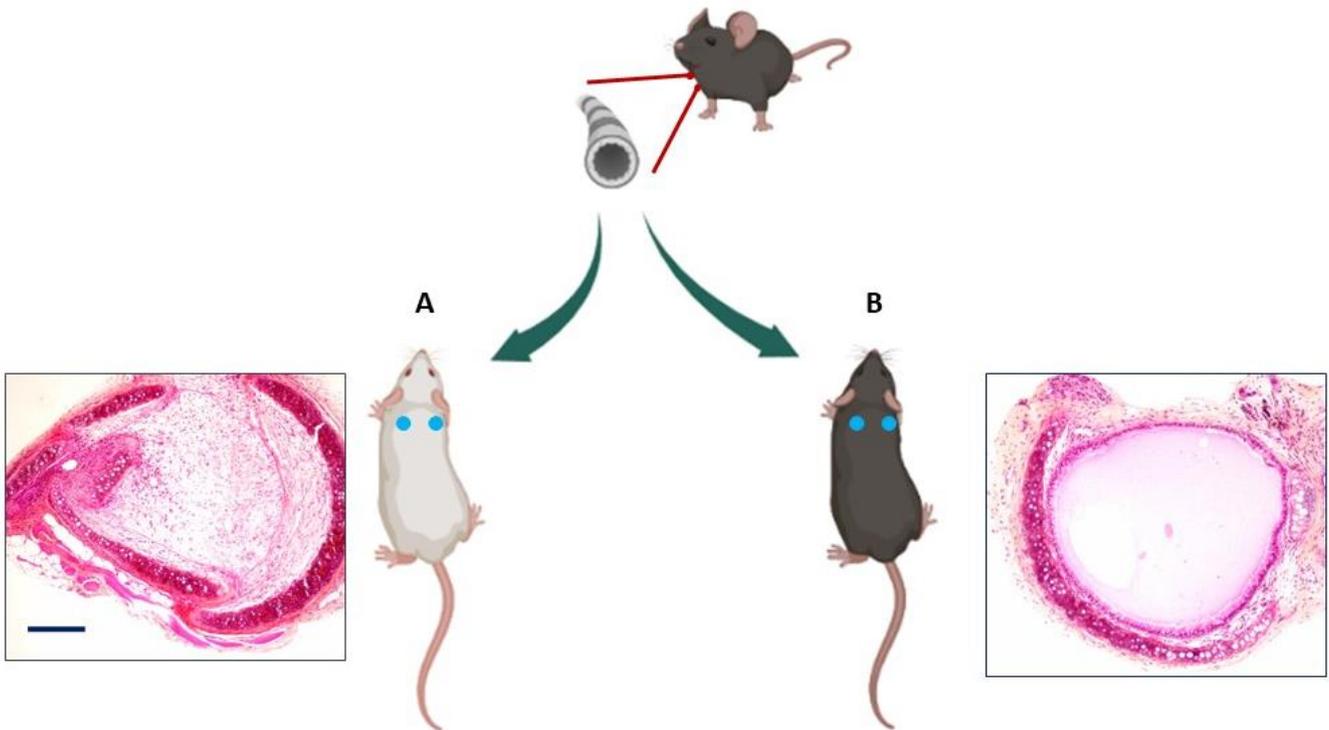


Figure 8. Modèle de transplantation trachéale hétérotopique. Souris donneuses C57BL/6, souris receveuse BALB/c pour les allogreffe (A) et souris receveuse C57BL/6 pour les isogreffes (B). Insertion des trachées en sous-cutanée dorsal (points bleus) et euthanasie des souris receveuses à 28 jours pour analyse des greffes trachéales. Coupes histologiques de trachées représentatives avec coloration hématoxiline et éosine. Barre d'échelle=200µm.

Nous avons réalisé une analyse immunohistochimique avec un marquage de la TG2 sur des coupes d'isogreffe et d'allogreffe. La TG2 est retrouvé dans les deux cas, de façon physiologique au niveau du cartilage et dans les allogreffes, au sein de l'infiltrat intraluminal, dans le chorion mais aussi dans le tissu pérित्रachéal (figure 9).

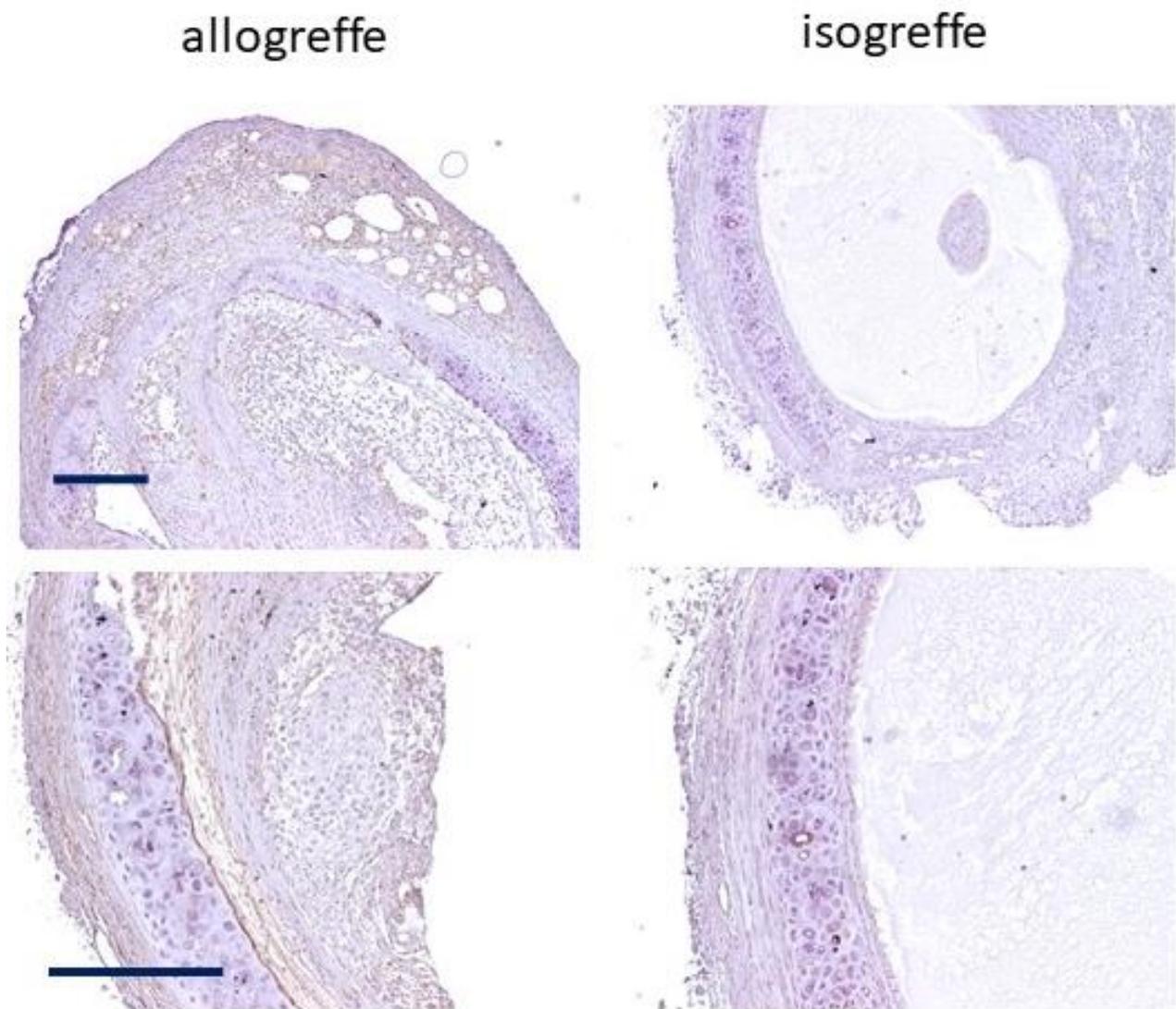


Figure 9. Expression de la TG2 dans le modèle murin de bronchiolite oblitérante. Marquage immunohistochimique TG2 apparaissant en marron. Allogreffe : donneur BALBc, receveur C57BL/6. Isogreffe : donneur C57BL/6, receveur C57BL/6. Images représentatives de 4 procédures par groupes. Barre d'échelle = 200µm

