



**HAL**  
open science

# Modifications de l'épithélium bronchique survenant au cours de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et rôle des microparticules leucocytaires

Benjamin Renaud-Picard

► **To cite this version:**

Benjamin Renaud-Picard. Modifications de l'épithélium bronchique survenant au cours de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et rôle des microparticules leucocytaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ104 . tel-04908377

**HAL Id: tel-04908377**

**<https://theses.hal.science/tel-04908377v1>**

Submitted on 23 Jan 2025

**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.

*Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé*

INSERM UMR 1260

**THÈSE** présentée par :

**Benjamin RENAUD-PICARD**

soutenue le : 15 décembre 2023

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Modifications de l'épithélium bronchique  
survenant au cours de la dysfonction chronique  
du greffon pulmonaire et rôle des  
microparticules leucocytaires**

**THÈSE dirigée par :**

**M. KESSLER Romain**  
**Mme OLLAND Anne**

PU-PH, Université de Strasbourg  
PU-PH, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS EXTERNES:**

**M. ANGLES-CANO Eduardo**  
**Mme MELONI Federica**

Professeur, Université Paris Cité  
PU-PH, Université de Pavie, Italie

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. GAGNADOUX Frederic**  
**Mme MARTINU Tereza**  
**Mme CAILLARD OHLMANN Sophie**

PU-PH, Université d'Angers  
Professeur associée, Université de Toronto, Canada  
PU-PH, Université de Strasbourg

## REMERCIEMENTS

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

*Merci au Professeur Romain Kessler pour avoir encadré ce travail, ainsi que pour ton accompagnement et tes conseils au cours de ces années passées à tes côtés. J'essayerai de m'en montrer digne.*

*Merci au Professeur Anne Olland, pour avoir également encadré ce travail, pour ta rigueur et tes conseils judicieux. Je suis ravi à l'idée de continuer à développer la transplantation pulmonaire Strasbourgeoise à tes côtés.*

*Merci au Docteur Tereza Martinu, grâce à qui ce travail n'aurait pas du tout été le même. Merci pour ta gentillesse, ta rigueur et ton enseignement bienveillant qui m'ont tellement aidé au cours de ces dernières années et m'ont permis de grandir sur le plan professionnel.*

*Merci au Docteur Stephen Juvet du Toronto Lung Transplant Program, pour son encadrement, ses conseils notamment dans le domaine de l'immunologie, toujours avec beaucoup d'humour.*

*Merci à l'ensemble de la CLAD team du Toronto Lung Transplant Program, en particulier Gregory, Tina, Allen, Betty, Mitsuaki, Sajad, Jenna, Liran, Iva, Marcelo, Max et Guan. Mon expérience à Toronto a vraiment été grandiose, en grande partie grâce à vous tous.*

*Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé pour la réalisation de l'ensemble de ce travail.*

*Merci au Professeur Céline Mascaux, pour tous tes conseils et tes encouragements, et pour me guider dans mon cursus.*

*Merci au Professeur Frederic De Blay pour votre confiance et votre soutien.*

*Merci à l'ensemble de mes collègues du service de pneumologie.*

*Merci au Professeur Nadia Benkirane-Jessel, au Professeur Laurence Kessler, ainsi qu'au Professeur Florence Toti, ainsi qu'à tous les membres de l'équipe de l'unité INSERM UMR 1260 de l'université de Strasbourg. Au plaisir de continuer à travailler avec vous au cours des années à venir.*

*Merci à tous les membres de ma famille qui continuent de me soutenir et de m'encourager dans cette folle aventure.*

*Et bien sûr, la meilleure pour la fin ! Merci à toi Anne-Lise, pour ton amour, ton soutien inconditionnel, ta présence dans les bons moments et ceux plus difficiles. The sky is the limit !*

*« La vérité vaut bien qu'on passe quelques années sans la trouver »*

*Jules Renard*

## Table des matières

|   |     |
|---|-----|
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....   | 5   |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....  | 6   |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....   | 8   |
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | 11  |
| <b>1 LA TRANSPLANTATION PULMONAIRE</b> .....  | 12  |
| <b>1.1 Généralités</b> .....  | 12  |
| <b>1.2 Principales complications survenant après une transplantation pulmonaire</b><br>.....  | 16  |
| <b>2. LA DYSFONCTION CHRONIQUE DU GREFFON PULMONAIRE</b> .....  | 28  |
| <b>2.1 Définitions et généralités</b> .....   | 28  |
| <b>2.2 Epithélium bronchique et CLAD</b> .....  | 34  |
| <b>2.3 Mécanismes cellulaires impliqués dans le CLAD</b> .....  | 36  |
| <b>3. LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE</b> .....   | 38  |
| <b>4. LES MICROPARTICULES MEMBRANAIRES</b> .....  | 47  |
| <b>4.1. Genèse et propriétés</b> .....  | 47  |
| <b>4.2. Les microparticules, marqueurs circulants et effecteurs cellulaires</b> .....   | 48  |
| <b>4.3. Microparticules et pathologies pulmonaires</b> .....  | 49  |
| <b>5. HYPOTHESES ET OBJECTIFS</b> .....   | 53  |
| <b>DONNEES PRELIMINAIRES</b> .....  | 55  |
| Article 1 : Analyse des différents phénotypes anatomopathologiques dans la dysfonction<br>chronique du greffon pulmonaire .....   | 57  |
| Article 2 : Utilisation de l'Imaging mass cytometry pour une analyse cellulaire et spatiale<br>détaillée de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire .....                          | 107 |
| <b>MICROPARTICULES MEMBRANAIRES ET BRONCHIOLITE OBLITERANTE</b> .....   | 151 |
| Article 3 : Transition épithélio-mésenchymateuse et microparticules membranaires :<br>implications potentielles dans la bronchiolite oblitérante après transplantation<br>pulmonaire..... | 153 |
| <b>DISCUSSION</b> .....   | 197 |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....   | 203 |
| <b>COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES</b> .....   | 209 |
| <b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b> .....   | 213 |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....  | 223 |

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1** : Grades de sévérité de la dysfonction primaire du greffon pulmonaire...18

**Tableau 2** : Définition du diagnostic de rejet aigu humoral clinique.....27

**Tableau 3** : Principaux phénotypes de dysfonction chronique du greffon pulmonaire.....30

**Tableau 4** : Effecteurs cellulaires et leurs marqueurs pour le phénotypage des MPs sélectionnées.....206

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Evolution des indications à une transplantation pulmonaire dans le temps et sur les différents continents.....   | 12 |
| <b>Figure 2</b> : Rapport d'activité de TP en France - agence de biomédecine 2022.....   | 13 |
| <b>Figure 3</b> : Courbe de survie du receveur après transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire selon la pathologie pulmonaire - agence de biomédecine 2022.....  | 15 |
| <b>Figure 4</b> : Fréquence des causes de décès survenant après une transplantation pulmonaire.....  | 16 |
| <b>Figure 5</b> : Complications infectieuses pouvant survenir après une transplantation pulmonaire.....  | 19 |
| <b>Figure 6</b> : Histologie du rejet aigu cellulaire, de l'inflammation des voies respiratoires et de la bronchiolite oblitérante.....  | 22 |
| <b>Figure 7</b> : Représentations des complexes majeurs d'histocompatibilité 1 et 2.....   | 24 |
| <b>Figure 8</b> : Mécanismes du rejet aigu cellulaire.....   | 25 |
| <b>Figure 9</b> : Algorithme pour les investigations et le diagnostic de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.....   | 29 |
| <b>Figure 10</b> : Stades de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.....   | 30 |
| <b>Figure 11</b> : Exemple d'une bronchiole normale et d'une bronchiole avec aspect de bronchiolite oblitérante.....   | 31 |
| <b>Figure 12</b> : Exemple d'une biopsie pulmonaire sans fibrose du parenchyme pulmonaire, et d'une biopsie collectée chez un patient atteint d'un rejet chronique type RAS, avec fibrose parenchymateuse diffuse..... | 32 |
| <b>Figure 13</b> : Exemple d'une biopsie pulmonaire avec plèvre normale, et d'une biopsie collectée chez un patient atteint d'un rejet chronique type RAS, avec fibrose pleurale.....                                  | 32 |
| <b>Figure 14</b> : Représentation schématique de la survenue de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.....  | 35 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 15 :</b> Représentation schématique résumant la physiopathologie de la bronchiolite oblitérante après une transplantation pulmonaire..... | 37  |
| <b>Figure 16 :</b> Représentation des 3 types de transition épithélio-mésenchymateuse.....  | 38  |
| <b>Figure 17 :</b> Facteurs de croissance impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse.....   | 40  |
| <b>Figure 18:</b> Représentation schématique du système uPAR à la surface des cellules.....   | 41  |
| <b>Figure 19:</b> Rôle du système uPAR au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.....   | 42  |
| <b>Figure 20 :</b> Représentation de la transition épithélio-mésenchymateuse de type 2 au cours du remodelage bronchique.....                       | 44  |
| <b>Figure 21 :</b> Remodelage membranaire et émission de microparticules par des cellules soumises à un stress.....                                 | 48  |
| <b>Figure 22 :</b> Technique d'Imaging mass cytometry.....  | 108 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ann-5: Annexine-5

Alpha-SMA: alpha smooth muscle actin

ATP: Adénosine triphosphate

BO: Bronchiolite oblitérante

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

CBPH: cellules bronchiques primitives humaines

CCL: chemokine ligand

CCSP: Club cell secretory protein

CD: Cluster de différenciation

CDK : Cycline Dependante Kinase

CLAD: Chronic lung allograft dysfunction (dysfonction chronique du greffon pulmonaire)

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV: Cytomegalovirus

CTGF: Connective Tissue Growth factor

CVF: Capacité vitale forcée (=FVC : Forced vital capacity)

CXCL : C-X-X motif Ligand

CPT : Capacité pulmonaire totale (=TLC : Total lung capacity)

DPG: Dysfonction primaire du greffon

DSA: Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies

EBV: Epstein-Barr virus

EFR: Epreuves fonctionnelles respiratoires

EGF: Epidermal growth factor

FGF: Fibroblast growth factor

FiO<sub>2</sub>: Fraction inspirée d'oxygène

HE: Hématoxyline éosine

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HLA: Human Leukocyte Antigène

HSV : Herpes simplex virus

HTP: Hypertension pulmonaire

IAFE: Intra-alveolar fibroelastosis

IHC: Immunohistochimie

IL : Interleukine

IMC: Imaging mass cytometry

INF $\gamma$ : Interferon gamma

IS: Immunosuppresseur

ISHLT: International Society for Heart and Lung Transplantation

LBA: Lavage broncho-alvéolaire

LPS: Lipopolysaccharide

MCAM : Melanoma Cell Adhesion Molecule

MMP: Métalloprotéinase matricielle

MP : Microparticule

MP<sub>CTL</sub> : Microparticules contrôles, de monocytes THP-1 non stimulés

MP<sub>LPS</sub> : Microparticules de monocytes THP-1 stimulés par le LPS de *Pseudomonas Aeruginosa*

MUC: Mucine

NETs : Neutrophils extracellular traps

PaO<sub>2</sub>: Pression partielle d'oxygène

PBS: Phosphate-buffered saline

PCP: *Pneumocystis carinii* pneumonia

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PhtdSer : Phosphatidylsérine

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

RAS : Restrictive allograft syndrome

RGO: Reflux gastroœsophagien

ROI: Regions of interest

SBO : Syndrome de bronchiolite oblitérante (=BOS : Bronchiolitis obliterans syndrome)

SAOS : Syndrome d'apnée obstructive du sommeil

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigue

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha

TP: Transplantation pulmonaire

tSNE: t-distributed stochastic neighbor embedding

UA : Unité arbitraire

uPA : urokinase-type plasminogen activator

uPAR : urokinase-type plasminogen activator receptor

VA : voies aériennes

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEMS: Volume Expiré Maximal Seconde (=FEV1: Forced expiratory volume in one second)

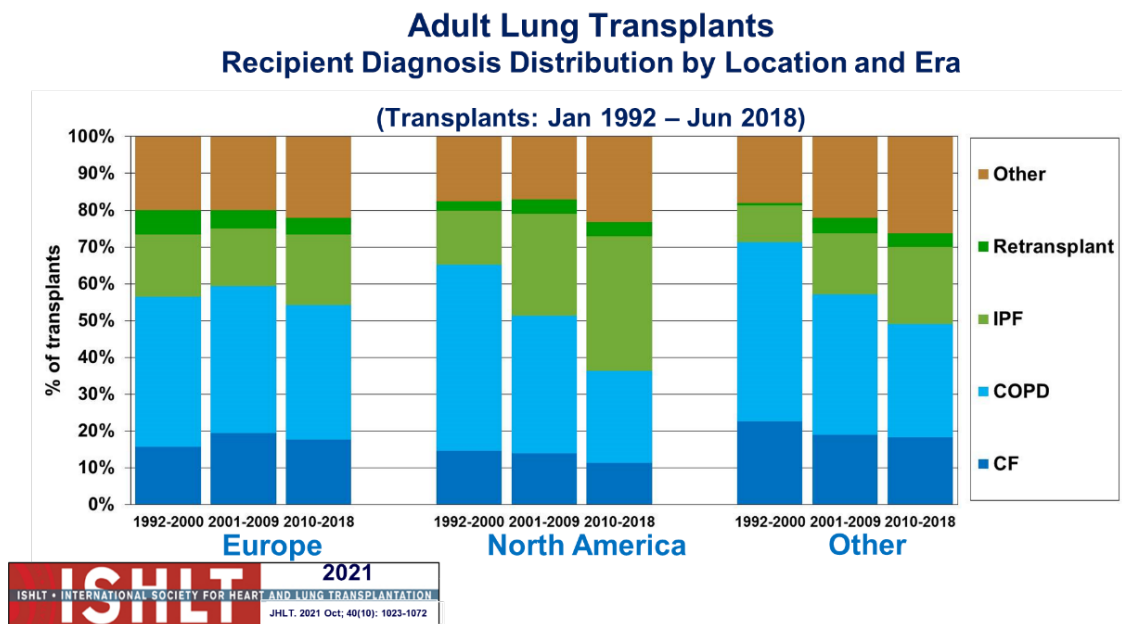
# Introduction

# 1 LA TRANSPLANTATION PULMONAIRE

## 1.1 Généralités

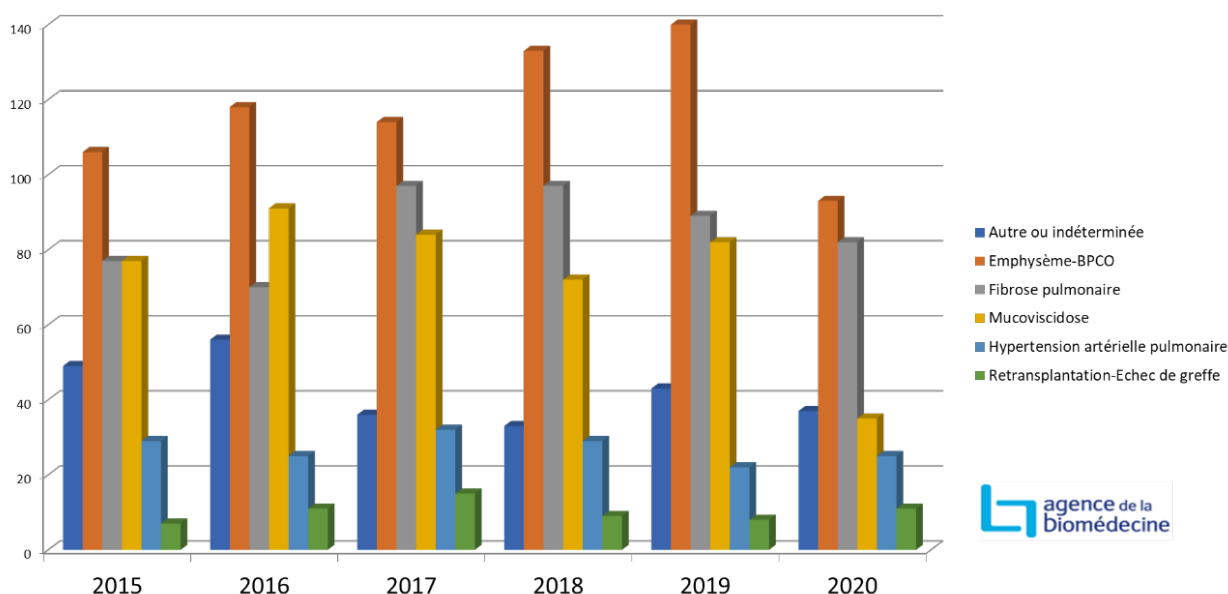
La transplantation pulmonaire (TP) est une option thérapeutique majeure pour le traitement de patients présentant une insuffisance respiratoire chronique terminale, avec plus de 4500 procédures réalisées dans le monde en 2019, dont presque 400 en France.(1,2) Cette technique chirurgicale a permis d'améliorer de manière significative le pronostic de certaines maladies telles que la mucoviscidose, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la fibrose pulmonaire idiopathique, et l'hypertension pulmonaire.(3) Les principales indications de transplantation pulmonaire dans le monde et en France étaient la BPCO (29%), la mucoviscidose (27%) et la fibrose pulmonaire (26%).(2)

Au cours des 5 dernières années, le nombre de TP à travers le monde pour pneumopathies interstitielles a augmenté, avec une légère diminution du nombre de procédures pour les patients BPCO, et une baisse majeure pour les patients atteints de mucoviscidose (Figures 1 et 2).



**Figure 1 :** Evolution des indications à une transplantation pulmonaire dans le temps et sur les différents continents (Chambers, JHLT, 2021)(4)

## Evolution du nombre des malades greffés d'un poumon en France selon l'indication



**Figure 2** : Rapport d'activité de TP en France - agence de biomédecine 2022

La **figure 2** montre une baisse du nombre de TP réalisées au cours de l'année 2020 pour l'ensemble des indications, secondaire à la pandémie à COVID-19. La baisse du nombre de TP pour mucoviscidose observée au cours des dernières années est aussi en grande partie expliquée par l'émergence de nouvelles thérapeutiques modulatrices de la protéine CFTR. Ces traitements, proposés aux patients avec une mutation delta F508 homo- ou hétérozygote, ont permis à ces patients de fortement améliorer leur pronostic et leur qualité de vie, tout en réduisant le nombre d'inscriptions sur liste d'attente de TP.(5)

La réussite d'une TP repose entre autres sur une bonne connaissance des pathologies qui en font porter l'indication, sur une maîtrise des enjeux médico-chirurgicaux et sur la compréhension et la capacité à gérer les complications pouvant survenir au décours d'une TP. Cela implique également la maîtrise de la balance bénéfice-risque au moment de l'indication en fonction du niveau de maîtrise et de la courbe d'apprentissage de l'équipe médico-chirurgicale. Actuellement, les principaux défis auxquels sont confrontées les équipes médico-chirurgicales de TP sont l'augmentation progressive du nombre de patients insuffisants respiratoires à travers le monde, l'extension progressive de la sélection des

donneurs et des candidats grâce aux progrès techniques et médicaux et la pénurie de greffons. Afin de répondre au mieux à ces défis, il est devenu primordial d'améliorer la sélection des candidats, et de mieux identifier les complications potentielles pouvant survenir après la TP.

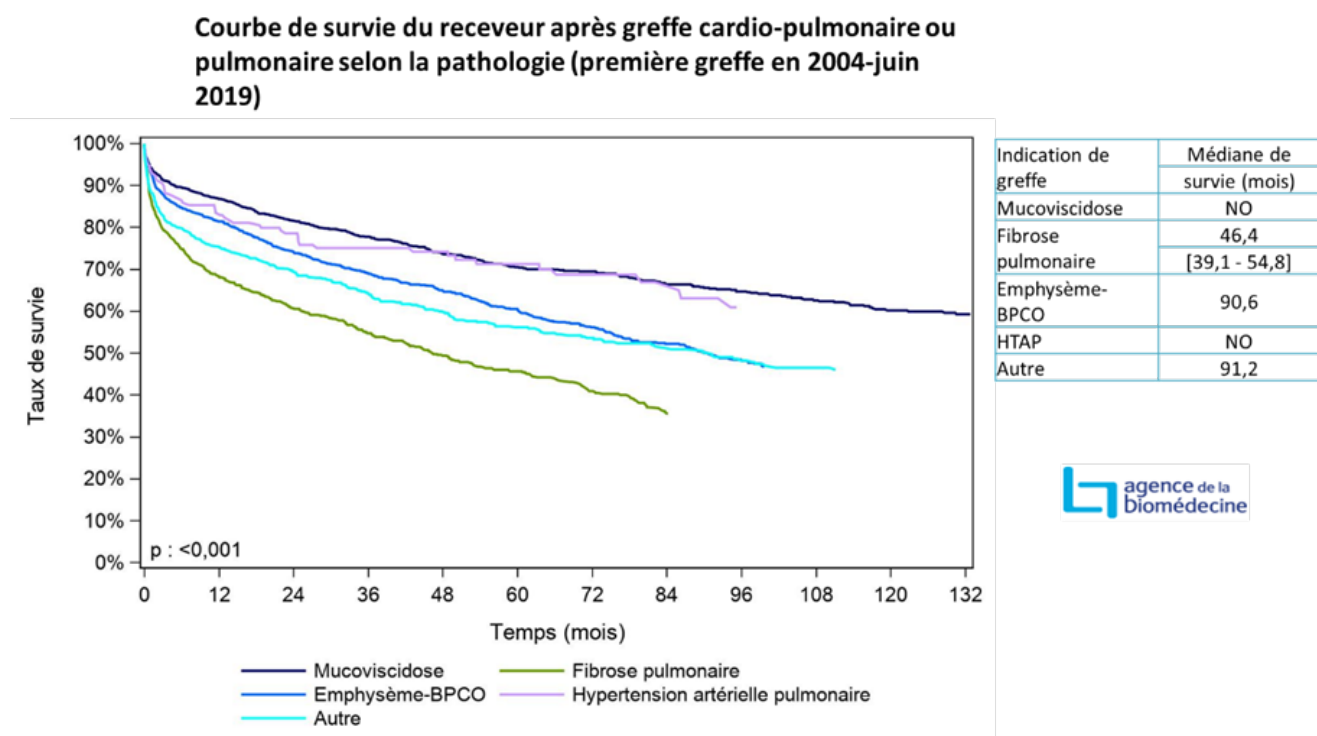
Récemment, un travail collaboratif d'actualisation des indications et contre-indications françaises à la TP a été réalisé par Le Pavec et al. (3) Ce travail avait pour principal objectif d'aider les pneumologues dans la prise en charge des patients souffrant d'insuffisance respiratoire chronique, et notamment dans la prise de décision pour initier un bilan pré-greffe pulmonaire ou de réaliser une inscription sur liste d'attente de greffe pulmonaire, les critères étant différents selon la nature de la maladie respiratoire du patient. La sélection des candidats potentiels à la greffe se fait grâce à la réalisation d'un bilan pré-greffe au cours duquel des examens complémentaires et des consultations spécialisées sont réalisés pour rechercher une éventuelle contre-indication à l'inscription sur liste d'attente. Les dernières recommandations de l'*International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)* (6) ont permis de faire évoluer certaines contre-indications à la TP, considérées jusqu'alors comme absolues. Nous pouvons prendre comme exemple l'âge de plus de 65 ans, une dénutrition (un indice de masse corporelle  $< 20 \text{ kg/m}^2$  ayant un impact négatif sur le pronostic post-TP (7)), l'obésité, l'instabilité psycho-sociale (8), la dysfonction chronique d'un autre organe vital (cœur ou rein en particulier), la survenue d'infections par des microorganismes multirésistants, les infections virales chroniques (virus de l'hépatite B et C et l'infection par le VIH), certains cancers ou encore certaines contre-indication d'ordre chirurgical.(9,10) Malgré l'amélioration et l'uniformisation des connaissances sur la TP à travers le monde, le pronostic des patients après une TP reste limité comparé à celui de patients ayant bénéficié d'une transplantation de rein, de foie ou de cœur, pour lesquels les survies à 5 ans sont respectivement de 77.2%, 75.4% et 67.8%. La survie à 5 ans après TP varie selon la méthode utilisée : elle atteint 63.4% en cas de greffe bipulmonaire, et seulement 49.1% après une greffe monopulmonaire.(2)

En France, le nombre de nouveaux candidats inscrits sur liste d'attente a diminué de 30,5% en 2020 comparé à 2019. En revanche, le nombre de candidats sur liste d'attente de greffe



pulmonaire au 1er janvier 2021 était identique à l'année précédente. Après 1 an d'attente, un malade inscrit sur la liste entre 2015 et 2020 avait 85% de chance d'être greffé et 6% de risque de décéder pendant le temps d'attente.(2) Au niveau mondial, après 1 ans d'attente, les patients sur liste d'attente entre 2015 et 2018 avaient 87% de chance d'être greffé et 5% de risque de décéder.(11)

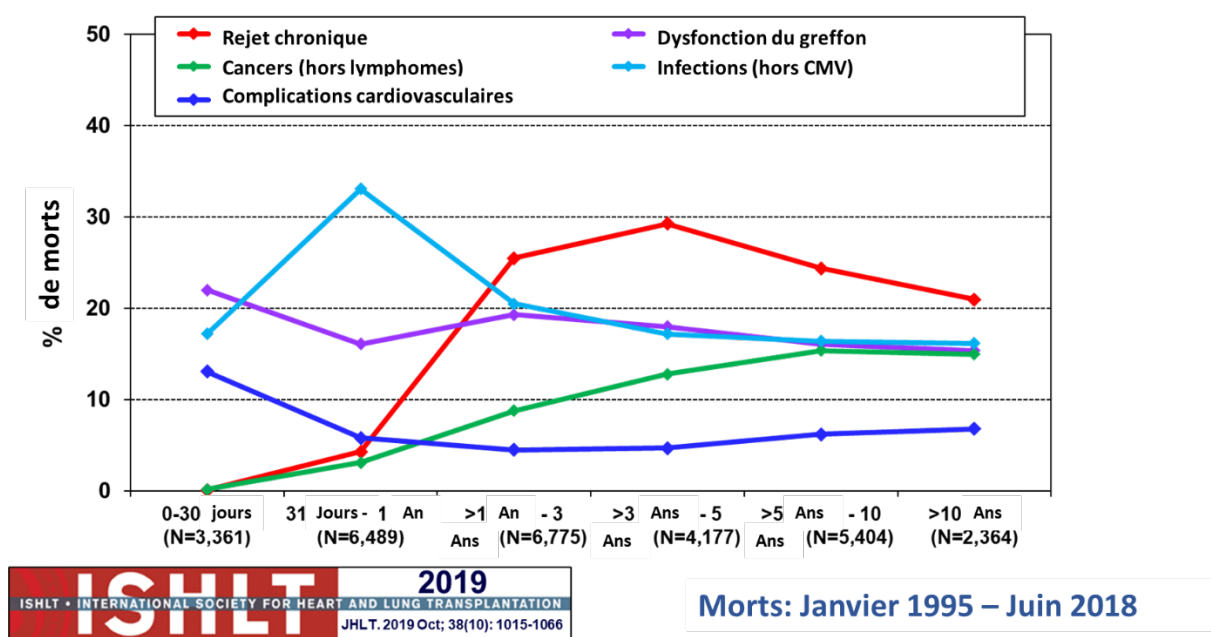
En France, la survie un an après transplantation pulmonaire est de 80%, hors super-urgence (**figure 3**). Cependant, le pronostic à long terme reste limité avec une médiane de survie de 6 ans environ, variant selon les indications de TP. Les meilleurs résultats sont ceux obtenus chez les patients atteints de mucoviscidose, avec une médiane de survie supérieure à 132 mois, cela pouvant entre autres s'expliquer par l'âge plus jeune de ces patients au moment de la TP. En revanche, les résultats sont moins bons chez les patients transplantés pour fibrose, avec une médiane de survie de 46 mois.



**Figure 3** : Courbe de survie du receveur après greffe pulmonaire ou cardio-pulmonaire selon la pathologie pulmonaire - rapport de l'agence de biomédecine 2022

## 1.2 Principales complications survenant après une transplantation pulmonaire

Après une transplantation pulmonaire, différents types de complications peuvent survenir et impacter le pronostic des patients, avec une survie qui reste inférieure comparée à celle des patients transplantés d'autres organes solides.(2,12,13). Nous pouvons distinguer les complications selon leur nature et selon le délai moyen de survenue après la chirurgie (**figure 4**). Le pronostic à long terme post-TP est conditionné par le risque de survenue d'agressions répétées contre le greffon pulmonaire.(14) Parmi ces complications, nous allons surtout présenter la dysfonction primaire du greffon, celles de nature infectieuse, cardiovasculaire, néoplasique, et les différents types de rejets aigus. Nous aborderons ensuite plus en détail dans un autre paragraphe la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.



**Figure 4:** Fréquence des causes de décès survenant après une transplantation pulmonaire (à partir des données de l'International Society for Heart and Lung Transplantation).

### 1.2.1 Dysfonction primaire du greffon

La dysfonction primaire du greffon (DPG) pulmonaire est l'une des principales et une des plus fréquentes complications pouvant survenir après une TP.(15) Cela correspond à un

œdème pulmonaire de réimplantation. Cette complication peut survenir alors que le patient est encore en salle d'opération, avec une sévérité variable, la forme la plus extrême étant l'apparition d'un syndrome de détresse respiratoire aigu. La sévérité de la DPG est évaluée 24h, 48h et 72h après la TP selon l'apparition ou non d'opacités pulmonaires alvéolaires bilatérales, ainsi que par la qualité de l'hématose du patient, définie par le rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> (pression partielle d'oxygène/fraction inspirée d'oxygène) (**tableau 1**).

La fréquence de la DGP est variable selon les études, et elle est responsable d'une morbi-mortalité importante en post-TP.(16,17) L'origine de cet œdème est secondaire à un phénomène d'ischémie reperfusion médié par des radicaux libres et des cytokines pro-inflammatoires, induisant une infiltration par des polynucléaires neutrophiles.(18)

L'inflammation joue en effet un rôle central dans la survenue des complications post-TP, notamment lors de la survenue de la DPG, même si les mécanismes restent encore mal compris. Un travail récent a confirmé le rôle des polynucléaires neutrophiles, via les neutrophils extracellular traps (NETs), associant des fragments d'ADN extracellulaire à des protéines, notamment des histones, dont la quantité peut être mesurée grâce au niveau de nucléosomes circulants.(19) Dans cette série de cas, les auteurs ont utilisé un traitement inhibiteurs de cytokines chez des patients au moment de leur TP, et ont observé des taux réduits de nucléosomes circulants, l'absence de survenue de DPG et de signes histopathologiques de rejet aigu à 1 et 3 mois post-TP, comparé à des patients transplantés n'ayant pas été traités. Il existe un véritable intérêt à contrôler l'inflammation au moment de la TP, éventuellement à l'aide de traitements inhibiteurs de cytokines, afin de limiter les phénomènes de coagulation et la réponse immunitaire du receveur.(20)

Des études ont montré que la survenue d'une DPG grade 3 à 72h était associée à un risque relatif de mortalité à un mois de 6.95 comparé aux patients sans DPG, ce risque de mortalité accru persistant à long-terme.(21,22)

**Table 4** The 2016 International Society for Heart and Lung Transplantation Primary Graft Dysfunction Definition

| Grade       | Pulmonary edema on chest X-ray | PaO <sub>2</sub> /F <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ratio |
|-------------|--------------------------------|--|
| PGD grade 0 | No                             | Any  |
| PGD grade 1 | Yes                            | > 300  |
| PGD grade 2 | Yes                            | 200 to 300   |
| PGD grade 3 | Yes                            | < 200  |

**Tableau 1** : Grades de sévérité de la dysfonction primaire du greffon pulmonaire (Snell et al, JHLT, 2017)

### 1.2.2 Complications infectieuses

Les infections sont la principale cause de morbi-mortalité au cours de la première année post-TP et elles restent ensuite la deuxième cause de mortalité post-TP.(13) Les patients ayant bénéficié d'une TP sont particulièrement sensibles au risque infectieux au cours de leur vie. Lors du premier mois post-TP, le risque de mortalité est particulièrement élevé, les infections pouvant être transmises par l'organe transplanté et le niveau d'immunosuppression étant plus important en post-greffe immédiat. La nature du risque infectieux varie selon le temps écoulé post-TP et selon le type d'expositions du patient **(figure 5)**.