L'étape suivante de ce travail sera donc de réaliser l'expérimentation en comparant des souris de souche sauvage à des souris K.O. pour la TG2. Les travaux réalisés avec le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine suggèrent que le développement de l'oblitération intraluminaire trachéale pourrait être fortement diminuée. Certains inhibiteurs de la TG2 pourraient aussi être utilisés dans ce modèle afin de déterminer un effet curatif. Dans le cadre de ce travail de thèse d'université, j'ai également essayé de mettre au point dans notre laboratoire le modèle murin de transplantation monopulmonaire gauche. Ce

modèle est plus pertinent d'un point de vue physiologique. La procédure est très proche de celle réalisée chez l'homme, avec la réalisation d'anastomose bronchique, veineuse et artérielle entre le hile du receveur et le greffon du donneur. Le phénotype de DCG obtenu dépend de la combinaison de souches de souris et de l'utilisation ou non d'immunosuppresseurs mais il est le plus souvent de type mixte avec des lésions de bronchiolite oblitérante mais aussi une composante fibreuse pleuro-parenchymateuse²⁶⁶. Il faut cependant préciser que le niveau de compétence nécessaire en chirurgie est très élevé pour réaliser en routine ce modèle et que dans la littérature la reproductibilité est variable.

La MMP-9 comme biomarqueur de la DCG avait déjà été évaluée dans plusieurs travaux mais principalement au moment du diagnostic et surtout au niveau du LBA. L'étude que nous rapportons ici est la première à envisager un temps pré-déterminé d'analyse indépendant de la date de survenue de la DCG. Autrement dit, nous ne partons pas de la date de la DCG pour analyser ce qui s'est passé avant, nous partons de ce temps choisi (ici 1 an et 2 ans après transplantation) pour analyser ce qu'il se passe après. C'est une étape indispensable pour envisager une utilisation clinique de ce biomarqueur et les temps choisis nous permettent d'être suffisamment à distance des complications infectieuses, immunologiques ou chirurgicales précoces de la greffe pulmonaire mais suffisamment tôt avant la survenue d'une DCG, la médiane de diagnostic de la DCG se situant classiquement à plus de 3 ans post transplantation. Nous sommes les premiers à décrire dans une grande cohorte de patients transplantés pulmonaires que le taux sanguin de MMP-9 peut être pronostique de l'apparition de la DCG avec une aire sous la courbe de 66% sur l'analyse ROC et de 53% sur l'analyse PR. Ces chiffres peuvent paraître faibles, probablement en raison de la grande variabilité des taux sanguins de MMP-9 dans chaque groupe de patients. Il s'agit bien d'une limitation si l'on considère pour un patient donné, la seule utilisation de ce biomarqueur. Il est cependant important de noter qu'à ce jour, il n'existe aucun paramètre permettant réellement d'établir un pronostic pour la survenue de la DCG. Nous ne considérerions pas la MMP-9 "seule" comme un biomarqueur prédictif du CLAD, mais ce travail démontre clairement son potentiel pour augmenter l'efficacité d'un score multidimensionnel du CLAD. Notre groupe a déjà rapporté une analyse de l'expression des gènes sanguins dans laquelle nous avons identifié trois gènes, le POU class 2 associating factor 1, la T-cell leukemia/lymphoma protein 1A et la B cell lymphocyte kinase, qui ont été validés comme biomarqueurs prédictifs de la BOS plus de 6 mois avant le

diagnostic²⁶⁷. Nous avons également constaté un phénotypage différentiel des lymphocytes T et B entre les receveurs DCG et les receveurs stables, là encore en amont du diagnostic de la DCG^{137,141}. Une étude multicentrique prospective est en cours dans laquelle chacun de ces paramètres sera analysé et avec l'objectif de les intégrer dans un score pronostic multidimensionnel.

VIII. Conclusions

Ce travail apporte des éléments démontrant une expression élevée de la TG2 dans le contexte de la DCG, en condition réelle, à un stade tardif de la maladie sur des explants pulmonaires avec DCG, mais aussi de façon plus précoce sur des biopsies transbronchiques réalisées chez des transplantés pulmonaires. Le modèle cellulaire nous permet d'identifier une association probable entre la TG2 et un des marqueurs de la DCG, la MMP-9 par un mécanisme précis qui reste à déterminer. J'ai pu également confirmer que la MMP-9 plasmatique est un biomarqueur associé à la survenue de la DCG avec un potentiel pronostic intéressant pour être intégré dans un score multidimensionnel. Finalement, l'expression de la TG2 dans le modèle murin de transplantation trachéale hétérotopique nous permet d'envisager l'exploration de voies thérapeutiques agissant sur la TG2. Cette recherche est particulièrement importante dans le cadre de la transplantation pulmonaire, la DCG étant, à ce jour l'obstacle principal limitant l'espérance de vie à long terme des patients bénéficiant d'une greffe pulmonaire. La découverte de traitements efficaces pouvant influencer de façon spécifique sur la DCG sans jouer sur le risque infectieux ou tumoral est une des avancées, attendue depuis longtemps, par les patients et les équipes soignantes.

IX. Références bibliographiques

1. Hardy, J. D., Webb, W. R., Dalton, M. L. & Walker, G. R. LUNG HOMOTRANSPLANTATION IN MAN. *JAMA* **186**, 1065–1074 (1963).
2. Perch, M. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-ninth adult lung transplantation report-2022; focus on lung transplant recipients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **41**, 1335–1347 (2022).
3. Agence de la biomédecine. <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-cardiaque-0>.
4. Moyron-Quiroz, J. E. *et al.* Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* **10**, 927–934 (2004).
5. Burgel, P.-R. *et al.* Rapid Improvement after Starting Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and Advanced Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **204**, 64–73 (2021).
6. Registre français de la mucoviscidose. *Vaincre la Mucoviscidose* <https://www.vaincrelamuco.org/registredelamuco> (2015).
7. Leard, L. E. *et al.* Consensus document for the selection of lung transplant candidates: An update from the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* (2021) doi:10.1016/j.healun.2021.07.005.
8. Collard, H. R. *et al.* Burden of illness in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Med. Econ.* **15**, 829–835 (2012).
9. Courtwright, A. & Cantu, E. Lung transplantation in elderly patients. *J. Thorac. Dis.* **9**, 3346–3351 (2017).
10. Yusen, R. D. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report—2013; Focus Theme: Age. *J. Heart Lung Transplant.* **32**, 965–978 (2013).