## INFECTIOUS COMPLICATIONS AFTER LTX

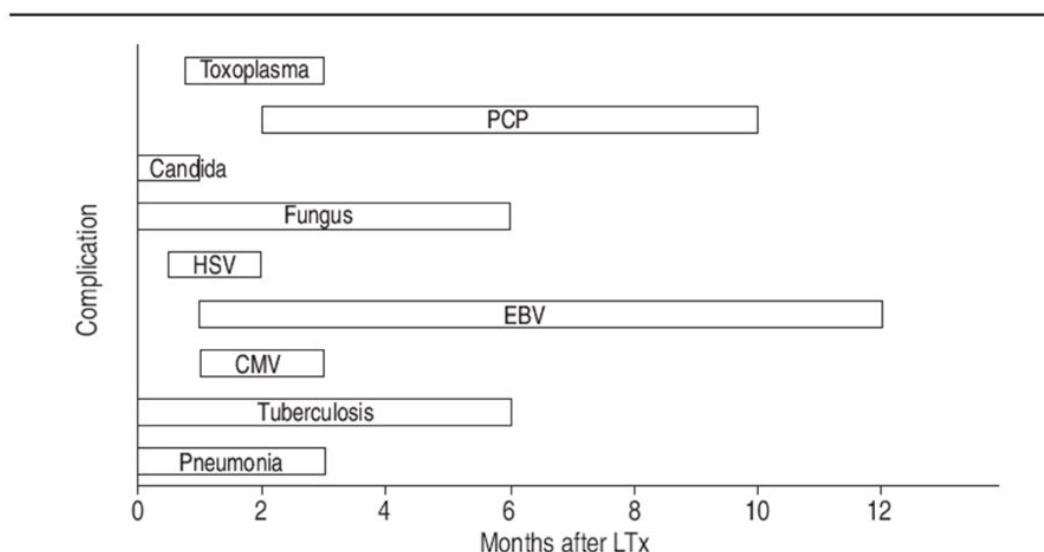


Fig. 1. – Time-table of infectious complications after (heart-)lung transplantation (LTx). PCP: *Pneumocystis carinii* pneumonia; HSV: herpes simplex virus; EBV: Epstein-Barr virus; CMV: cytomegalovirus.

**Figure 5 :** Complications infectieuses pouvant survenir après une transplantation pulmonaire (Van der Bij W, Eur Respir Mon, 2003).(23)

Au cours du premier mois post-TP, le risque infectieux est principalement lié à la réactivation d'infections déjà présentes chez le receveur avant la greffe. Le risque d'infections bactériennes ou fongiques est similaire à celui de patients subissant une chirurgie lourde. Après le premier mois, les principales infections observées sont celles à herpes virus, dont le cytomegalovirus (CMV), les infections fongiques (en particulier à *Aspergillus spp*) ainsi que la pneumocystose. Concernant les infections bactériennes, les patients TP sont particulièrement à risque d'infections à germes gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*. Le risque pourra être majoré en cas de de colonisation à certains pathogènes avant la TP. Enfin, les patients sont également à risque d'infection tuberculeuse ou à mycobactéries non tuberculeuses. (13,24)

La prise en charge des infections chez les patients TP constitue une urgence dans la plupart des cas, nécessitant le plus souvent la prescription d'un traitement anti-infectieux spécifique après réalisation de prélèvements ciblés à visée microbiologique.

### 1.2.3 Complications cardiovasculaires

Au cours du premier mois après une TP, les complications cardiovasculaires sont fréquentes et peuvent être responsables de 11% des décès survenant pendant cette période, et d'environ 6% des décès à 5 ans.(13) Parmi ces complications, l'hypertension artérielle est au premier plan, et peut être secondaire à l'utilisation des anti-calcineurines comme traitement immunosuppresseur de maintenance, responsables d'une vasoconstriction des artéioles afférentes et efférentes du glomérule rénal. Dans les trois années suivant une TP, 90% des patients vont développer au moins un facteur de risque cardiovasculaire, et 40% deux ou plus.(25) Les patients TP sont particulièrement à risque de micro- ou macroangiopathies, comme le diabète, dont le rôle comme cause ou conséquence n'est pas clairement établi.

### 1.2.4 Complications néoplasiques

Les transplantés d'organe solide ont un risque néoplasique supérieur à celui de la population générale. Cela peut s'expliquer par la prise d'immunosuppresseurs au long cours, ainsi qu'au risque de primo-infection et/ou de réactivation de différents virus oncogéniques. Certains cancers sont particulièrement augmentés chez les patients TP, notamment le syndrome lymphoprolifératif (dans le contexte d'une primo-infection ou d'une réactivation du virus Epstein-Barr (EBV) – risque estimé à 33% chez les patients séronégatifs pour l'EBV en pré-greffe, contre seulement 2% chez les receveurs EBV positifs), certains cancers cutanés (épithélioma ou mélanomes), le sarcome de Kaposi et certains types de cancers bronchiques, ORL et digestifs.(13,26,27) Le risque de syndrome lymphoprolifératif est particulièrement augmenté au cours de la première année en raison de l'immunosuppression importante en post-greffe immédiat, et augmente à nouveau à distance de la chirurgie. Le risque néoplasique constitue l'une des principales limites de la survie à moyen et long-terme post-TP, après la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.

### 1.2.5 Rejet aigu

Le principal obstacle à la transplantation d'organes est le rejet, causé par les cellules immunitaires du receveur qui reconnaissent et endommagent les tissus du donneur. Le rejet peut être défini en fonction du délai de survenue après la transplantation. Le rejet dit hyperaigu survient immédiatement lors de l'implantation de l'organe, causé par la présence d'anticorps spécifiques du donneur, préexistants avant la greffe. Il peut être à l'origine d'une perte rapide du greffon.

Le rejet aigu peut quant à lui survenir de quelques jours à quelques années après la TP et est médié par des cellules immunitaires adaptatives après reconnaissance des antigènes du donneur, principalement ceux du système HLA (Human Leukocyte Antigen). Il peut être médié par les lymphocytes T : il est alors appelé rejet aigu cellulaire. Il peut également être provoqué par des anticorps dirigés contre le greffon: il est alors nommé rejet aigu humoral.

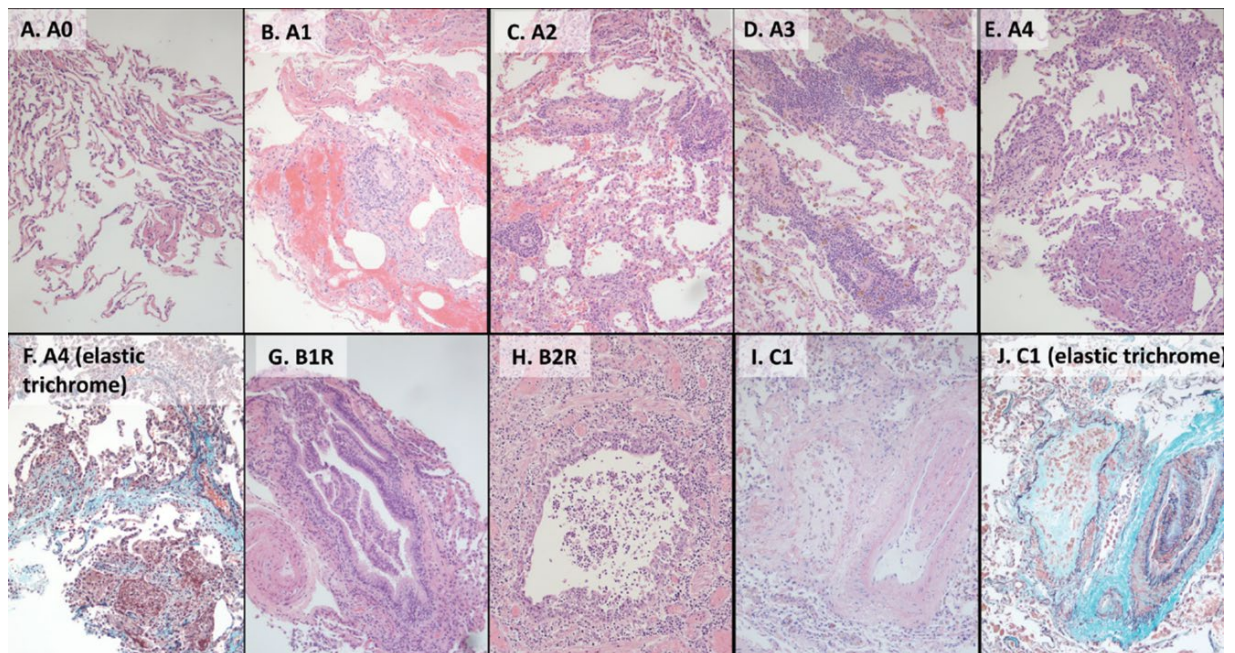
Le risque de survenue d'un rejet aigu reste important tout au long de la première année. La survenue d'un rejet aigu peut entraîner une baisse de la fonction respiratoire du greffon et l'apparition de signes cliniques, notamment d'une dyspnée. Selon les données de 2015 à 2018 émises par l'ISHLT, 26.6% des patients transplantés pulmonaires reçoivent un traitement contre le rejet aigu cellulaire au cours de la première année post-greffe.(28,29)

Les lésions récurrentes subies par le greffon à la suite d'un rejet aigu ou d'autres stimuli externes majorent le risque de développer un rejet chronique à long terme, caractérisé classiquement par une fibrose irréversible, et appelé dysfonction chronique du greffon pulmonaire (chronic lung allograft dysfunction = CLAD) dans le cas d'une TP.(30) Dans ce paragraphe, nous allons aborder plus en détail le rejet aigu cellulaire et le rejet aigu humoral.

- Rejet aigu cellulaire

Nous allons présenter ici des éléments décrits dans une revue de la littérature réalisée pendant la période d'étude de ce travail de thèse (*Renaud-Picard B, Koutsokera A, Cabanero M, Martinu T. Acute Rejection in the Modern Lung Transplant Era. Semin Respir Crit Care Med. 2021 Jun;42(3):411–27*).(30)

Le rejet aigu cellulaire est défini par la présence d'un infiltrat périvasculaire et/ou péri-bronchiolaire de cellules inflammatoires mononuclées. En pratique, ces signes histologiques sont observés sur les biopsies transbronchiques du tissu bronchoalvéolaire périphérique, réalisées lors d'une fibroscopie bronchique sous contrôle scopique. Un grade de sévérité est déterminé selon l'importance de l'infiltration de cellules inflammatoires mononuclées autour des vaisseaux (A0 à A4) et/ou des petites voies aériennes (B0 à B2R) (**Figure 6**). Le diagnostic et l'évaluation du degré de sévérité restent cependant difficiles, avec une variabilité importante entre la qualité d'une biopsie à l'autre, et l'interprétation histologique réalisée.(31)



**Figure 6** : Histologie du rejet aigu cellulaire, de l'inflammation des voies respiratoires et de la bronchiolite oblitérante (Renaud-Picard, Semin Respir Crit Care Med, 2021).

Récemment, une nouvelle méthode de description des anomalies histologiques du rejet aigu a été proposée afin de mieux standardiser les pratiques entre les centres (lung allograft standardized histological analysis – LASHA).(32) Cela a consisté en la mise au point d'un modèle standardisé de formulaire à remplir avec des questions à choix multiples sur différents points à détailler lors de l'analyse de biopsies pulmonaires, notamment concernant



les anomalies évocatrices de rejet aigu cellulaire ou humoral, affectant entre autre les voies aériennes, le tissu alvéolaire ou les vaisseaux. Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration entre différents experts internationaux dans le domaine de la TP, incluant des anatomopathologistes, des pneumologues et des immunologistes. L'objectif de cet outil est de mieux uniformiser le travail d'évaluation histologique entre les centres de TP, et faciliter la réalisation d'études multicentriques.

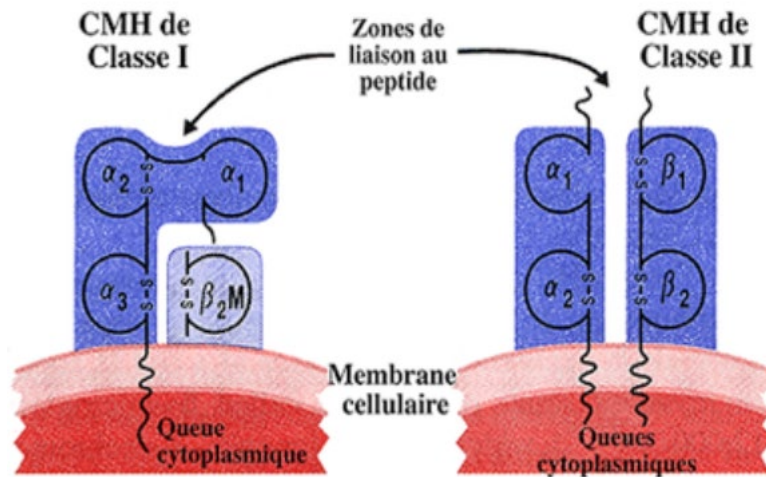
Enfin, la difficulté provient également du manque de spécificité des signes cliniques et radiologiques qui peuvent parfois être absents.

Une étude observationnelle multicentrique récente a montré que des signes de rejet aigu était observés chez 53,5% des receveurs sur des biopsies collectées lors de la première année post-TP. Le risque est particulièrement élevé dans les 3 à 6 premiers mois suivant la greffe et diminue par la suite.(28–30)

Le rejet d'organe est principalement médié par les lymphocytes T qui reconnaissent l'antigène du donneur comme du non-soi. Les différences génétiques entre donneur et receveur conduisent à l'expression de molécules distinctes à la surface de leurs cellules. Ces molécules allogéniques, appelées alloantigènes, sont reconnues par les lymphocytes T alloréactifs. Ces cellules peuvent être effectrices ou régulatrices, et l'équilibre de ces réponses opposées détermine en grande partie les résultats de la greffe.(30,33,34) Les principaux alloantigènes sont les protéines codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), appelé « Human Leukocyte Antigen » (HLA) chez l'Homme.

Les gènes HLA, situés sur le chromosome 6, sont parmi les gènes les plus polymorphes du génome humain. Ils sont classés en HLA classe I (avec loci A, B et Cw) et HLA classe II (avec loci DR, DQ et DP).(35) Les CMH de classe 1 (HLA-A, HLA-B, HLA-C) permettent la présentation du peptide antigénique aux lymphocytes T CD8 et sont exprimés par quasiment toutes les cellules nucléées. Les CMH de classe 2 (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) permettent la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4 et sont exprimés par les lymphocytes B

et T activés, les cellules dendritiques, les cellules présentatrices d'antigène et les cellules endothéliales et épithéliales en cas de réaction inflammatoire (**figure 7**).



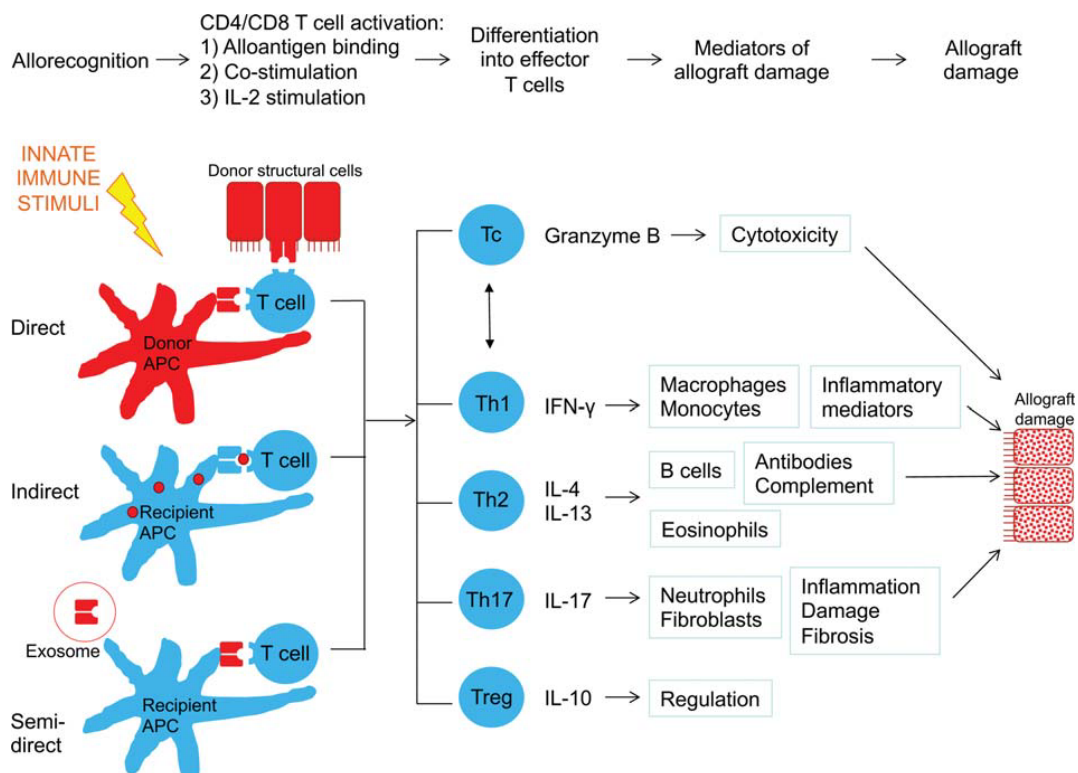
**Figure 7** : Représentations des complexes majeurs d'histocompatibilité 1 et 2.(36)

La reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T peut se faire de différentes manières : directe, indirecte et semi-directe (**figure 8**).