11. Maurer, J. R., Frost, A. E., Estenne, M., Higenbottam, T. & Glanville, A. R. INTERNATIONAL GUIDELINES FOR THE SELECTION OF LUNG TRANSPLANT CANDIDATES. *Transplantation* **66**, 951–956 (1998).
12. Orens, J. B. *et al.* International Guidelines for the Selection of Lung Transplant Candidates: 2006 Update—A Consensus Report From the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **25**, 745–755 (2006).
13. Weill, D. *et al.* A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014—An update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **34**, 1–15 (2015).
14. Roux, A. *et al.* High Emergency Lung Transplantation: dramatic decrease of waiting list death rate without relevant higher post-transplant mortality. *Transpl. Int.* **28**, 1092–1101 (2015).
15. Yusen, R. D. *et al.* Lung Transplantation in the United States, 1999-2008. *Am. J. Transplant.* **10**, 1047–1068 (2010).
16. Fuehner, T. *et al.* Extracorporeal membrane oxygenation in awake patients as bridge to lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 763–768 (2012).
17. Sommer, W. *et al.* Extended criteria donor lungs and clinical outcome: results of an alternative allocation algorithm. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **32**, 1065–1072 (2013).
18. Abdoul, N. *et al.* Impact of ex vivo lung perfusion on brain-dead donor lung utilization: The French experience. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **22**, 1409–1417 (2022).
19. Sage, E. *et al.* Lung transplantation from initially rejected donors after ex vivo lung reconditioning: the French experience. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **46**, 794–799 (2014).

20. Levvey, B. J. *et al.* Excellent clinical outcomes from a national donation-after-determination-of-cardiac-death lung transplant collaborative. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **12**, 2406–2413 (2012).
21. Agence de la biomédecine. <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-cardio-pulmonaire-et-pulmonaire-0>.
22. Noirclerc, M. J. *et al.* Bilateral bronchial anastomosis in double lung and heart-lung transplantations. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **4**, 314–317 (1990).
23. Esmore, D. S. *et al.* Techniques and results in bilateral sequential single lung transplantation. The National Heart & Lung Replacement Service. *J. Card. Surg.* **9**, 1–14 (1994).
24. Mohite, P. N. *et al.* The role of cardiopulmonary bypass in lung transplantation. *Clin. Transplant.* **30**, 202–209 (2016).
25. Venuta, F. *et al.* Bilateral sequential lung transplantation without sternal division. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **23**, 894–897 (2003).
26. Shagabayeva, L. *et al.* Induction therapy in lung transplantation: A contemporary analysis of trends and outcomes. *Clin. Transplant.* **36**, e14782 (2022).
27. Treede, H. *et al.* Tacrolimus and cyclosporine have differential effects on the risk of development of bronchiolitis obliterans syndrome: results of a prospective, randomized international trial in lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **31**, 797–804 (2012).
28. Hachem, R. R. *et al.* A randomized controlled trial of tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **26**, 1012–1018 (2007).
29. Snell, G. I. *et al.* Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction, part I: Definition and grading—A 2016 Consensus Group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **36**, 1097–1103 (2017).

30. Delbove, A. *et al.* Incidence and risk factors of anastomotic complications after lung transplantation. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **16**, 17534666221110354 (2022).
31. Kotloff, R. M. & Thabut, G. Lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 159–171 (2011).
32. Aguilar-Guisado, M. *et al.* Pneumonia after lung transplantation in the RESITRA Cohort: a multicenter prospective study. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **7**, 1989–1996 (2007).
33. Kotton, C. N. *et al.* The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* **102**, 900 (2018).
34. Husain, S. *et al.* The 2015 International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the management of fungal infections in mechanical circulatory support and cardiothoracic organ transplant recipients: Executive summary. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **35**, 261–282 (2016).
35. Stewart, S. *et al.* Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **26**, 1229–1242 (2007).
36. Chambers, D. C. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **36**, 1047–1059 (2017).
37. Todd, J. L. *et al.* Risk Factors for Acute Rejection in the First Year after Lung Transplant. A Multicenter Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **202**, 576–585 (2020).
38. Verleden, S. E. *et al.* Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome: do risk factors differ? *Transplantation* **95**, 1167–1172 (2013).

39. Burton, C. M. *et al.* Acute cellular rejection is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome independent of post-transplant baseline FEV1. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **28**, 888–893 (2009).
40. Levine, D. J. *et al.* Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **35**, 397–406 (2016).
41. Roux, A. *et al.* First use of imlifidase desensitization in a highly sensitized lung transplant candidate: a case report. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **23**, 294–297 (2023).
42. Jordan, S. C. *et al.* IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 442–453 (2017).
43. Ohm, B. & Jungraithmayr, W. B Cell Immunity in Lung Transplant Rejection - Effector Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* **13**, 845867 (2022).
44. Witt, C. A. *et al.* Acute Antibody-Mediated Rejection After Lung Transplantation: A Retrospective, Single Center, Case Series. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **32**, 10.1016/j.healun.2013.07.004 (2013).
45. Aguilar, P. R. *et al.* The role of C4d deposition in the diagnosis of antibody-mediated rejection after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **18**, 936–944 (2018).
46. Young, K. A. & Dilling, D. F. The Future of Lung Transplantation. *Chest* **155**, 465–473 (2019).
47. Chambers, D. C. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report—2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J. Heart Lung Transplant.* **36**, 1047–1059 (2017).
48. Verleden, G. M. *et al.* Chronic lung allograft dysfunction: Definition, diagnostic criteria, and approaches to treatment—A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J. Heart Lung Transplant.* **38**, 493–503 (2019).

49. Meyer, K. C. *et al.* An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur. Respir. J.* **44**, 1479–1503 (2014).
50. Estenne, M. *et al.* Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J. Heart Lung Transplant.* **21**, 297–310 (2002).
51. Burke, C. M. *et al.* Post-Transplant Obliterative Bronchiolitis and Other Late Lung Sequelae in Human Heart-Lung Transplantation. *CHEST* **86**, 824–829 (1984).
52. Cooper, J. D. *et al.* A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **12**, 713–716 (1993).
53. Hota, P., Dass, C., Kumaran, M. & Simpson, S. High-Resolution CT Findings of Obstructive and Restrictive Phenotypes of Chronic Lung Allograft Dysfunction: More Than Just Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Am. J. Roentgenol.* **211**, W13–W21 (2018).
54. Sato, M. *et al.* Restrictive allograft syndrome (RAS): A novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J. Heart Lung Transplant.* **30**, 735–742 (2011).
55. Verleden, G. M. *et al.* Survival Determinants in Lung Transplant Patients With Chronic Allograft Dysfunction. *Transplantation* **92**, 703–708 (2011).
56. Verleden, S. E. *et al.* Restrictive chronic lung allograft dysfunction: Where are we now? *J. Heart Lung Transplant.* **34**, 625–630 (2015).
57. de Wall, C. *et al.* Home spirometry as early detector of azithromycin refractory bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Respir. Med.* **108**, 405–412 (2014).
58. Neurohr, C. *et al.* Prognostic value of bronchoalveolar lavage neutrophilia in stable lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **28**, 468–474 (2009).
59. Verleden, S. E. *et al.* Elevated bronchoalveolar lavage eosinophilia correlates with poor outcome after lung transplantation. *Transplantation* **97**, 83–89 (2014).