Au cours du mécanisme de reconnaissance directe, les cellules présentatrices d'antigènes du donneur (présentes dans le greffon) vont présenter des molécules HLA intactes du donneur aux lymphocytes T CD4 et CD8 du receveur. Ce phénomène peut survenir très rapidement après la TP et entraîner des mécanismes de rejet très importants.

Au cours de l'allo-reconnaissance indirecte, les cellules présentatrices d'antigènes du receveur vont présenter des peptides donneurs via des molécules HLA de classe II aux lymphocytes T auxiliaires CD4 du receveur. Ce mécanisme intervient en général plus tard après la greffe.(37–39)

Plus récemment, une voie d'allo-reconnaissance semi-directe a été décrite, par laquelle une molécule HLA intacte peut être transférée d'une cellule donneuse à une cellule présentatrice d'antigène receveuse via des exosomes, vésicules extracellulaires participant à la communication intercellulaire.



**Figure 8** : Mécanismes du rejet aigu cellulaire (Renaud-Picard, Semin Respir Crit Care Med, 2021).

Les molécules HLA du donneur exprimées sur les cellules présentatrices d'antigènes du receveur peuvent activer à la fois les lymphocytes T CD4 et CD8. L'activation des lymphocytes T nécessite trois signaux principaux. Le signal 1 consiste en la liaison de la molécule HLA à un récepteur spécifique des lymphocytes T. Le signal 2 implique une costimulation fournie par la cellule présentatrice d'antigènes à la cellule T. Enfin, le signal 3 entraîne une stimulation supplémentaire par les cytokines conduisant à la différenciation et à la prolifération des cellules T. Les différents mécanismes de différenciation sont décrits dans la **figure 8**.(40–46)

Les réponses des lymphocytes T décrites ci-dessus sont les principaux mécanismes impliqués dans la survenue du rejet aigu cellulaire. Cependant, cela se produit dans le contexte inflammatoire complexe du greffon pulmonaire, en interaction constante avec d'autres cellules effectrices ou régulatrices. Un processus parallèle important comprend l'activation des cellules B qui se différencient en plasmocytes, produisant des anticorps spécifiques au donneur qui conduisent au rejet aigu humoral.

- Rejet aigu humoral

Après une TP, la présence d'anticorps anti-HLA spécifiquement dirigés contre le greffon [Donor-specific anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies (DSA)] est maintenant connue pour être un facteur de risque important de rejet aigu, appelé rejet aigu humoral (antibody mediated rejection). Des études ont montré que les DSA étaient impliqués dans le risque de rejet aigu dans les greffes de rein, de cœur et de foie, ainsi que dans le risque de développer une dysfonction chronique du greffon, notamment la bronchiolite oblitérante.(47–51). Il est possible d'observer des anticorps anti-HLA de classe 1 et de classe 2. L'apparition d'anticorps anti-HLA peut-être induite par de nombreux phénomènes d'allo-immunisation, notamment en pré-greffe, dans des situations telles que les grossesses, les transfusions de produits sanguins, en cas de transplantation antérieure d'organe solide, ou lors de réactions croisées avec des antigènes environnementaux. Mais quelquefois, la cause exacte ne peut pas être identifiée.

Le rejet aigu humoral est un processus complexe au niveau clinique, sérologique et histologique. Durant ce mécanisme d'activation immunitaire, des cellules B allospécifiques et des cellules plasmiques vont produire des anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes du poumon du donneur. La création de ce complexe anticorps-antigène va entraîner une réponse immunitaire importante, utilisant une voie dépendante du complément (responsable de dépôts de C4d dans le tissu alvéolaire), et une autre indépendante. Cela sera à l'origine du recrutement de cellules inflammatoires, dont des cellules cytotoxiques anticorps-dépendantes, responsables de lésions endothéliales, et d'une exposition de la membrane basale et du muscle lisse, pouvant ensuite être à l'origine de dommages ischémiques du greffon, suivis d'une perte progressive de fonction respiratoire, pouvant mener jusqu'à la perte du greffon.(52,53)

Actuellement, le diagnostic d'un rejet aigu humoral clinique se base sur plusieurs facteurs : la survenue d'une dysfonction aiguë du greffon pulmonaire, l'exclusion de toute autre cause pouvant l'expliquer, la présence de signes histologiques pouvant faire évoquer le diagnostic, la mise en évidence d'un marquage du complément C4d sur les biopsies transbronchiques, et la présence de DSA dans les prélèvements sanguins (**tableau 2**). (53) Cependant, le

diagnostic reste difficile. Il est en effet parfois compliqué d'exclure toute autre cause pour expliquer la baisse de fonction du greffon pulmonaire. Par ailleurs, des anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon DSA ne sont retrouvés que chez 60% des receveurs présentant un rejet aigu humoral (action d'autres anticorps dirigés contre des Ag non HLA...).

**Table 1** Definition and Diagnostic Certainty of Clinical Pulmonary Antibody-mediated Rejection

|                       | Allograft dysfunction | Other causes excluded | Lung histology | Lung biopsy C4d | DSA |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|-----------------|-----|
| Definite              | +                     | +                     | +              | +               | +   |
| Probable <sup>a</sup> | +                     | +                     | +              | -               | +   |
| Probable              | +                     | +                     | +              | +               | -   |
| Probable              | +                     | +                     | -              | +               | +   |
| Probable              | +                     | -                     | +              | +               | +   |
| Possible              | +                     | +                     | +              | -               | -   |
| Possible              | +                     | +                     | -              | -               | +   |
| Possible              | +                     | +                     | -              | +               | -   |
| Possible              | +                     | -                     | +              | +               | -   |
| Possible              | +                     | -                     | +              | -               | +   |
| Possible              | +                     | -                     | -              | +               | +   |

DSA, donor-specific antibodies; +, item present; -, item absent or missing.

<sup>a</sup>There is building evidence that antibody-mediated rejection can be diagnosed confidently in the absence of positive C4d staining, hence this group is recognized separately.

**Tableau 2** : Définition du diagnostic de rejet aigu humoral clinique (Levine, JHLT, 2016).

Dans ce paragraphe, nous avons donc détaillé les principales complications pouvant altérer la survie du greffon pulmonaire. Nous pouvons également mentionner les anomalies métaboliques (dyslipidémie, diabète, ostéoporose), gastro-intestinales, neurologiques, hématologiques, et celles secondaires aux traitements administrés après la TP, en particulier les anti-rejets.

Cependant, la principale limite à la survie à moyen et long-terme chez les patients TP reste actuellement la dysfonction chronique du greffon pulmonaire (chronic lung allograft dysfunction - CLAD). Nous allons aborder cette complication en détail dans le prochain paragraphe.

## 2. LA DYSFONCTION CHRONIQUE DU GREFFON PULMONAIRE

### 2.1 Définitions et généralités

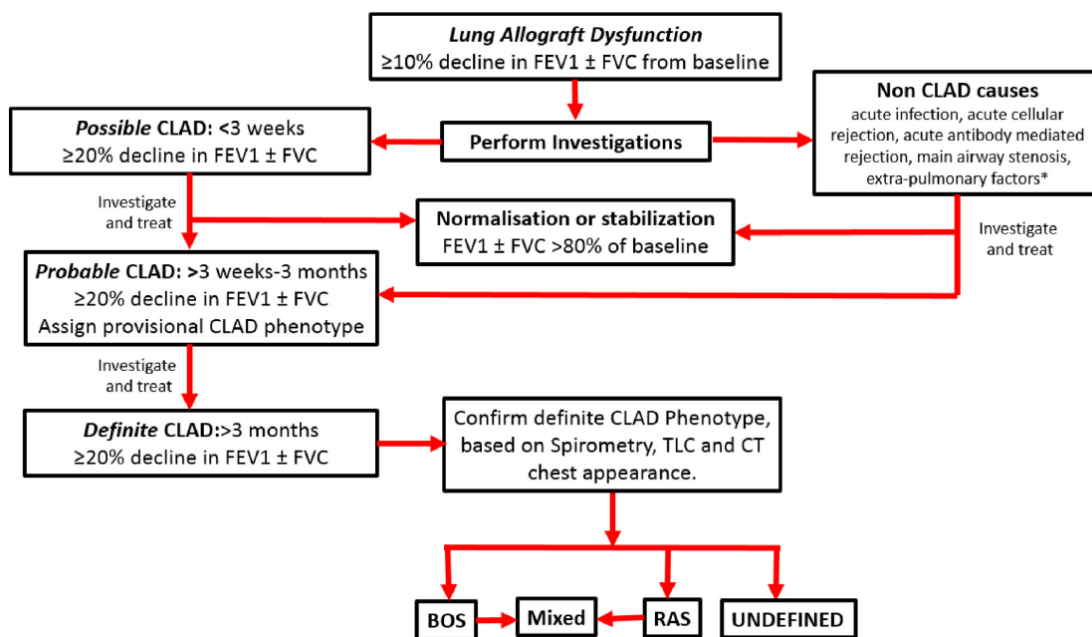
En 1993, Cooper et al (54) ont introduit la première définition du syndrome de bronchiolite oblitérante (bronchiolitis obliterans syndrome – BOS) chez les patients transplantés pulmonaires.(55) La BOS a été considérée comme une forme de rejet chronique du greffon pulmonaire, dont les mécanismes responsables sont multiples : dysfonction primaire du greffon, rejet aigu cellulaire et humoral, infections, reflux gastro-œsophagien, pollution atmosphérique. Ces facteurs peuvent déclencher des réponses immunitaires au sein du greffon pulmonaire avec des effets durables pouvant conduire au rejet chronique des mois ou des années plus tard.

Le diagnostic de BOS est alors défini par une dégradation des valeurs des épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) avec un déclin persistant du volume expiré maximum en une seconde (VEMS)  $\geq 20\%$  comparé au VEMS de référence défini par la moyenne des deux meilleurs valeurs obtenues après la TP, à au moins 3 semaines d'intervalle, après exclusion de toute autre cause pulmonaire ou extra-pulmonaire.(55) La perte progressive de la fonction pulmonaire ou dysfonction chronique du greffon pulmonaire est l'obstacle majeur à la survie du greffon pulmonaire à moyen et à long terme. Son incidence est estimée à environ 50% à 5 ans et 75% à 10 ans après transplantation pulmonaire. Dans certains cas, la perte progressive de la fonction du greffon pulmonaire peut nécessiter une nouvelle transplantation, voire entraîner le décès (50% des causes de décès après 3 ans de greffe) **(figure 4)**.(56) La poursuite des connaissances sur la BOS et le rejet chronique après TP ont permis d'identifier en 2011 un autre phénotype de rejet chronique, appelé Restrictive allograft syndrome (RAS), responsable d'une atteinte fonctionnelle restrictive associée à des modifications pleurales et du parenchyme pulmonaire à type de fibrose.(57,58)

Le terme de dysfonction chronique du greffon pulmonaire (chronic lung allograft dysfunction – CLAD) a alors été proposé afin de regrouper l'ensemble des phénotypes responsables de modifications histologiques du greffon pulmonaire, à l'origine d'une perte fonctionnelle

irréversible avec une durée minimum de 3 mois.(59–61) Il a cependant persisté une importante hétérogénéité entre les auteurs et les centres concernant les définitions utilisées pour désigner la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.

L'ISHLT a rédigé en 2019 une actualisation des définitions et un algorithme pour aider au diagnostic de CLAD, proposant les termes de diagnostic possible, probable ou certain selon l'ancienneté de la baisse de fonction respiratoire (**figure 9**).



**Figure 9** : Algorithme pour les investigations et le diagnostic de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire (Verleden, JHLT, 2019).

Une fois le diagnostic de CLAD confirmé, une classification est proposée en fonction de la sévérité de la baisse du VEMS (**figure 10**).

| Stage  | Spirometry   |
|--------|--|
| CLAD 0 | Current FEV <sub>1</sub> >80% FEV <sub>1</sub> baseline    |
| CLAD 1 | Current FEV <sub>1</sub> >65–80% FEV <sub>1</sub> baseline |
| CLAD 2 | Current FEV <sub>1</sub> >50–65% FEV <sub>1</sub> baseline |
| CLAD 3 | Current FEV <sub>1</sub> >35–50% FEV <sub>1</sub> baseline |
| CLAD 4 | Current FEV <sub>1</sub> ≤35% FEV <sub>1</sub> baseline    |

CLAD, chronic lung allograft dysfunction; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 second. Once CLAD is diagnosed, staging is performed according to the decline in FEV<sub>1</sub>, compared with baseline. The date of onset of CLAD is defined as the date at which the first value of FEV<sub>1</sub> ≤80% of baseline was recorded when subsequent values taken at least 3 weeks (and for definite CLAD up to 3 months) apart also fell below the threshold. The same principle holds for each stage.

**Figure 10** : Stades de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire. (Verleden, JHLT, 2019).

Au cours des deux dernières décennies, deux principaux phénotypes de CLAD ont donc été décrits, défini selon le type d'atteinte aux épreuves fonctionnelles respiratoires ainsi que la présence ou non d'anomalie spécifique sur le scanner thoracique (**Tableau 3**). (58,61,62)

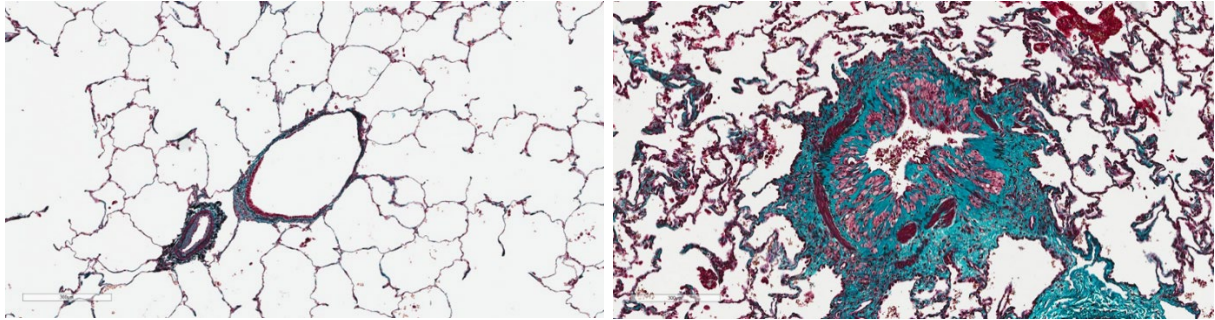
|                              | Obstruction <sup>^</sup><br>(FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.7) | Restriction <sup>+</sup><br>(TLC decline ≥ 10%<br>from baseline) | CT opacities <sup>*</sup> |
|------------------------------|---|--|---------------------------|
| <b>BOS</b>                   | <b>YES</b>  | <b>NO</b>  | <b>NO</b>                 |
| <b>RAS</b>                   | <b>NO</b>   | <b>YES</b>   | <b>YES</b>                |
| <b>Mixed<sup>#</sup></b>     | <b>YES</b>  | <b>YES</b>   | <b>YES</b>                |
| <b>Undefined<sup>°</sup></b> | <b>YES</b>  | <b>NO</b>  | <b>YES</b>                |
|                              | <b>YES</b>  | <b>YES</b>   | <b>NO</b>                 |

**Tableau 3** : Principaux phénotypes de dysfonction chronique du greffon pulmonaire (CLAD). BOS: bronchiolitis obliterans syndrome; RAS: restrictive allograft syndrome; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second (=VEMS); FVC: forced volume capacity; TLC: total lung capacity (Verleden, JHLT, 2019).

Le premier décrit ainsi que le plus fréquent est le syndrome de bronchiolite oblitérante (Bronchiolitis obliterans syndrome – BOS), et va concerner environ 70% des patients atteints par un CLAD. La principale caractéristique histologique de la BOS est la bronchiolite



oblitérante (BO), caractérisée par des lésions oblitératives fibrotiques des petites voies aériennes, et secondaire à un remodelage anormal de l'épithélium bronchique, provoquant au fil du temps un épaissement de la paroi, accompagné également d'un infiltrat lymphocytaire (**figure 11**).<sup>(63,64)</sup>

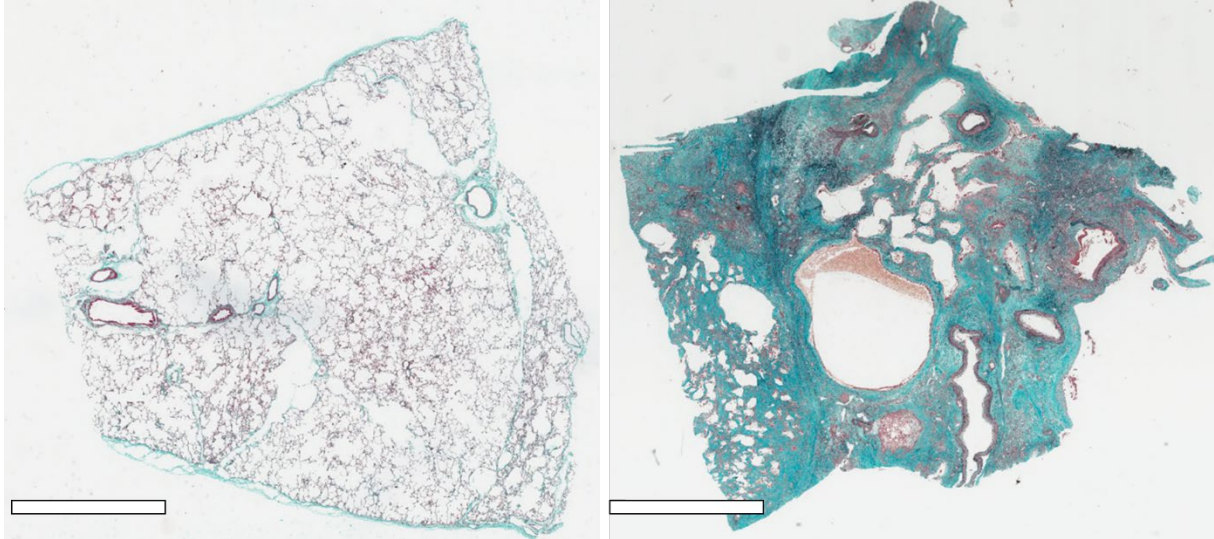


**Figure 11** : Exemple d'une bronchiole normale (image de gauche) et d'une bronchiole avec aspect de bronchiolite oblitérante (barre d'échelle : 300  $\mu$ m). Données personnelles.

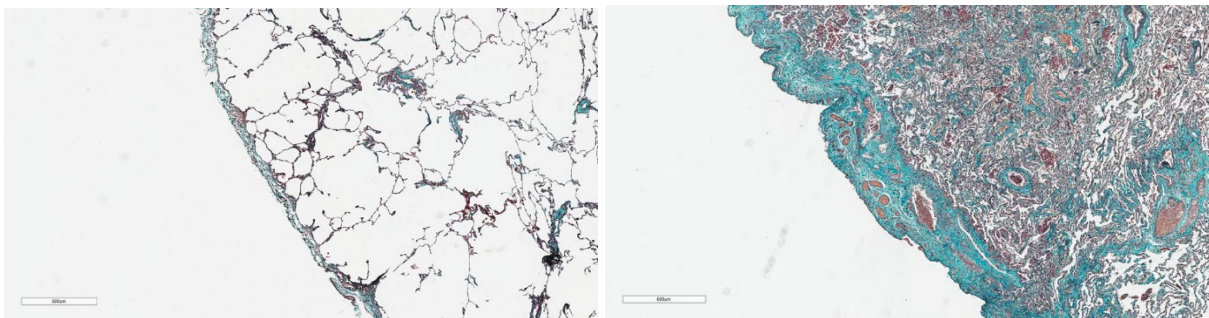
Le phénotype de BOS dans la dysfonction chronique du greffon pulmonaire se définit par la présence d'un trouble ventilatoire obstructif aux épreuves fonctionnelles respiratoires ainsi qu'à l'absence d'opacités pulmonaires persistantes sur le scanner thoracique, avec la présence possible d'un trappage aérien, mieux mis en évidence sur les coupes du scanner en expiration.<sup>(65)</sup>

Le deuxième phénotype le plus courant est appelé Restrictive allograft syndrome (RAS).<sup>(58)</sup> La principale caractéristique histologique du RAS est la fibro-élastose pleuro-parenchymateuse ou intra-alvéolaire (intra-alveolar fibro-elastosis - IAFE), en plus d'autres lésions histologiques telles que du dommage alvéolaire diffus, de la pneumonie organisée, ainsi que la BO.<sup>(59,66)</sup> Le phénotype de RAS est responsable de l'apparition d'une atteinte fibreuse plus diffuse du parenchyme pulmonaire (**figure 12**) et de la plèvre (**figure 13**). Ce phénotype est caractérisé, en plus de la baisse permanente du VEMS d'au moins 20% par rapport aux valeurs de référence, par une baisse permanente de la capacité pulmonaire

totale d'au moins 10% comparé à la moyenne des deux meilleures valeurs, ainsi qu'à la présence d'opacités pulmonaires persistantes sur le scanner thoracique.



**Figure 12 :** Exemple d'une biopsie pulmonaire sans fibrose du parenchyme pulmonaire (image de gauche), et d'une biopsie collectée chez un patient atteint d'un rejet chronique type RAS, avec fibrose parenchymateuse diffuse (barre d'échelle : 4mm). Données personnelles.



**Figure 13 :** Exemple d'une biopsie pulmonaire avec plèvre normale (image de gauche), et d'une biopsie collectée chez un patient atteint d'un rejet chronique type RAS, avec fibrose pleurale (barre d'échelle : 600µm). Données personnelles.

Le diagnostic histologique de CLAD reste difficile et souvent tardif, notamment en raison du manque de spécificité des signes cliniques et radiologiques. Il ne peut être confirmé que par la réalisation d'une biopsie pulmonaire chirurgicale, ce qui est rarement réalisé. Les biopsies pulmonaires transbronchiques effectuées en routine au cours des

fibroscopies bronchiques procurent des informations limitées. L'atteinte des bronchioles distales est un phénomène hétérogène et discontinu, et laisse une proportion importante de bronchioles et de parenchyme pulmonaire intact, ce qui peut expliquer la faible sensibilité des biopsies trans-bronchiques. Les manifestations cliniques du CLAD peuvent être tardives par rapport à l'apparition des premières lésions broncho-pulmonaires et le diagnostic est compliqué par la présence de facteurs confondants (infections, rejet aigu, sténoses bronchiques...).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'il pourrait exister un chevauchement histologique important entre les différents phénotypes de CLAD, un aspect de bronchiolite oblitérante étant décrit dans les deux phénotypes BOS et RAS.(67–70) Une étude du groupe de Toronto a utilisé un modèle animal présentant un large éventail de caractéristiques histologiques du CLAD dans un modèle murin de transplantation unipulmonaire avec rejet chronique. (71) Dans cette étude, un système de notation histologique a été développé pour évaluer le degré de sévérité de certaines caractéristiques histologiques observées dans le greffon pulmonaire humain avec CLAD. L'étude a mis en évidence que les caractéristiques du CLAD n'étaient pas un phénomène du type « tout ou rien » dans ce modèle, mais plutôt un spectre de différentes lésions.

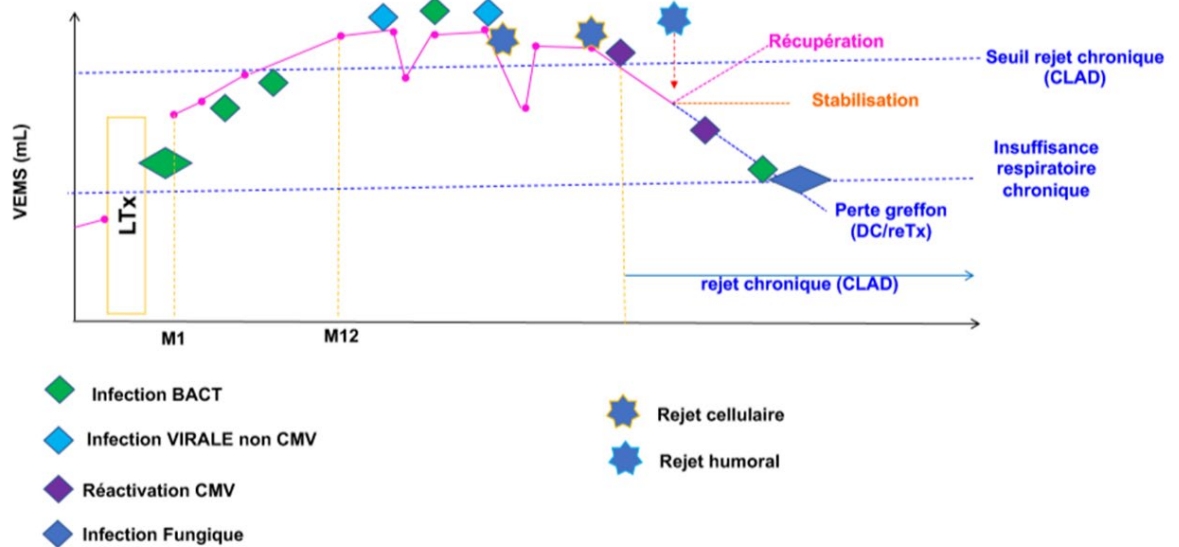
Aujourd'hui, les options thérapeutiques face au CLAD sont limitées : les modifications des traitements anti-rejet ainsi que la corticothérapie systémique à haute dose n'ont pas apporté la preuve de leur efficacité.(72) Le traitement par macrolide, en particulier l'azithromycine, semblent diminuer l'inflammation bronchique et systémique ainsi que la prévalence de certaines formes de CLAD.(73) L'efficacité de ce traitement a d'abord été démontrée pour certaines formes de rejets caractérisés par la présence d'une alvéolite neutrophilique dans le LBA des patients (Neutrophilic reversible allograft dysfunction), avant d'être étendu comme traitement préventif de la BOS.(74,75) D'autres perspectives thérapeutiques sont en cours d'évaluation, telles que la photophérese extracorporelle, le Montelukast, certains traitements anti-fibrosants ou les aérosols de ciclosporine. La retransplantation est l'option ultime pour le traitement des patients atteints d'un CLAD

terminal, mais leur pronostic est inférieur à celui des patients primo-transplantés, ce qui rend la réalisation de cette procédure rare.(55)

## 2.2 Epithélium bronchique et CLAD

L'épithélium bronchique est composé de cellules épithéliales ciliées et non ciliées. Il existe plusieurs types de cellules épithéliales des voies respiratoires. Les plus courantes sont les cellules ciliées, les cellules mucineuses sécrétant du mucus, les cellules basales et les cellules club. Ces dernières sont des cellules épithéliales sécrétoires non ciliées qui peuvent fonctionner comme des cellules progénitrices et produire une protéine sécrétoire anti-inflammatoire (club cell secretory protein - CCSP), contribuant à maintenir l'homéostasie des voies respiratoires.(76–78)

Après une TP, l'épithélium des voies respiratoires est fortement impliqué dans les interactions avec le système immunitaire, ainsi que dans la réparation et le remodelage des tissus.(79,80) L'épithélium bronchique est en contact avec l'environnement extérieur et est exposé à de nombreux facteurs de risque. Les poumons greffés et tout particulièrement l'épithélium bronchique sont soumis à des agressions nombreuses, telles que l'ischémie-reperfusion en per-opératoire, les infections bactériennes ou virales (*Pseudomonas*, *Staphylocoques*, Cytomégalovirus...), les micro-inhalations acides ou basiques secondaires au reflux gastro-œsophagien, la pollution atmosphérique et des épisodes de rejet cellulaire ou humoral.(81) Ces agressions répétées entraînent des lésions de la barrière épithéliale, associées à une diminution de la capacité de régénération épithéliale et à une réduction de la sécrétion de protéines protectrices, ainsi qu'à une production accrue de facteurs pro-inflammatoires et profibrotiques.(81) Cette accumulation de lésions épithéliales pourrait conduire à l'apparition de lésions de fibrose, à l'origine du développement du CLAD (**figure 14**). (81–85) Une réduction du nombre de cellules club et de la production de CCSP ont été décrites en association avec la survenue d'un CLAD.(86)



**Figure 14 :** Représentation schématique de la survenue de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire. Cours DES Pneumologie, Pr Antoine Roux, Hôpital Foch, 2020

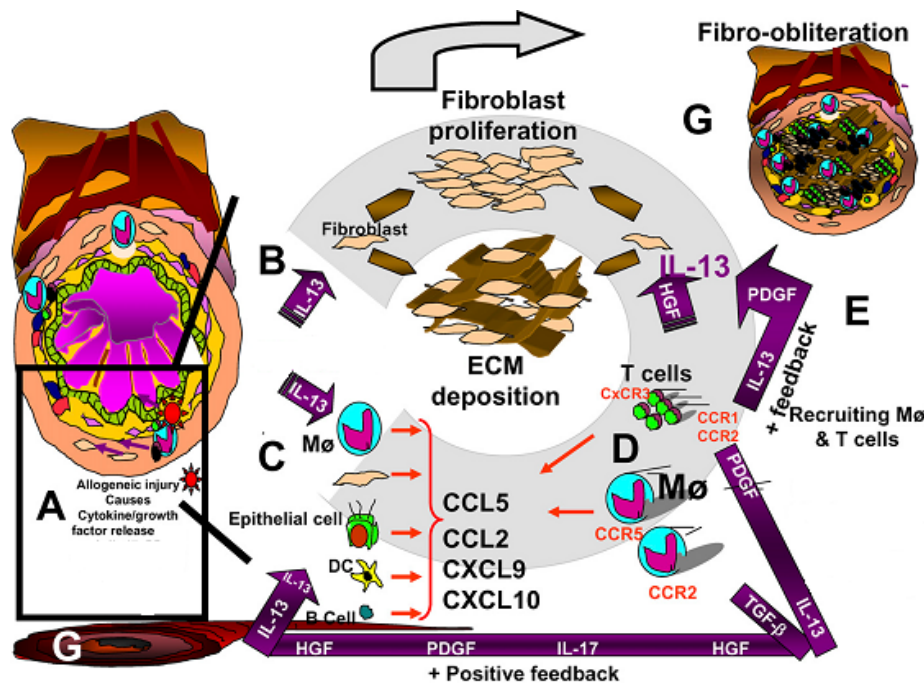
Cependant, le rôle exact des lésions et de la mort des cellules épithéliales dans le remodelage tissulaire et l'apparition de la fibrose lors du CLAD reste mal compris. Les cellules épithéliales des voies aériennes jouent un rôle crucial dans le fonctionnement de l'appareil respiratoire, les interactions avec les cellules immunitaires innées et adaptatives, ainsi que dans la réparation et le remodelage tissulaire.(79,80,87) Ces mécanismes de réparation pourraient apporter une réponse aberrante dans le contexte d'inflammation chronique post-TP, et être en partie à l'origine du phénomène de CLAD.(88,89) L'un des mécanismes envisagés serait une réponse épithéliale entraînant une réparation, une nécrose et une apoptose.(82–84) Une étude récente s'est intéressé aux marqueurs épithéliaux présents dans le LBA de patients greffés pulmonaires atteints par un CLAD, en particulier à des protéines impliquées dans la fonction de barrière de l'épithélium bronchique (MUC1, MUC5AC, MUC5B, MUC16), ainsi qu'à des marqueurs de mort cellulaire épithéliale (M30 : apoptose et M65 : apoptose et nécrose, toutes deux étant des protéines du cytosquelette épithélial, relarguées lors du processus de mort cellulaire).(87) Les niveaux mesurés dans le LBA de M30, MUC1 et MUC16 étaient significativement plus élevés chez les patients avec CLAD. La concentration de M30 était plus élevée chez les patients avec

RAS que ceux avec BOS, et des niveaux de M30 et MUC5B plus élevés étaient associés à une moins bonne survie du greffon pulmonaire après un diagnostic de CLAD. Ces résultats seraient en faveur d'un rôle des protéines épithéliales mucineuses et de certains marqueurs de mort cellulaire épithéliale dans le développement du CLAD et dans l'orientation vers un phénotype particulier.