60. Verleden, S. E. *et al.* Predictors of survival in restrictive chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **35**, 1078–1084 (2016).
61. Sato, M. *et al.* Restrictive allograft syndrome (RAS): A novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J. Heart Lung Transplant.* **30**, 735–742 (2011).
62. Koutsokera, A. *et al.* Development of a Multivariate Prediction Model for Early-Onset Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Restrictive Allograft Syndrome in Lung Transplantation. *Front. Med.* **4**, 109 (2017).
63. Van Herck, A. *et al.* Validation of a post-transplant chronic lung allograft dysfunction classification system. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **38**, 166–173 (2019).
64. Meyer, K. C. *et al.* An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur. Respir. J.* **44**, 1479–1503 (2014).
65. Ross, D. J., Lewis, M. I., Kramer, M., Vo, A. & Kass, R. M. FK 506 ‘rescue’ immunosuppression for obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Chest* **112**, 1175–1179 (1997).
66. Borro, J. M. *et al.* Conversion from cyclosporine to tacrolimus stabilizes the course of lung function in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplant. Proc.* **39**, 2416–2419 (2007).
67. Sarahrudi, K. *et al.* International experience with conversion from cyclosporine to tacrolimus for acute and chronic lung allograft rejection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **127**, 1126–1132 (2004).
68. Kneidinger, N. *et al.* Five-year Outcome of an Early Everolimus-based Quadruple Immunosuppression in Lung Transplant Recipients: Follow-up of the 4EVERLUNG Study. *Transplantation* **106**, 1867–1874 (2022).
69. Strueber, M. *et al.* Everolimus Versus Mycophenolate Mofetil De Novo After Lung Transplantation: A Prospective, Randomized, Open-Label Trial. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **16**, 3171–3180 (2016).

70. Glanville, A. R. *et al.* Three-year results of an investigator-driven multicenter, international, randomized open-label de novo trial to prevent BOS after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **34**, 16–25 (2015).
71. Gerhardt, S. G. *et al.* Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 121–125 (2003).
72. Verleden, G. M. & Dupont, L. J. Azithromycin therapy for patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* **77**, 1465–1467 (2004).
73. Yates, B. *et al.* Azithromycin reverses airflow obstruction in established bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 772–775 (2005).
74. R, V. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of azithromycin involved in treatment and prevention of chronic lung allograft rejection. *Transplantation* **94**, (2012).
75. Vos, R. *et al.* Long-term azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: divide and conquer? *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **29**, 1358–1368 (2010).
76. Gottlieb, J. *et al.* Long-term azithromycin for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* **85**, 36–41 (2008).
77. Corris, P. A. *et al.* A randomised controlled trial of azithromycin therapy in bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) post lung transplantation. *Thorax* **70**, 442–450 (2015).
78. Gan, C. T.-J. *et al.* Long-term effect of azithromycin in bronchiolitis obliterans syndrome. *BMJ Open Respir. Res.* **6**, e000465 (2019).
79. Vos, R. *et al.* A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *Eur. Respir. J.* **37**, 164–172 (2011).
80. Blondeau, K. *et al.* Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur. Respir. J.* **31**, 707–713 (2008).
81. King, B. J., Iyer, H., Leidi, A. A. & Carby, M. R. Gastroesophageal reflux in bronchiolitis obliterans syndrome: a new perspective. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **28**, 870–875 (2009).

82. Burlen, J. *et al.* Investigating Defects of Esophageal Motility in Lung Transplant Recipients. *Gastroenterol. Res.* **15**, 120–126 (2022).
83. Tangaroonsanti, A. *et al.* Impaired Esophageal Motility and Clearance Post-Lung Transplant: Risk For Chronic Allograft Failure. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **8**, e102 (2017).
84. Davis, C. S. *et al.* A review of the potential applications and controversies of non-invasive testing for biomarkers of aspiration in the lung transplant population. *Clin. Transplant.* **24**, E54-61 (2010).
85. Davis, R. D. *et al.* Improved lung allograft function after fundoplication in patients with gastroesophageal reflux disease undergoing lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **125**, 533–542 (2003).
86. Cantu, E. *et al.* J. Maxwell Chamberlain Memorial Paper. Early fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Ann. Thorac. Surg.* **78**, 1142–1151; discussion 1142-1151 (2004).
87. Hoppo, T. *et al.* Antireflux surgery preserves lung function in patients with gastroesophageal reflux disease and end-stage lung disease before and after lung transplantation. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **146**, 1041–1047 (2011).
88. Hartwig, M. G. *et al.* Fundoplication after lung transplantation prevents the allograft dysfunction associated with reflux. *Ann. Thorac. Surg.* **92**, 462–468; discussion; 468–469 (2011).
89. Kowalski, E. *et al.* Outcomes of partial fundoplication for GERD-related allograft decline after lung transplantation. *Surg. Endosc.* (2022) doi:10.1007/s00464-022-09529-8.
90. Greer, M. *et al.* Phenotyping established chronic lung allograft dysfunction predicts extracorporeal photopheresis response in lung transplant patients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13**, 911–918 (2013).
91. Del Fante, C. *et al.* Long-Term Off-Line Extracorporeal Photochemotherapy in Patients with Chronic Lung Allograft Rejection Not Responsive to Conventional Treatment: A 10-Year Single-Centre Analysis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* **90**, 118–128 (2015).

92. Benden, C. *et al.* Extracorporeal photopheresis after lung transplantation: a 10-year single-center experience. *Transplantation* **86**, 1625–1627 (2008).
93. Jaksch, P. *et al.* A prospective interventional study on the use of extracorporeal photopheresis in patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **31**, 950–957 (2012).
94. Leroux, J. *et al.* Initiation of extracorporeal photopheresis in lung transplant patients with mild to moderate refractory BOS: A single-center real-life experience. *Respir. Med. Res.* **81**, 100913 (2022).
95. Hall, D. J. *et al.* Two Decades of Lung Retransplantation: A Single-Center Experience. *Ann. Thorac. Surg.* **103**, 1076–1083 (2017).
96. Ren, D. *et al.* Retransplantation Outcomes at a Large Lung Transplantation Program. *Transplant. Direct* **4**, e404 (2018).
97. Harhay, M. O. *et al.* Epidemiology, risk factors, and outcomes of lung retransplantation: An analysis of the International Society for Heart and Lung Transplantation Thoracic Transplant Registry. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **41**, 1478–1486 (2022).
98. Verleden, S. E. *et al.* Impact of CLAD Phenotype on Survival After Lung Retransplantation: A Multicenter Study: Lung Retransplantation for CLAD. *Am. J. Transplant.* **15**, 2223–2230 (2015).
99. Sommer, W. *et al.* Technique and Outcomes of Less Invasive Lung Retransplantation. *Transplantation* **102**, 530–537 (2018).
100. Vos, R. *et al.* Pirfenidone in restrictive allograft syndrome after lung transplantation: A case series. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **18**, 3045–3059 (2018).
101. Bennett, D. *et al.* Pirfenidone in chronic lung allograft dysfunction: a single cohort study. *Panminerva Med.* **62**, 143–149 (2020).