### **2.3 Mécanismes cellulaires impliqués dans le CLAD**

La physiopathologie du développement des lésions de bronchiolite oblitérante est résumée dans la **figure 15**. L'épithélium des voies aériennes est une source de médiateurs inflammatoires et de facteurs de dégradation de la matrice.(90) Suite aux agressions inflammatoires répétées du greffon pulmonaire, les cellules épithéliales peuvent induire une réponse allo-immune et exprimer des facteurs de croissance comme le Transforming Growth Factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ ), le Connective Tissue Growth Factor (CTGF), le Platelet-derived Growth factor (PDGF), l'Endothelin-1 et des molécules inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-13 et IL-17 qui vont entraîner la prolifération de fibroblastes et des dépôts de matrice extracellulaire accélèrent le développement de la BO.(64,91)

Les cytokines et facteurs de croissance libérés majorent l'expression des chimiokines (CCL2 et CCL5) et CXC (CXCL9, CXCL10, CXCL11), qui participent au recrutement de cellules mononucléées dans les zones lésées. Ces cellules mononucléées expriment des récepteurs de chimiokines spécifiques et sont phénotypiquement distinctes (réponse immunitaire de type 1 : expression de CCR5 et CXCR3, réponse immunitaire de type 2 : expression de CCR2). Ces cellules mononucléaires sécrètent dans leur environnement des cytokines et facteurs de croissance, créant ainsi une boucle de rétroaction positive. Les chimiokines libérées entraînent une angiogenèse et un remodelage vasculaire nécessaire qui entretiennent l'inflammation chronique et la fibrogénèse, à l'origine d'une fibro-obliteration de la lumière bronchique.(92) L'inflammation neutrophilique joue également un rôle clé via la production accrue d'IL-8.



**Figure 15 :** Représentation schématique résumant la physiopathologie de la bronchiolite oblitérante après une transplantation pulmonaire. (Belperio, Proc Am Thorac Soc, 2009)

La dysfonction chronique du greffon pulmonaire est donc phénomène complexe, irréversible, impactant de manière significative le pronostic à moyen et long terme après une TP, pour lequel les options thérapeutiques restent limitées. Il est donc nécessaire de continuer à améliorer nos connaissances sur sa physiopathologie, et de développer d'autres moyens diagnostiques afin d'obtenir un diagnostic le plus précoce possible. L'un des mécanismes impliqués dans le recrutement et la prolifération fibroblastique est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et a fait l'objet de nombreux travaux de recherche.

### 3. LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE

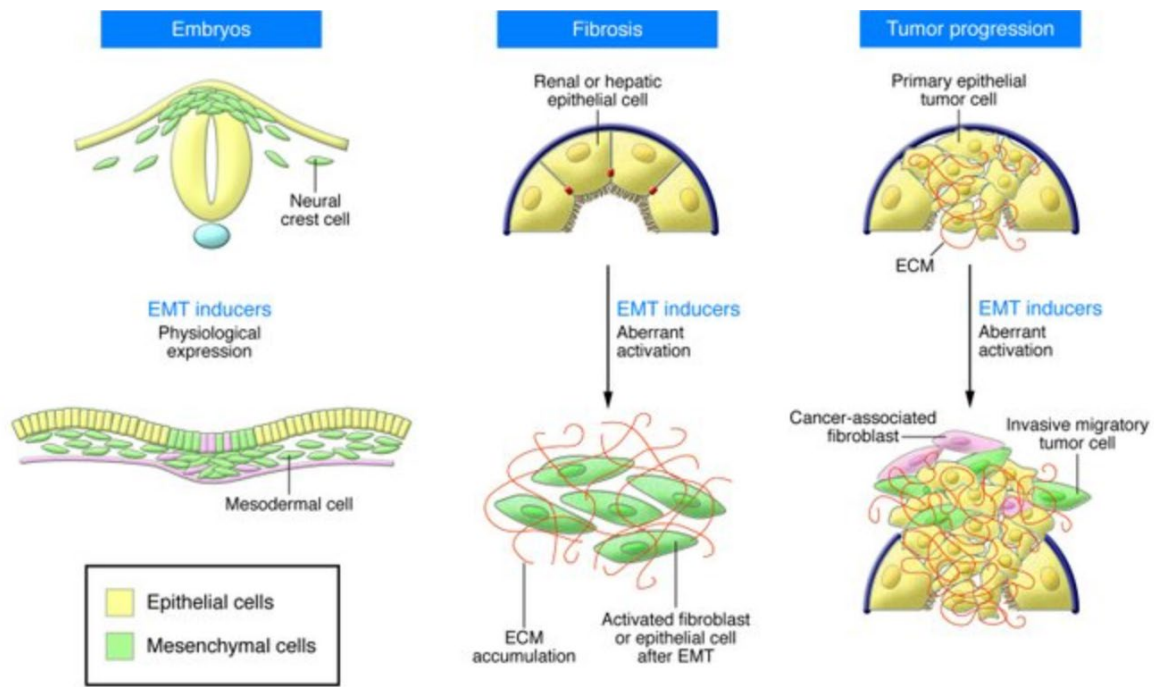
La transition épithélio-mésenchymateuse a fait l'objet de nombreux travaux visant à éclairer son rôle dans la physiopathologie de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire. Nous allons détailler ces données par la suite. Nous nous sommes intéressés à la TEM dans ce travail de thèse en raison de son rôle central dans le développement des lésions de fibrose au cours du CLAD secondaire aux différentes agressions inflammatoires post-TP, et de son intérêt en tant que cible thérapeutique potentielle.

Au cours de la TEM, les cellules épithéliales perdent leurs propriétés épithéliales au profit d'un phénotype mésenchymateux. Il existe 3 types différents de TEM. Le type I participe à la formation du mésoderme et de la crête neurale au cours de l'embryogenèse.

Le type III est impliqué dans la cancérogénèse en cas de stimulation épithéliale et participe à l'acquisition des propriétés migratrices des cellules tumorales dans les disséminations métastatiques. Il est possible d'évaluer la proportion de cellules affectées par la TEM, ainsi que le niveau de progression de ces cellules dans cette voie ou la voie inverse, appelée transition mésenchymo-épithéliale. Pour cela, plusieurs techniques peuvent être utilisées, ainsi que différentes sortes de marqueurs tels certaines protéines morphologiques (E-cadhérine, Vimentine, CD44/CD24...) et certains facteurs de transcription (Snail, Twist, Zeb1...).(93) Cela représente un véritable intérêt clinique dans le domaine de l'oncologie notamment. En effet, des études ont montré que les patients atteints par certains types de cancers du sein ou de la prostate, chez qui étaient observées des cellules cancéreuses avec des signes importants de TEM, étaient ceux avec le moins bon pronostic et le taux de métastases le plus élevé.(94,95)

Enfin, le type II est impliqué dans les phénomènes de réparation et de régénération des tissus en contribuant à renouveler le pool de cellules mésenchymateuses (**figure 16**). (96,97)



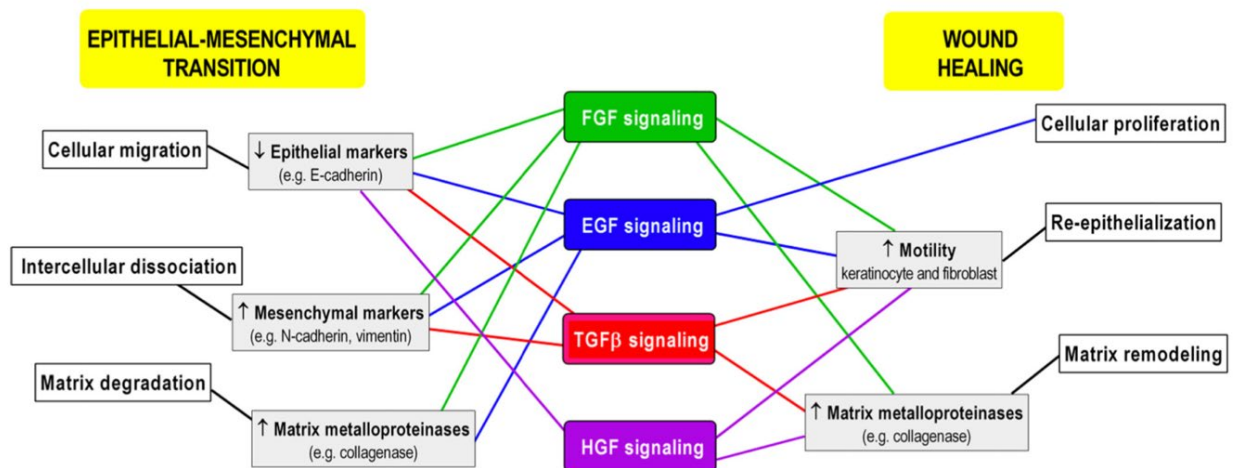


**Figure 16 :** Représentation des 3 types de transition épithélio-mésenchymateuse (Kalluri, J Clin Invest, 2003).

La transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses serait liée à une perte du phénotype épithélial caractérisée par une baisse de l'expression de certaines protéines de surface et de certaines protéines de jonction (E-cadhérine,  $\gamma$ -Caténine, Zonula-occludens 1) et par l'augmentation de l'expression mésenchymateuse de protéines comme fibronectine,  $\alpha$ -SMA et Vimentine, associé à l'augmentation de la production de collagène-1. Cela est responsable d'une perte de la polarité cellulaire. Un réarrangement du cytosquelette s'opère également à travers la perte de l'adhésion intercellulaire et permet l'émergence d'un phénotype fibroblastique et de cellules fusiformes et allongées, avec des capacités motrices et invasives permettant l'activation de l'expression des métalloprotéinase pouvant dégrader les protéines de la matrice extracellulaire.(98) Lors de la TEM, on observe une rupture des jonctions serrées et adhérentes et une répression des gène épithéliaux.(99) Les cellules expriment alors des gènes mésenchymateux.(100)

Le Fibroblast Growth Factor (FGF) est une protéine de signalisation cellulaire, produite par les macrophages, impliquée dans la migration et la multiplication de cellules cibles. Il active un facteur de transcription, Slug, qui agit comme inducteur de la TEM, permettant la

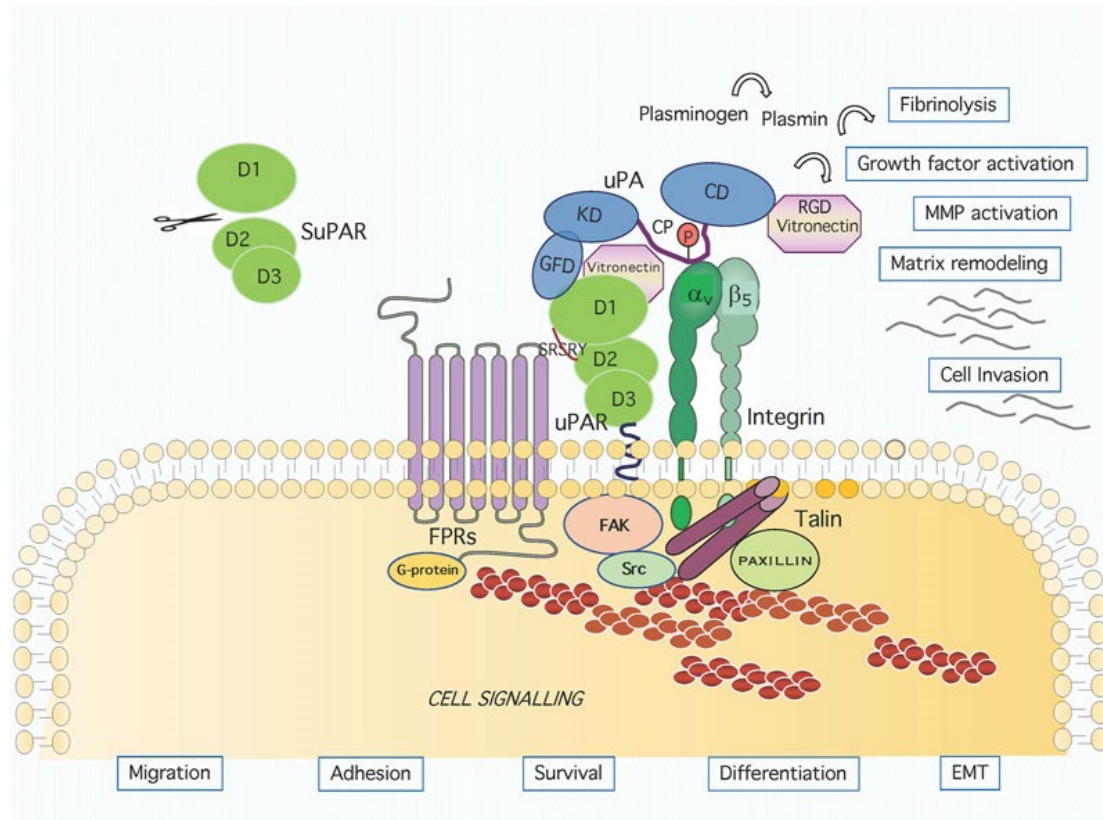
stimulation de sécrétion de métalloprotéinase 2 et 9 (MMP2-MMP9) impliquées dans la dégradation de la membrane basale. Epidermal Growth Factor (EGF) et Hepatic Growth Factor (HGF) sont des facteurs de dispersion qui induisent une déstabilisation des desmosomes et activent Snail et Slug (facteurs de transcription pro-TEM), et inhibent le gène codant pour la desmoplakine (impliquée dans la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire) induisant l'acquisition de nouvelles propriétés migratrices ainsi qu'une diminution des marqueurs épithéliaux. FGF et EGF favorisent l'endocytose de la E-cadhérine, l'expression de Snail, Twist et TGF- $\beta$  permettant la dissociation cellulaire et une augmentation des marqueurs mésenchymateux. FGF et EGF dégradent la matrice extracellulaire et augmentent la synthèse de métalloprotéinases (**figure 17**).<sup>(101)</sup>



**Figure 17 :** Facteurs de croissance impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Stone, Cell Tissue Res, 2016).

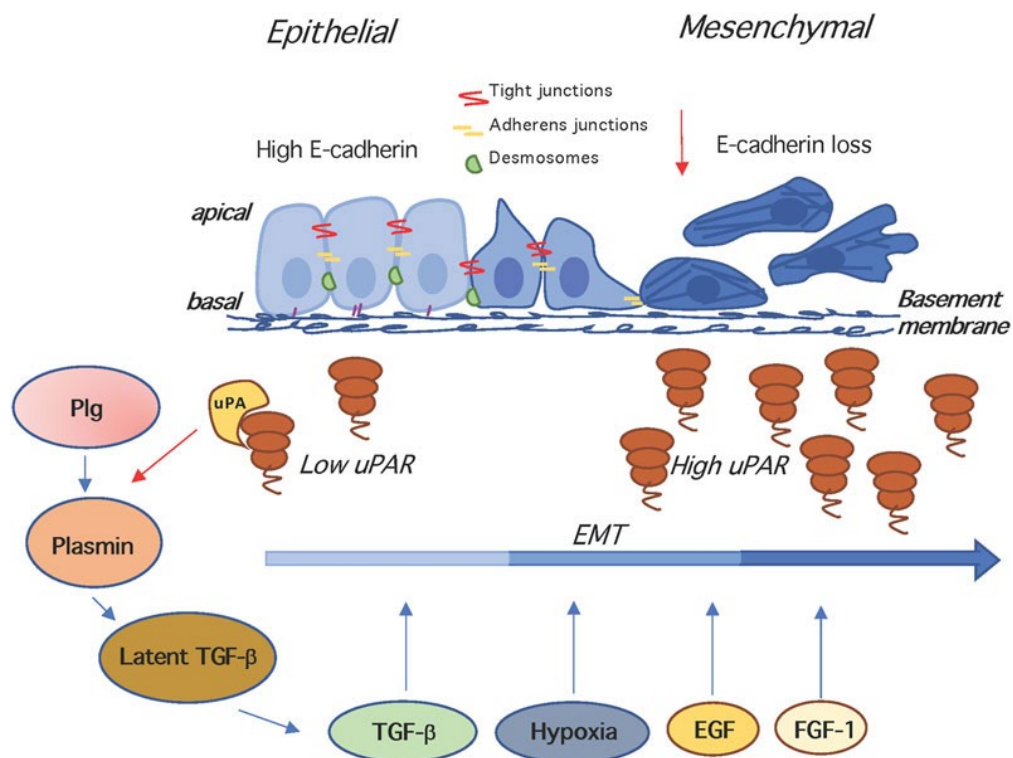
Les facteurs de transcription impliqués dans la TEM sont Snail, Slug, bHLH, ZEB où Snail et Slug répriment les gènes épithéliaux et activent les gènes mésenchymateux.<sup>(100)</sup> Les protéines de la famille TGF- $\beta$ , Wnt, Notch et RTK activent l'expression de Snail. Les macrophages peuvent également induire une TEM quand ils sont en contact direct avec les cellules épithéliales en produisant des cytokines pro-inflammatoires telles qu'Interleukine-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ .<sup>(102)</sup>

L'une des principales voies de signalisation également impliquée dans la TEM est le système d'activation du plasminogène, à savoir la protéine uPA (urokinase-type plasminogen activator) et son récepteur Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR).(103) uPAR est une glycoprotéine exprimée à la surface de nombreuses cellules telles que les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, et les cellules mésothéliales pleurales. Son expression peut être induite par des médiateurs pro-inflammatoires, tels que TNF-alpha et l'interleukine-1 $\beta$ . La liaison entre le ligand et son récepteur coordonne l'activité de protéolyse de la membrane plasmique de la cellule, notamment à l'origine de la conversion du plasminogène inactif en plasmine, capable de mieux dégrader des protéines de la matrice extracellulaire. Cette liaison va également participer à un phénomène de fibrinolyse, d'activation de facteurs de croissance et de MMP, et de remodelage de la matrice. En interagissant avec son récepteur, uPA va mettre en contact des protéines transmembranaires, telles que le récepteur 1 de la protéine G, des intégrines, et le récepteur de l'Epidermal growth factor (**figure 18**).



**Figure 18:** Représentation schématique du système uPAR à la surface des cellules (Alfano, Front Cell Dev Biol, 2022).

Cela va entraîner un réarrangement du cytosquelette, et favoriser l'adhésion, la migration, la prolifération de la cellule (**figure 19**). La transformation du plasminogène en plasmine à la suite à la liaison uPA/uPAR va permettre la conversion de TGF- $\beta$  latent en TGF- $\beta$  actif, qui va ainsi participer au phénomène de TEM, et également stimuler l'expression de uPA et uPAR.



**Figure 19:** Rôle du système uPAR au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse. (Alfano, Front Cell Dev Biol, 2022).

uPA peut également se fixer sur le Tumor endothelial marker (TEM)8, une protéine de membrane cellulaire, entraînant sa phosphorylation, également responsable de la phosphorylation de l'EGFR. TEM8 est impliqué dans l'entrée de la protéine d'Anthrax dans les cellules.(104)

Le rôle protecteur de uPAR contre les infections a été décrit dans plusieurs études, notamment sa participation au recrutement de neutrophiles ou de lymphocytes, par exemple dans des poumons de souris infectés par *Streptococcus pneumoniae*.(105,106)

Il est également impliqué dans le développement de situations pathologiques et l'émergence de phénotypes cellulaires agressifs, notamment en cancérologie.(107–110) Le rôle de uPAR a été décrit dans la dissémination de cellules de cancer du côlon, de prostate ou de mélanome, son inhibition ayant à l'inverse un effet anticancéreux.(111,112) L'hypoxie joue un rôle dans le signal délivré par uPAR. En effet, des études ont montré que uPAR est impliqué dans la TEM induite par l'hypoxie dans le cancer du sein, en participant à la rupture des jonctions intercellulaires et à la perte de la E-cadhérine au niveau membranaire.(113)

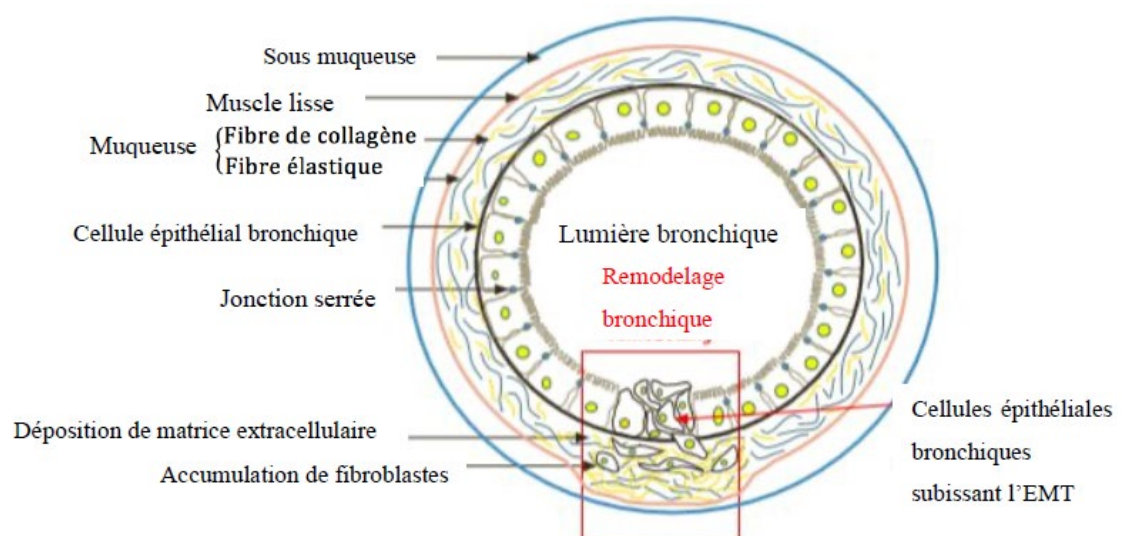
Son rôle dans certaines pathologies pneumologiques a également été décrit. L'expression de uPAR est augmentée dans la BPCO.(114)

Shmakova et al (115) ont observé chez des patients ayant été affectés par la COVID-19 que l'expression de uPAR était fortement diminuée au sein des cellules basales de l'épithélium bronchique et dans les monocytes/macrophages, entraînant une accumulation de uPA dans le tissu pulmonaire, favorisant le risque de développer une fibrose pulmonaire. Dans la même étude, les auteurs ont utilisé un modèle murin de fibrose pulmonaire après traitement par bléomycine, et ont comparé des souris *Plau*<sup>-/-</sup> et *Plaur*<sup>-/-</sup> (les gènes codant respectivement pour uPA et uPAR) à des souris sauvages. Ils ont observé chez les souris déficitaires pour uPAR une accumulation de uPA, IL-6 et ACE-2, des facteurs profibrotiques, dans les tissus pulmonaires, associée à une fibrose sévère. Cet effet était en partie réversible après traitement par du plasminogène. Enfin, en utilisant des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et alvéolaires humaines A459 où était inhibé uPAR, les auteurs ont observé une expression accrue de N-cadhérine, signe d'un phénomène de TEM, pouvant contribuer au développement d'une fibrose pulmonaire.

L'implication de uPA/uPAR a également été décrite dans la physiopathologie de la fibrose pleurale, pathologie responsable d'une perte de volume pulmonaire avec atteinte fonctionnelle, secondaire à une inflammation de la plèvre, par exemple d'origine infectieuse.(116) Au cours de la fibrose pleurale, les cellules mésothéliales pleurales normales subissent un changement de phénotype en faveur d'un phénotype mésenchymateux pro-fibrotique, favorisant l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la fibronectine ou alpha-SMA. On parle alors de transition mésothélio-

mésenchymateuse. Une étude a montré que chez des patients atteints de fibrose pleurale, les cellules mésothéliales exprimaient fortement uPAR. Son inhibition ainsi que celle de uPA bloquaient le phénomène de transition mésothélio-mésenchymateuse médiée par le TGF- $\beta$ . L'analyse histologique de tissu pleuropulmonaire prélevés chez des souris knock-out pour uPAR montrait une diminution significative de l'épaississement pleural ainsi que de l'expression de alpha-SMA, comparé à des souris sauvages.

L'existence d'un environnement inflammatoire chronique post-TP autour des cellules épithéliales bronchiques, médié par certaines protéines inflammatoires (TGF- $\beta$ 1) est donc un élément déclencheur à l'origine d'un possible dérèglement de la TEM. Tous ces phénomènes sont responsables d'une altération de la structure de l'épithélium, favorisant la migration de cellules et de médiateurs pro-inflammatoires vers la lumière des voies aériennes, qui peuvent participer au processus fibroprolifératif. Les lésions épithéliales répétées survenant après une TP pourraient être responsables d'une dérégulation de la TEM contribuant à une accumulation et une activation excessive de (myo)fibroblastes, responsables de l'obstruction fibrineuse des bronchioles, menant au développement de la BO (**figure 20**). (117)



**Figure 20** : Représentation de la transition épithélio-mésenchymateuse de type 2 au cours du remodelage bronchique (figure adaptée de Pain et al, Eur Respir Rev, 2014).

Des taux élevés de TGF- $\beta$ 1 ont été mesurés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire 24 heures après la TP, chez des patients ayant développé par la suite une BOS.(118) Une étude menée en 2009 s'est intéressée tout particulièrement à la TEM dans la BOS.(82) L'hypothèse était que celle-ci serait liée à une réparation épithéliale aberrante avec un remodelage des voies aériennes de petit et moyen calibre. Cette étude a utilisé des cellules bronchiques primitives humaines (CBPH) prélevées chez des patients transplantés pulmonaires, stables, sans argument pour un rejet aigu ou une BOS. Le traitement de ces cellules par l'administration de TGF- $\beta$ 1 modifiait leur aspect avec un allongement important, amplifié par l'ajout de TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, les CBPH non traitées montraient une forte expression des protéines du phénotype épithélial (cytokératine 19 et E-cadhérine) et une faible expression de celles du phénotype mésenchymateux (fibronectine, Vimentine) en immunohistochimie et en Western Blot. L'administration de TGF- $\beta$ 1 entraînait une augmentation de l'expression des protéines du phénotype mésenchymateux aux dépens de celles du phénotype épithélial, amplifiée par l'association avec du TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, la production de MMP9 par les CBPH, normalement faible était grandement majorée après traitement cytokinique. Enfin les capacités migratoires des CBPH, évaluées par les capacités de pénétration dans une membrane de Matrigel, étaient également majorées par le traitement par les deux cytokines. Les auteurs ont également étudié l'expression des protéines de membranes sur des biopsies transbronchiques. Les cellules issues de tissus normaux de patients contrôle exprimaient fortement la E-cadhérine et faiblement  $\alpha$ -SMA et la Vimentine (phénotype mésenchymateux). En revanche, l'expression était nettement moins contrastée sur des biopsies de patients greffés stables, et une inversion de l'expression aux profits du phénotype mésenchymateux était observée sur des biopsies de patients atteints de BOS.(82)

Une autre étude a montré que la colonisation des voies aériennes par *Pseudomonas aeruginosa* chez des patients greffés pulmonaires augmentait de manière significative le risque de développer une BOS. En effet, la présence de cette bactérie majorait l'inflammation déjà présente dans les voies aériennes, avec une augmentation de la

concentration de TNF $\alpha$ , d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 1 dans le lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA).(119) Dans une autre étude, les patients traités avec de l'Infliximab, un anti-TNF $\alpha$ , amélioraient la valeur de leur VEMS aux EFR ainsi que la distance parcourue au test de marche de 6 minutes. Bien qu'il s'agisse d'une étude ouverte avec un faible effectif, cette étude évoquait l'idée du rôle joué par l'inflammation répétée dans le dérèglement de la TEM.(120) Le rôle de TNF- $\alpha$  sur la régulation du cycle cellulaire des cellules épithéliales a été mis en évidence dans une étude concernant des patients atteints de polykystose rénale autosomique dominante : la stimulation des cellules épithéliales rénales par le TNF- $\alpha$  entraînait leur prolifération en diminuant le taux d'ARNm et le niveau d'expression de p21, un inhibiteur des « cycline dépendant kinase » (CDK), régulatrices du cycle cellulaire.(121)

Il existe donc un véritable intérêt à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la TEM au cours de l'atteinte bronchique survenant lors de la bronchiolite oblitérante post-TP, ainsi que les causes potentielles participant à son dérèglement. Cela pourrait permettre de déterminer les mécanismes amplificateurs de la pathologie et identifier des cibles thérapeutiques.



## 4. LES MICROPARTICULES MEMBRANAIRES

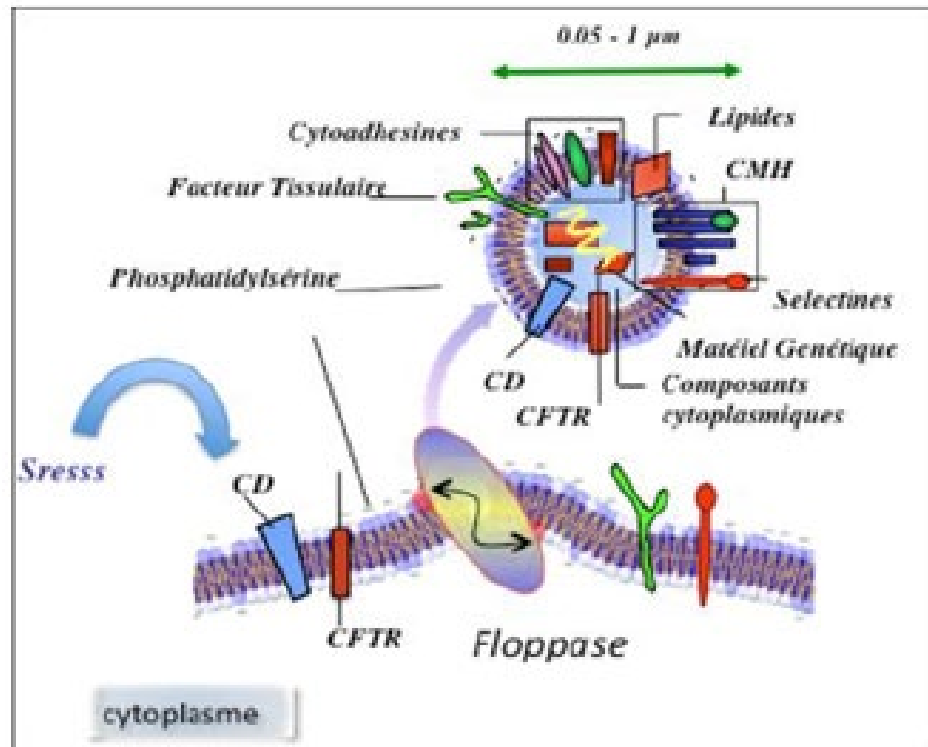
### 4.1. Genèse et propriétés

Dans ce paragraphe, nous utiliserons le terme de microparticules membranaires, afin de rester cohérents avec le terme que nous avons employé dans notre article publié portant sur microparticules et leur rôle potentiel dans le développement du syndrome de bronchiolite oblitérante, détaillé plus loin dans ce travail.(122) Cependant, il est à noter que la terminologie a évolué, et que désormais, le terme de microvésicules est préféré.(123–125)

Les microparticules membranaires (MPs) sont des fragments de membrane plasmique de 50 à 1000 nm de diamètre. Elles sont émises dans le compartiment vasculaire ou tissulaire par des cellules activées ou apoptotiques en réponse à diverses conditions physiopathologiques comme l'inflammation ou le stress oxydant. Si les mécanismes moléculaires présidant à leur émission ne sont pas tous élucidés, il est généralement admis que les cellules subissent un remodelage de la membrane plasmique favorisant la translocation d'un aminophospholipide anionique, la phosphatidylsérine (PhtdSer), du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane. La surcharge transitoire du feuillet externe en phospholipides, associée à une dégradation accélérée du cytosquelette en réponse aux influx calciques induits par la stimulation, favorise le bourgeonnement de la membrane et la libération de la MP dans le milieu extracellulaire (**figure 21**).(126)

Des études ont en effet montré que l'inhibition de l'augmentation du taux de calcium intracellulaire prévenait la formation des MPs.(127,128) Chaque type cellulaire est capable d'émettre des MPs, dépendant de ses capacités propres à répondre aux stimuli et de son outillage moléculaire, comme les différentes protéases calcium-dépendantes qui dégradent le cytosquelette. Il a été démontré, dans différents modèles cellulaires, que la quantité de MPs émises était proportionnelle au degré d'apoptose ou de stress.(129,130) Enfin, les MPs sont le reflet de la structure de la membrane parentale à son point d'émission. Elles portent les antigènes de la cellule, exposent la PhtdSer et englobent une fraction

cytosolique, ce qui leur confère un rôle d'effecteur cellulaire. Les MPs sont présentes dans les fluides biologiques ou dans des tissus comme la synovie (131), le foie (132), le liquide céphalo-rachidien (133).



**Figure 21** : Remodelage membranaire et émission de microparticules par des cellules soumises à un stress. CD: marqueurs de différenciation, CFTR: canal chlore, CMH: complexe immun majeur d'histocompatibilité (à partir de Bakouboula et al, Front Biosci (Landmark Ed), 2011).