102. Iacono, A. *et al.* A randomised single-centre trial of inhaled liposomal cyclosporine for bronchiolitis obliterans syndrome post-lung transplantation. *ERJ Open Res.* **5**, 00167–02019 (2019).
103. Neurohr, C. *et al.* A randomized controlled trial of liposomal cyclosporine A for inhalation in the prevention of bronchiolitis obliterans syndrome following lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **22**, 222–229 (2022).
104. Fisher, A. J. *et al.* The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **5**, 537–543 (2005).
105. Derom, F. *et al.* Ten-month survival after lung homotransplantation in man. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **61**, 835–846 (1971).
106. Verleden, S. E. *et al.* When tissue is the issue: A histological review of chronic lung allograft dysfunction. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **20**, 2644–2651 (2020).
107. Colombat, M., Holifanjaniaina, S., Hirschi, S., Mal, H. & Stern, M. Histologic reconstruction of bronchiolar lesions in lung transplant patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* **38**, 1157–1158 (2014).
108. Todd, J. L. *et al.* Amphiregulin contributes to airway remodeling in chronic allograft dysfunction after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **20**, 825–833 (2020).
109. Todd, J. L. *et al.* Hyaluronan contributes to bronchiolitis obliterans syndrome and stimulates lung allograft rejection through activation of innate immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 556–566 (2014).
110. Borthwick, L. A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Induced Airway Epithelial Injury Drives Fibroblast Activation: A Mechanism in Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **16**, 1751–1765 (2016).

111. Pain, M. *et al.* T Cells Promote Bronchial Epithelial Cell Secretion of Matrix Metalloproteinase-9 via a C-C Chemokine Receptor Type 2 Pathway: Implications for Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am. J. Transplant.* n/a-n/a (2017) doi:10.1111/ajt.14166.
112. LaPar, D. J. *et al.* Circulating fibrocytes correlate with bronchiolitis obliterans syndrome development after lung transplantation: a novel clinical biomarker. *Ann. Thorac. Surg.* **92**, 470–477; discussion 477 (2011).
113. Nicolls, M. R., Hsu, J. L. & Jiang, X. Microvascular injury after lung transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **21**, 279–284 (2016).
114. Ofek, E. *et al.* Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **26**, 350–356 (2013).
115. Paraskeva, M. *et al.* Acute fibrinoid organizing pneumonia after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1360–1368 (2013).
116. Sato, M. *et al.* Revisiting the pathologic finding of diffuse alveolar damage after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **31**, 354–363 (2012).
117. Vandermeulen, E. *et al.* Immunological diversity in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction: a comprehensive immunohistochemical analysis. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **30**, 134–143 (2017).
118. Verleden, S. E. *et al.* Linking clinical phenotypes of chronic lung allograft dysfunction to changes in lung structure. *Eur. Respir. J.* **46**, 1430–1439 (2015).
119. Elssner, A. & Vogelmeier, C. The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **3**, 168–176 (2001).

120. Bos, S., Milross, L., Filby, A. J., Vos, R. & Fisher, A. J. Immune processes in the pathogenesis of chronic lung allograft dysfunction: identifying the missing pieces of the puzzle. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **31**, 220060 (2022).
121. Vandermeulen, E. *et al.* BAL neutrophilia in azithromycin-treated lung transplant recipients: Clinical significance. *Transpl. Immunol.* **33**, 37–44 (2015).
122. Darley, D. R. *et al.* Eosinophils in transbronchial biopsies: a predictor of chronic lung allograft dysfunction and reduced survival after lung transplantation — a retrospective single-center cohort study. *Transpl. Int.* **34**, 62–75 (2021).
123. Bos, S., Filby, A. J., Vos, R. & Fisher, A. J. Effector immune cells in chronic lung allograft dysfunction: A systematic review. *Immunology* **166**, 17–37 (2022).
124. Onyema, O. O. *et al.* Eosinophils downregulate lung alloimmunity by decreasing TCR signal transduction. *JCI Insight* **4**, e128241, 128241 (2019).
125. Onyema, O. O. *et al.* Deciphering the Role of Eosinophils in Solid Organ Transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **20**, 924–930 (2020).
126. Eguíluz-Gracia, I. *et al.* Long-term persistence of human donor alveolar macrophages in lung transplant recipients. *Thorax* **71**, 1006–1011 (2016).
127. Snyder, M. E. *et al.* Rate of recipient-derived alveolar macrophage development and major histocompatibility complex cross-decoration after lung transplantation in humans. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **22**, 574–587 (2022).
128. Moshkelgosha, S. *et al.* Interferon-stimulated and metallothionein-expressing macrophages are associated with acute and chronic allograft dysfunction after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **41**, 1556–1569 (2022).
129. Bernasconi, E. *et al.* Airway Microbiota Determines Innate Cell Inflammatory or Tissue Remodeling Profiles in Lung Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 1252–1263 (2016).

130. Fildes, J. E. *et al.* Natural killer cells in peripheral blood and lung tissue are associated with chronic rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **27**, 203–207 (2008).
131. Jungraithmayr, W. *et al.* Cytokine complex-expanded natural killer cells improve allogeneic lung transplant function via depletion of donor dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1349–1359 (2013).
132. Gracon, A. S. A. & Wilkes, D. S. Lung transplantation: Chronic allograft dysfunction and establishing immune tolerance. *Hum. Immunol.* **75**, 887–894 (2014).
133. Yamada, Y., Brüstle, K. & Jungraithmayr, W. T Helper Cell Subsets in Experimental Lung Allograft Rejection. *J. Surg. Res.* **233**, 74–81 (2019).
134. Nakagiri, T., Inoue, M., Minami, M., Shintani, Y. & Okumura, M. Immunology mini-review: the basics of T(H)17 and interleukin-6 in transplantation. *Transplant. Proc.* **44**, 1035–1040 (2012).
135. Ius, F. *et al.* Increased frequency of CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} T cells early after lung transplant is associated with improved graft survival - a retrospective study. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **33**, 503–516 (2020).
136. Mamessier, E. *et al.* T regulatory cells in stable posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* **84**, 908–916 (2007).
137. Durand, M. *et al.* High circulating CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ T-cell sub-population early after lung transplantation is associated with development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **37**, 770–781 (2018).
138. Schmitz, R. *et al.* B cells in transplant tolerance and rejection: friends or foes? *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **33**, 30–40 (2020).
139. Schreurs, I. *et al.* Lung Transplant Patients Show a Dissimilar Peripheral B-Cell Subset Ratio Compared With Healthy Controls. *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* **18**, 234–241 (2020).

140. Chesneau, M., Danger, R., Souillou, J.-P. & Brouard, S. B cells in operational tolerance. *Hum. Immunol.* **79**, 373–379 (2018).
141. Brosseau, C. *et al.* Blood CD9+ B cell, a biomarker of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **19**, 3162–3175 (2019).
142. Piloni, D. *et al.* Peripheral CD19+CD24^{high}CD38^{high} B-regulatory cells in lung transplant recipients. *Transpl. Immunol.* **57**, 101245 (2019).
143. Sureshbabu, A., Fleming, T. & Mohanakumar, T. Autoantibodies in lung transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **33**, 41–49 (2020).
144. Royer, P.-J. *et al.* Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. *Transplantation* **100**, 1803–1814 (2016).
145. Borthwick, L. A. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax* **64**, 770–777 (2009).
146. Borthwick, L. A. *et al.* TNF α from classically activated macrophages accentuates epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13**, 621–633 (2013).
147. Heijink, I. H. *et al.* Metalloproteinase Profiling in Lung Transplant Recipients With Good Outcome and Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Transplantation* **99**, 1946 (2015).
148. Banerjee, B. *et al.* The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **30**, 1175–1185 (2011).
149. Hübner, R. H. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur. Respir. J.* **25**, 494–501 (2005).
150. Rahman, M. *et al.* Novel role for tumor suppressor gene, liver kinase B1, in epithelial-mesenchymal transition leading to chronic lung allograft dysfunction. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **22**, 843–852 (2022).

151. Vanstapel, A. *et al.* Connective Tissue Growth Factor Is Overexpressed in Explant Lung Tissue and Broncho-Alveolar Lavage in Transplant-Related Pulmonary Fibrosis. *Front. Immunol.* **12**, 661761 (2021).
152. Eckert, R. L. *et al.* Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol. Rev.* **94**, 383–417 (2014).
153. Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140–156 (2003).
154. Sarkar, N. K., Clarke, D. D. & Waelsch, H. An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 451–452 (1957).
155. Grenard, P., Bates, M. K. & Aeschlimann, D. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J. Biol. Chem.* **276**, 33066–33078 (2001).
156. John, S. *et al.* Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PloS One* **7**, e34252 (2012).
157. Csobán-Szabó, Z. *et al.* Biochemical Characterisation of Human Transglutaminase 4. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12448 (2021).
158. Cassidy, A. J. *et al.* A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 909–917 (2005).
159. Thomas, H. *et al.* Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function. *Amino Acids* **44**, 161–177 (2013).
160. Lu, S., Saydak, M., Gentile, V., Stein, J. P. & Davies, P. J. Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **270**, 9748–9756 (1995).

161. Tsujimoto, I., Moriya, K., Sakai, K., Dickneite, G. & Sakai, T. Critical role of factor XIII in the initial stages of carbon tetrachloride-induced adult liver remodeling. *Am. J. Pathol.* **179**, 3011–3019 (2011).
162. Satchwell, T. J., Shoemark, D. K., Sessions, R. B. & Toye, A. M. Protein 4.2: a complex linker. *Blood Cells. Mol. Dis.* **42**, 201–210 (2009).
163. Deasey, S., Shanmugasundaram, S. & Nurminskaya, M. Tissue-specific responses to loss of transglutaminase 2. *Amino Acids* **44**, 179–187 (2013).
164. Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J. & Johnson, G. V. W. Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 406–419 (2012).
165. Nicholas, B., Smethurst, P., Verderio, E., Jones, R. & Griffin, M. Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity. *Biochem. J.* **371**, 413–422 (2003).
166. Category:Tissue transglutaminase - MyMediaWiki.
http://genomics.dote.hu/mediawiki/index.php/Category:Tissue_transglutaminase.
167. Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C. M. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.* **368**, 377–396 (2002).
168. Achyuthan, K. E. & Greenberg, C. S. Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 1901–1906 (1987).
169. Baek, K. J. *et al.* Oxytocin receptor couples to the 80 kDa Gh alpha family protein in human myometrium. *Biochem. J.* **315 (Pt 3)**, 739–744 (1996).
170. Vezza, R., Habib, A. & FitzGerald, G. A. Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein, Gh. *J. Biol. Chem.* **274**, 12774–12779 (1999).
171. Tee, A. E. L. *et al.* Opposing effects of two tissue transglutaminase protein isoforms in neuroblastoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **285**, 3561–3567 (2010).

172. Pinkas, D. M., Strop, P., Brunger, A. T. & Khosla, C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.* **5**, e327 (2007).
173. Stammaes, J., Pinkas, D. M., Fleckenstein, B., Khosla, C. & Sollid, L. M. Redox regulation of transglutaminase 2 activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 25402–25409 (2010).
174. Mishra, S., Melino, G. & Murphy, L. J. Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 18108–18115 (2007).
175. Mishra, S., Saleh, A., Espino, P. S., Davie, J. R. & Murphy, L. J. Phosphorylation of histones by tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* **281**, 5532–5538 (2006).
176. Mishra, S. & Murphy, L. J. Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 23863–23868 (2004).
177. Beninati, S., Piacentini, M. & Bergamini, C. M. Transglutaminase 2, a double face enzyme. *Amino Acids* **49**, 415–423 (2017).
178. Mastroberardino, P. G. *et al.* 'Tissue' transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1357–1365 (2006).
179. Szondy, Z. *et al.* Tissue transglutaminase (TG2) protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by regulating ATP synthesis. *Cell Death Differ.* **13**, 1827–1829 (2006).
180. Malorni, W. *et al.* The adenine nucleotide translocator 1 acts as a type 2 transglutaminase substrate: implications for mitochondrial-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* **16**, 1480–1492 (2009).
181. Tatsukawa, H. & Hitomi, K. Role of Transglutaminase 2 in Cell Death, Survival, and Fibrosis. *Cells* **10**, 1842 (2021).

182. Shimada, J. *et al.* Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **15**, 1677–1692 (2001).
183. Carbone, C. *et al.* Tissue transglutaminase (TG2) is involved in the resistance of cancer cells to the histone deacetylase (HDAC) inhibitor vorinostat. *Amino Acids* **49**, 517–528 (2017).
184. D’Eletto, M. *et al.* Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation. *Autophagy* **5**, 1145–1154 (2009).
185. Tucholski, J. & Johnson, G. V. W. Tissue transglutaminase differentially modulates apoptosis in a stimuli-dependent manner. *J. Neurochem.* **81**, 780–791 (2002).
186. Fok, J. Y. & Mehta, K. Tissue transglutaminase induces the release of apoptosis inducing factor and results in apoptotic death of pancreatic cancer cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **12**, 1455–1463 (2007).
187. Akar, U. *et al.* Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **5**, 241–249 (2007).
188. Filiano, A. J., Tucholski, J., Dolan, P. J., Colak, G. & Johnson, G. V. W. Transglutaminase 2 protects against ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* **39**, 334–343 (2010).
189. Diaz-Hidalgo, L. *et al.* Transglutaminase type 2-dependent selective recruitment of proteins into exosomes under stressful cellular conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2084–2092 (2016).
190. Nelea, V., Nakano, Y. & Kaartinen, M. T. Size distribution and molecular associations of plasma fibronectin and fibronectin crosslinked by transglutaminase 2. *Protein J.* **27**, 223–233 (2008).
191. Spurlin, T. A., Bhadriraju, K., Chung, K.-H., Tona, A. & Plant, A. L. The treatment of collagen fibrils by tissue transglutaminase to promote vascular smooth muscle cell contractile signaling. *Biomaterials* **30**, 5486–5496 (2009).
192. Bershadsky, A., Kozlov, M. & Geiger, B. Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 472–481 (2006).
193. Akimov, S. S., Krylov, D., Fleischman, L. F. & Belkin, A. M. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J. Cell Biol.* **148**, 825–838 (2000).

194. Tóth, B. *et al.* Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 2084–2092 (2009).
195. Telci, D., Collighan, R. J., Basaga, H. & Griffin, M. Increased TG2 expression can result in induction of transforming growth factor beta1, causing increased synthesis and deposition of matrix proteins, which can be regulated by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **284**, 29547–29558 (2009).
196. Lesort, M., Attanavanich, K., Zhang, J. & Johnson, G. V. Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* **273**, 11991–11994 (1998).
197. Tatsukawa, H. *et al.* Role of transglutaminase 2 in liver injury via cross-linking and silencing of transcription factor Sp1. *Gastroenterology* **136**, 1783-1795.e10 (2009).
198. Ahn, J.-S. *et al.* Tissue transglutaminase-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 743–747 (2008).
199. Li, Z., Xu, X., Bai, L., Chen, W. & Lin, Y. Epidermal growth factor receptor-mediated tissue transglutaminase overexpression couples acquired tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance and migration through c-FLIP and MMP-9 proteins in lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 21164–21172 (2011).
200. Kang, S.-K., Lee, J.-Y., Chung, T.-W. & Kim, C.-H. Overexpression of transglutaminase 2 accelerates the erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia K562 cell line through PI3K/Akt signaling pathway. *FEBS Lett.* **577**, 361–366 (2004).
201. Park, M. K. *et al.* Transglutaminase-2 induces N-cadherin expression in TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transition via c-Jun-N-terminal kinase activation by protein phosphatase 2A down-regulation. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **49**, 1692–1705 (2013).
202. Lee, H.-T. *et al.* Transglutaminase 2 Promotes Migration and Invasion of Lung Cancer Cells. *Oncol. Res.* **26**, 1175–1182 (2018).
203. Choi, J. *et al.* Transglutaminase 2 induces intrinsic EGFR-TKI resistance in NSCLC harboring EGFR sensitive mutations. *Am. J. Cancer Res.* **9**, 1708–1721 (2019).

204. Lee, M.-Y. *et al.* Tissue transglutaminase 2 expression is epigenetically regulated in human lung cancer cells and prevents reactive oxygen species-induced apoptosis. *Cancer Manag. Res.* **10**, 2835–2848 (2018).
205. Lei, X. *et al.* Nuclear Transglutaminase 2 interacts with topoisomerase II α to promote DNA damage repair in lung cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **40**, 224 (2021).
206. Jeong, J.-H. *et al.* Transglutaminase 2 Expression Predicts Progression Free Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *J. Korean Med. Sci.* **28**, 1005–1014 (2013).
207. Chihong, Z. *et al.* Prognostic value of transglutaminase 2 in non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* **8**, 45577–45584 (2017).
208. Cm, C. *et al.* Transglutaminase 2 as an independent prognostic marker for survival of patients with non-adenocarcinoma subtype of non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **10**, (2011).
209. Basil, M. C. *et al.* The Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* **26**, 482–502 (2020).
210. Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801 (2014).
211. Philp, C. J. *et al.* Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **58**, 594–603 (2018).
212. Olsen, K. C. *et al.* Transglutaminase 2 and its role in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 699–707 (2011).
213. Wang, K. *et al.* Blocking TG2 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through inhibiting EMT. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **276**, 103402 (2020).
214. Fell, S., Wang, Z., Blanchard, A., Nanthakumar, C. & Griffin, M. Transglutaminase 2: a novel therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis using selective small molecule inhibitors. *Amino Acids* **53**, 205–217 (2021).

215. Takeuchi, T. *et al.* Spatially Resolved Identification of Transglutaminase Substrates by Proteomics in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **65**, 319–330 (2021).
216. Luciani, A. *et al.* Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat. Cell Biol.* **12**, 863–875 (2010).
217. Maiuri, L. *et al.* Tissue transglutaminase activation modulates inflammation in cystic fibrosis via PPARgamma down-regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 7697–7705 (2008).
218. Nguyen, T. N. *et al.* Decreased CFTR/PPARγ and increased transglutaminase 2 in nasal polyps. *Auris. Nasus. Larynx* **49**, 964–972 (2022).
219. Shrestha, C. L. *et al.* Cysteamine-mediated clearance of antibiotic-resistant pathogens in human cystic fibrosis macrophages. *PLoS One* **12**, e0186169 (2017).
220. Nyabam, S. *et al.* A novel regulatory role for tissue transglutaminase in epithelial-mesenchymal transition in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2234–2244 (2016).
221. 2023 GOLD Report. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD*
<https://goldcopd.org/2023-gold-report-2/>.
222. Ohlmeier, S. *et al.* Lung tissue proteomics identifies elevated transglutaminase 2 levels in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **310**, L1155-1165 (2016).
223. Pocket Guide for Asthma Management and Prevention. *Global Initiative for Asthma - GINA*
<https://ginasthma.org/pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/>.
224. Oh, K. *et al.* Airway epithelial cells initiate the allergen response through transglutaminase 2 by inducing IL-33 expression and a subsequent Th2 response. *Respir. Res.* **14**, 35 (2013).
225. Dietz, K. *et al.* Age dictates a steroid-resistant cascade of Wnt5a, transglutaminase 2, and leukotrienes in inflamed airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 1343-1354.e6 (2017).
226. Nie, H. *et al.* Phenotypic switch in lung interstitial macrophage polarization in an ovalbumin-induced mouse model of asthma. *Exp. Ther. Med.* **14**, 1284–1292 (2017).

227. Hong, G. U., Park, B. S., Park, J. W., Kim, S. Y. & Ro, J. Y. IgE production in CD40/CD40L cross-talk of B and mast cells and mediator release via TGase 2 in mouse allergic asthma. *Cell. Signal.* **25**, 1514–1525 (2013).
228. Lee, H. S. *et al.* Transglutaminase 2 contributes to the asthmatic inflammation by modulating activation of alveolar macrophages. *Immun. Inflamm. Dis.* **9**, 871–882 (2021).
229. Yamaguchi, M., Zacharia, J., Laidlaw, T. M. & Balestrieri, B. PLA2G5 regulates transglutaminase activity of human IL-4-activated M2 macrophages through PGE2 generation. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 131–141 (2016).
230. Trinh, H. K. T. *et al.* Osteopontin contributes to late-onset asthma phenotypes in adult asthma patients. *Exp. Mol. Med.* **52**, 253–265 (2020).
231. Soveg, F. *et al.* Regulation of allergic lung inflammation by endothelial cell transglutaminase 2. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**, L573–583 (2015).
232. Penumatsa, K. C. *et al.* Transglutaminase 2 in pulmonary and cardiac tissue remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **313**, L752–L762 (2017).
233. Liu, B. *et al.* Role of TG2-Mediated SERCA2 Serotonylation on Hypoxic Pulmonary Vein Remodeling. *Front. Pharmacol.* **10**, 1611 (2019).
234. Wang, H.-M. *et al.* Cystamine slows but not inverses the progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **96**, 783–789 (2018).
235. Wang, T., Duan, Y., Liu, D., Li, G. & Liu, B. The effect of transglutaminase-2 inhibitor on pulmonary vascular remodeling in rats with pulmonary arterial hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **44**, 167–174 (2022).
236. Markvardsen, L. K. *et al.* Cystamine Treatment Fails to Prevent the Development of Pulmonary Hypertension in Chronic Hypoxic Rats. *J. Vasc. Res.* **58**, 237–251 (2021).
237. Chen, S. *et al.* Roles and potential clinical implications of tissue transglutaminase in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* **177**, 106085 (2022).

238. Cui, N., Hu, M. & Khalil, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **147**, 1–73 (2017).
239. Pendás, A. M., Balbín, M., Llano, E., Jiménez, M. G. & López-Otín, C. Structural Analysis and Promoter Characterization of the Human Collagenase-3 Gene (MMP13). *Genomics* **40**, 222–233 (1997).
240. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
241. P, C., W, S. & Ss, P. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **40**, (2012).
242. Patterson, M. L., Atkinson, S. J., Knäuper, V. & Murphy, G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* **503**, 158–162 (2001).
243. Chang, C. & Werb, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* **11**, S37-43 (2001).
244. Hirakawa, S. *et al.* Marked induction of matrix metalloproteinase-10 by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *J. Med. Virol.* **85**, 2141–2150 (2013).
245. Chakrabarti, S. & Patel, K. D. Matrix Metalloproteinase-2 (mmp-2) and Mmp-9 in Pulmonary Pathology. *Exp. Lung Res.* **31**, 599–621 (2005).
246. Choi, K. H. *et al.* The role of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cryptogenic organizing pneumonia. *Chest* **121**, 1478–1485 (2002).
247. Betsuyaku, T., Fukuda, Y., Parks, W. C., Shipley, J. M. & Senior, R. M. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am. J. Pathol.* **157**, 525–535 (2000).
248. Cabrera, S. *et al.* Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 2324–2338 (2007).
249. Dancer, R. C. A., Wood, A. M. & Thickett, D. R. Metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **38**, 1461–1467 (2011).

250. Bormann, T. *et al.* Role of matrix metalloprotease-2 and MMP-9 in experimental lung fibrosis in mice. *Respir. Res.* **23**, 180 (2022).
251. Inoue, R. *et al.* Amelioration of Pulmonary Fibrosis by Matrix Metalloproteinase-2 Overexpression. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6695 (2023).
252. Lepetit, H. *et al.* Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **25**, 834–842 (2005).
253. Tayebjee, M. H. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am. J. Hypertens.* **17**, 764–769 (2004).
254. Churg, A., Zhou, S. & Wright, J. L. Series ‘matrix metalloproteinases in lung health and disease’: Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur. Respir. J.* **39**, 197–209 (2012).
255. Weathington, N. M. *et al.* A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat. Med.* **12**, 317–323 (2006).
256. Gilowska, I. *et al.* Impact of Matrix Metalloproteinase 9 on COPD Development in Polish Patients: Genetic Polymorphism, Protein Level, and Their Relationship with Lung Function. *BioMed Res. Int.* **2018**, 6417415 (2018).
257. Omachi, T. A., Eisner, M. D., Rames, A., Markovtsova, L. & Blanc, P. D. Matrix metalloproteinase-9 predicts pulmonary status declines in α 1-antitrypsin deficiency. *Respir. Res.* **12**, 35 (2011).
258. Atkinson, J. J. *et al.* The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 876–884 (2011).
259. Boxhammer, E., Lehle, K., Schmid, C. & von Suesskind-Schwendi, M. Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction? *Exp. Lung Res.* **46**, 128–145 (2020).
260. Pain, M. *et al.* Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **23**, 118–130 (2014).

261. Hausch, F., Halttunen, T., Mäki, M. & Khosla, C. Design, synthesis, and evaluation of gluten peptide analogs as selective inhibitors of human tissue transglutaminase. *Chem. Biol.* **10**, 225–231 (2003).
262. D’Eletto, M., Rossin, F., Fedorova, O., Farrace, M. G. & Piacentini, M. Transglutaminase type 2 in the regulation of proteostasis. *Biol. Chem.* **400**, 125–140 (2019).
263. Travaglini, K. J. *et al.* A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* **587**, 619–625 (2020).
264. Hertz, M. I., Jessurun, J., King, M. B., Savik, S. K. & Murray, J. J. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am. J. Pathol.* **142**, 1945–1951 (1993).
265. Nemska, S. *et al.* Overexpression of the Msk1 Kinase in Patients With Chronic Lung Allograft Dysfunction and its Confirmed Role in a Murine Model. *Transplantation* (2020) doi:10.1097/TP.0000000000003606.
266. Yamada, Y. *et al.* Chronic Airway Fibrosis in Orthotopic Mouse Lung Transplantation Models-An Experimental Reappraisal. *Transplantation* **102**, e49–e58 (2018).
267. Danger, R. *et al.* Blood Gene Expression Predicts Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Front. Immunol.* **8**, 1841 (2017).

Titre : Etude du rôle de la transglutaminase 2 dans la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et de son interaction avec la MMP-9

Mots clés : Transplantation pulmonaire, Transglutaminase 2, dysfonction chronique du greffon pulmonaire, rejet chronique, MMP-9

Résumé : La dysfonction chronique du greffon pulmonaire (DCG) est la principale cause de décès à long terme des receveurs de transplantation pulmonaire et la physiopathologie reste encore partiellement élucidée. La transglutaminase 2 (TG2) est une protéine multifonctionnelle dont le rôle dans les processus fibrosants pulmonaires a été démontré. Notre objectif est d'explorer le rôle de la TG2 dans la DCG et de son interaction avec la MMP-9.

Nous avons effectué une analyse à deux niveaux de la TG2. Tout d'abord, sur des explants de poumons présentant une DCG, prélevés lors d'une retransplantation, ensuite sur un modèle cellulaire dans lequel des cellules épithéliales bronchiques humaines (CEB) sont exposées à des lymphocytes T allogéniques (LT). Finalement nous avons analysé de façon rétrospective le potentiel pronostique de la MMP-9 plasmatique pour la DCG à partir d'une cohorte de patients transplantés pulmonaire. L'analyse immunohistochimique d'explants pulmonaires de bronchiolite oblitérante a montré une forte expression

de TG2 comparable à celle de poumons de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique et supérieure à celle de poumons sains. Les CEB exposées aux LT activés et au TGF- β 1 expriment des niveaux élevés d'ARNm et de protéine TG2. L'inhibition chimique de l'activité enzymatique de la TG2 n'inverse pas l'évolution du phénotype fibroblastique et tend à diminuer l'expression de la MMP-9. La MMP-9 plasmatique mesurée 2 ans après transplantation a une valeur pronostique sur la survenue de la DCG.

La TG2 est surexprimé dans la DCG. Les CEB ont le potentiel d'exprimer la TG2 lorsqu'elles sont stimulées par des LT allogéniques activés et le TGF- β 1, ce qui ouvre la voie à des recherches thérapeutiques dans la DCG ciblant la TG2. La MMP-9 plasmatique pourrait être utilisée en surveillance clinique afin de prévenir la survenue de la DCG ou d'engager des traitements précoces.

Title : Analysis of TG2 role in chronic lung allograft dysfunction and interaction with MMP-9

Keywords : Lung transplantation, Transglutaminase 2, Chronic lung allograft dysfunction, chronic rejection, MMP-9

Abstract : Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is the main long-term cause of death of lung transplantation recipients and its physiopathology remains partially understood. Transglutaminase 2 (TG2) is a multifunctional protein that has been shown to have a role in lung fibrotic disease. Our objective is to explore the role of TG2 in CLAD and its interaction with MMP-9.

We performed a two levels analysis of TG2. First, on lung explant with CLAD, retrieved at the time of a retransplantation, second on a cellular model in which human bronchial epithelial cells (BEC) are exposed to allogenic T lymphocytes (ATL). Finally, we performed an retrospective analysis on the prognostic potential of plasmatic MMP-9 for CLAD from a cohort of lung transplant recipient.

Immunohistochemistry analysis of lung explants with bronchiolitis obliterans showed high expression of TG2

comparable to lung from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and increased as compared to healthy lung. BECs exposed to ATL and TGF- β 1 expressed high levels of TG2 mRNA and TG2 protein which were associated with increased expression of MMP9. Chemical inhibition of TG2 enzymatic activity did not reverse the fibroblastic phenotype evolution and tended to decrease MMP-9 expression. Plasmatic MMP-9 measured 2 years after transplantation was prognostic of CLAD. TG2 is overexpressed in CLAD lung. BEC have the potential to expressed TG2 when stimulated by activated TL and TGF- β 1 opening ways for therapeutic research in CLAD targeting TG2. Plasmatic MMP-9 could be used in a clinical setting to prevent CLAD onset or to engage early therapeutic interventions.