#### 4.2. Les microparticules, marqueurs circulants et effecteurs cellulaires

En situation physiologique, les MPs circulantes sont principalement d'origine plaquettaire. On retrouve également des proportions variables de MPs leucocytaires, endothéliales voire érythrocytaires. Elles circulent à des concentrations faibles chez l'individu sain. En situation pathologique, elles constituent souvent un marqueur non invasif d'atteinte vasculaire accessible par simple ponction veineuse périphérique, voire de dommages tissulaires lorsque l'organe lésé est très vascularisé. Les MPs sont ainsi des marqueurs du rejet aigu de greffe cardiaque (134) mais aussi du rejet humoral ou cellulaire de greffe

d'îlots.(135,136) Si les MPs plaquettaires délivrent un message délétère à l'endothélium lors d'une inflammation par le biais de la chimiokine RANTES, les MPs de polynucléaires neutrophiles (PNN) secrétées au site de l'inflammation auraient un effet bénéfique en limitant la diapédèse grâce à leur contenu important en Annexine A1, une lipocortine anti-inflammatoire.(137,138)

Les MPs circulantes ont été extensivement étudiées en raison de leur association à un risque thrombotique primaire ou secondaire. Elles ont des propriétés procoagulantes du fait de l'expression à leur surface de phosphatidylsérine qui catalyse les réactions de la coagulation et, lorsque les MPs sont endothéliales ou monocytaires, du fait de la présence de facteur tissulaire, l'initiateur cellulaire de la coagulation.

Il est généralement admis que les MPs circulantes participent à des boucles d'auto amplification de leur génération en favorisant la stimulation de cellules cibles. En effet, elles se comportent comme des navettes biologiques capables de disséminer un signal biologique de la cellule parentale à la cellule cible. Dans le compartiment sanguin, le transfert d'informations par les MPs constitue un mécanisme de communication intercellulaire. Quelques études récentes suggèrent que les MPs sont aussi des vecteurs d'information entre les différentes cellules constitutives d'un même tissu.(139,140)

### **4.3. Microparticules et pathologies pulmonaires**

Au niveau pulmonaire, deux réservoirs de MPs ont été mis en évidence: les MPs d'origine vasculaire pulmonaire, le plus souvent étudiées, et celles du compartiment aérien (isolées notamment à partir d'une expectoration ou d'un lavage bronchoalvéolaire).(141) Les MPs endothéliales bronchiques sont généralement caractérisées par l'expression d'antigènes endothéliaux de surface comme VE-cadhérine, PECAM, E-sélectine et Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM).

En pathologie respiratoire, les publications concernant l'étude des MPs sont assez limitées. Mais la production accrue de MPs a été décrite dans différentes situations pathologiques. En

raison de leurs propriétés procoagulantes, elles ont fait l'objet de plusieurs études chez les patients ayant présenté une maladie thromboembolique veineuse.(142)

Le taux de MPs circulantes augmente en cas d'exposition à la fumée de cigarettes, chez l'homme et l'animal.(143) Chez les patients BPCO, le taux de MPs endothéliales, signe d'une apoptose endothéliale est augmenté, particulièrement au cours des exacerbations.(144,145) Chez les patients atteints d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), le taux de MPs émises par les cellules endothéliales est augmenté dans le liquide d'œdème alvéolaire et elles pourraient participer à la sévérité du tableau en favorisant la coagulation intra-alvéolaire, et en majorant l'inflammation et la perméabilité alvéolaires et vasculaire et en diminuant les capacités endothéliales.(146)

Plusieurs études ont montré que le taux de MPs circulantes d'origine endothéliale, plaquettaire, érythrocytaire augmentait chez les patients atteints d'une hypertension pulmonaire (HTP) (147,148) et qu'elles pourraient participer à la sévérité du tableau.(149,150)

L'augmentation du taux de MPs circulantes d'origine leucocytaire, érythrocytaire et endothéliale a également été observée chez les patients atteints d'un syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS).(151,152) Le relargage des MPs leucocytaires pourrait participer à la survenue d'évènements cardiovasculaires indésirables.(153)

Les propriétés pro-inflammatoires des MPs leur confèrent également un rôle important dans la sévérité des cancers bronchiques en majorant l'inflammation et l'angiogenèse des lésions tumorales.(154,155) Leurs capacités pro-coagulantes participent également à la morbi-mortalité de ces patients en augmentant le risque de thrombose au cours des cancers pulmonaires.(156,157)

*Porro et al* se sont intéressés aux MPs dans la mucoviscidose et ont observé un taux élevé de MPs émises par les PNN dans les expectorations de ces patients, qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs à visée diagnostique en cas d'exacerbation notamment chez les patients colonisés à *P. aeruginosa*.(158) La même équipe a également observé que les MPs de patients atteints de mucoviscidose en exacerbation, administrées dans un modèle

murin, entraînaient une infiltration neutrophilique plus importante dans les tissus pulmonaires que les MPs de patient stables.(159)

Les capacités pro-inflammatoires et pro-coagulantes des MPs plaquettaires, endothéliales et leucocytaires semblent également jouer un rôle dans le développement de l'asthme (160,161) et dans la physiopathologie de pneumopathies interstitielles telles que la fibrose pulmonaire idiopathique.(162,163)

Une étude récente a mis en évidence le rôle des exosomes dans la TEM dans le cadre de la dissémination métastatique.(164) Mais ces vésicules, d'origine intracellulaire, issues des endosomes, et de taille inférieure aux microparticules, n'exposent ni les marqueurs de la membrane plasmique, ni la phosphatidylsérine. L'impact des MPs sur la TEM commence seulement à être comprise et leurs propriétés de bioeffecteurs cellulaires semble être une piste intéressante pour la compréhension des mécanismes cellulaires aboutissant au dérèglement de la TEM.

Il a été montré que les monocytes et les macrophages recueillis à partir du sang de volontaires donneurs relâchaient des MPs pouvant stimuler l'immunité innée de l'épithélium des voies aériennes (VA) et entretenir la physiopathologie de certaines maladies des VA en augmentant la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires tels que IL-8 et en majorant le chimiotactisme des monocytes.(165) Un autre travail a montré que les MPs produites par les monocytes et les macrophages induisaient un phénotype inflammatoire dans les cellules musculaires lisses bronchiques et que ce phénomène pouvait être inversé après traitement par Montelukast, un antagoniste des récepteurs aux leucotriènes.(166)

Enfin, un travail réalisé au sein de notre équipe a montré que les MPs du compartiment alvéolaire pourraient être des biomarqueurs intéressants pour évaluer le degré d'ischémie reperfusion lors d'une TP, et ainsi prédire le risque de survenue d'une dysfonction primaire du greffon.(167)

Un travail réalisé au sein de notre laboratoire (*A. Leclercq, mémoire de Master 2*) a permis d'isoler et de caractériser l'origine cellulaire des microparticules dans le LBA collecté chez 21 patients atteints de diverses pathologies respiratoires. Les résultats montraient que

les pathologies infectieuses étaient celles qui s'accompagnaient des concentrations les plus importantes de MPs dans le LBA. L'origine cellulaire des MPs a été recherchée par l'utilisation d'anticorps spécifiques des lignées épithéliales leucocytaires présentes dans le LBA : cellules épithéliales (CD104), polynucléaires neutrophiles (PNN) (CD66b), lymphocytes T (CD3/20b). La concentration en PNN du LBA était corrélée à celle des MPs CD66b+.

Notre équipe a également montré que le lipopolysaccharide (LPS) de *P. Aeruginosa*, l'agent infectieux bactérien pouvant avoir un impact dans le développement de la BOS, entraînait une production importante de MPs ainsi que l'apoptose des monocytes (THP-1) et des lymphocytes (CEM) d'origine humaine, tout comme le TNF- $\alpha$ .

Des résultats préliminaires de notre laboratoire ont aussi montré que les lignées cellulaires bronchiques disponibles n'étaient pas toutes susceptibles de constituer un modèle cellulaire suffisamment satisfaisant pour l'étude de la réponse aux cytokines et aux agents infectieux. Ainsi, ni le TNF- $\alpha$ , ni le LPS de *P.Aeruginosa* impliqués dans la physiopathologie de la BOS ne déclenchaient d'apoptose des cellules épithéliales bronchiques de la lignée Calu-3 ou de libération de MPs, suggérant que cette lignée était réfractaire à la stimulation (*A. Leclercq, mémoire de Master 2*). Il semble donc préférable d'utiliser la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaine BEAS-2B, comme cela l'a été fait dans des travaux précédents.(168)

Au total, plusieurs travaux ont montré que la transition épithélio-mésenchymateuse observée au niveau des cellules épithéliales bronchiques lors de la BO était sous l'influence de l'environnement inflammatoire présent en post-TP, et notamment de certaines protéines inflammatoires telles que TGF- $\beta$ 1 ou le TNF- $\alpha$ .(64,82) L'émission et l'activité des MPs est également conditionnée par l'inflammation auxquelles les cellules émettrices sont soumises. Le rôle des MPs d'origine leucocytaires sur la transition épithélio-mésenchymateuse à laquelle sont soumises les cellules épithéliales bronchiques au cours du dysfonctionnement chronique du greffon après une transplantation pulmonaire reste encore mal connue.

## 5. HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Avec ce travail de thèse, nous avons souhaité améliorer nos connaissances sur les différents phénotypes de CLAD, leurs différences et leurs similitudes, en développant de nouveaux outils diagnostiques, à l'aide des techniques déjà existantes et aussi à l'aide de nouvelles technologies. Nous avons également fait l'hypothèse que les microparticules membranaires, véritables bio-effecteurs impliqués dans la communication intercellulaire, pourraient participer à la survenue de la TEM au cours de la BOS, pourraient être utilisées en tant que biomarqueurs dans le diagnostic précoce de la BOS chez les patients greffés pulmonaires.

Nous allons donc d'abord présenter nos données préliminaires, obtenues lors de la période de la mobilité au sein du Toronto lung transplant program, à Toronto au Canada, sous la supervision du Dr Tereza Martinu.

Dans un premier travail, nous avons souhaité confirmer l'existence d'un chevauchement des caractéristiques histologiques entre les phénotypes de BOS et de RAS en adaptant un système de notation anatomopathologique semi-quantitatif aux poumons humains affectés par le CLAD afin d'évaluer les caractéristiques épithéliales bronchiques et fibrotiques spécifiques des phénotypes du CLAD (*travail en cours de soumission*).

Dans un second travail, nous avons souhaité évaluer l'utilisation de la technique d'Imaging mass cytometry, une nouvelle méthode d'analyse spectroscopique de masse utilisant un marquage par des anticorps conjugués avec des métaux lourds, pour l'étude détaillée du tissu du greffon pulmonaire affecté par le CLAD (*travail en cours de préparation*).

Nous présenterons ensuite les résultats de notre travail réalisé au sein de notre unité de recherche INSERM UMR 1260 – Médecine nanorégénérative, sous la direction du Pr Romain Kessler et du Pr Anne Olland, dans lequel nous avons cherché à étudier plus en

détail le phénomène de TEM au cours de la BOS, et également évaluer le rôle potentiel des MPs d'origine leucocytaire dans ce phénomène (*travail publié*).

**Les objectifs de ce travail étaient :**

- De rechercher des arguments en faveur d'une TEM en analyse immunohistochimique sur des poumons explantés de patients greffés pulmonaires au CHU de Strasbourg, ayant bénéficié d'une deuxième transplantation pour le traitement d'une BOS.
- De caractériser et phénotyper les MPs circulantes chez des patients greffés avec et sans BOS afin de déterminer leur intérêt en tant que biomarqueurs précoces.
- D'étudier *in vitro* le rôle potentiel des microparticules membranaires d'origine leucocytaires dans la survenue d'une TEM sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines.



# Données préliminaires



## Article 1 : Analyse des différents phénotypes anatomopathologiques dans la dysfonction chronique du greffon pulmonaire

### Contexte

La physiopathologie du CLAD reste mal comprise, malgré des découvertes récentes et la publications de recommandations internationales.(55,59) Au cours des deux dernières décennies, deux principaux phénotypes de CLAD ont été décrits.(58,61,62) Le plus fréquent est le syndrome de bronchiolite oblitérante (Bronchiolitis obliterans syndrome - BOS). La principale caractéristique histologique de la BOS est la bronchiolite oblitérante (BO), caractérisée par des lésions oblitératives fibrotiques des petites voies aériennes. Le deuxième phénotype le plus courant est appelé Restrictive allograft syndrome (RAS).(58) La principale caractéristique histologique du RAS est la fibro-élastose pleuro-parenchymateuse ou intra-alvéolaire (intra-alveolar fibro-elastosis - IAFE), en plus d'autres lésions histologiques telles que du dommage alvéolaire diffus, de la pneumonie organisée, ainsi que la BO.(59,66) Plusieurs études ont montré qu'il pourrait exister un chevauchement histologique important entre les différents phénotypes de CLAD.(67–70) Une précédente étude du groupe de Toronto a utilisé un modèle animal présentant un large éventail de caractéristiques histologiques du CLAD dans un modèle murin de transplantation unipulmonaire avec rejet chronique. (71) Un système de notation histologique semi-quantitatif avait été mis au point pour évaluer le degré de sévérité de certaines caractéristiques histologiques observées dans le greffon pulmonaire humain avec CLAD. L'étude avait mis en évidence que les caractéristiques du CLAD n'étaient pas un phénomène du type « tout ou rien » dans ce modèle, mais plutôt un spectre de différentes lésions.

Après une TP, l'épithélium des voies respiratoires est fortement impliqué dans les interactions avec le système immunitaire, ainsi que dans la réparation et le remodelage des tissus.(79,80) Les agressions répétées, telles que les infections, les épisodes de rejet aigu, les expositions toxiques par inhalation, le reflux gastro-œsophagien pathologique (RGO), entraînent des lésions de la barrière épithéliale, associées à une diminution de la capacité de régénération épithéliale et à une réduction de la sécrétion de protéines protectrices, ainsi

qu'à une production accrue de facteurs pro-inflammatoires et profibrotiques.(81) Cette accumulation de lésions épithéliales peut conduire à la fibrose, à l'origine du développement du CLAD.(81–85) Il existe plusieurs types de cellules épithéliales dans les voies aériennes. Les types les plus courants comprennent les cellules ciliées, les cellules caliciformes sécrétant du mucus, les cellules basales et les cellules club. Les cellules club sont des cellules épithéliales sécrétoires non ciliées, avec un rôle de cellules progénitrices et produire une protéine anti-inflammatoire appelée club cell secretory protein (CCSP), qui aide à maintenir l'homéostasie des voies respiratoires.(76–78) La réduction du nombre de cellules club et de la production de CCSP ont été décrites en association avec le CLAD.(81) Les mécanismes exacts des lésions affectant les cellules épithéliales des voies respiratoires, en particulier les cellules club dans le CLAD n'ont pas été entièrement caractérisés.

Avec cette étude, nous avons émis l'hypothèse qu'il existait un chevauchement histopathologique entre les lésions de BOS et celles de RAS. Pour évaluer cela, nous avons adapté le système de notation anatomopathologique semi-quantitatif développé par Martinu et al (71) aux poumons humains affectés par le CLAD afin d'évaluer les caractéristiques épithéliales bronchiques et fibrotiques spécifiques de ses différents phénotypes.

### Matériel et méthodes

Nous avons utilisé des biopsies pulmonaires collectées entre 2015 et 2018, au moment de la retransplantation de 20 patients ayant nécessité consécutivement une seconde TP pour CLAD (12 BOS, 7 RAS et 1 mixte), au sein du Lung Transplant Program de Toronto. Le phénotype de CLAD au moment de la reTP a été validé lors de comités d'adjudication, en se basant sur les dernières recommandations de l'ISHLT.(55) Les biopsies utilisées ont été prélevées dans différents lobes des deux poumons, dans des zones périphériques, et centrales, avec utilisation de biopsies pulmonaires normales utilisées comme contrôles (collectées à partir de poumons de donneurs à la fin de la période d'ischémie froide, ou lors de lobectomies pour cancer bronchique, à distance de lésions

néoplasiques). L'aspect histologique des biopsies a ensuite été analysé à l'aide de notre système de notation anatomopathologique semi-quantitatif. Nous avons notamment évalué l'atteinte fibreuse autour des voies aériennes, leur degré d'obstruction fibreuse, ainsi que les modifications de l'épithélium bronchique (hyperplasie ou aplatissement) pour chaque voie aérienne. Pour chaque biopsie, nous avons évalué le pourcentage de fibrose parenchymateuse et le degré de fibrose pleurale. Nous avons également mené une étude en immunofluorescence, en ciblant 1) certaines sous populations de cellules épithéliales bronchiques dont les cellules club et les cellules mucineuses et 2) le niveau d'apoptose des cellules épithéliales bronchiques.

## Résultats

Nos résultats ont confirmé l'existence d'un chevauchement entre les différents phénotypes de CLAD. Nous avons en effet observé que le degré d'atteinte fibreuse au niveau des voies aériennes ne différait pas entre les échantillons BOS et les RAS, avec cependant une hétérogénéité plus importante du degré d'obstruction bronchique parmi les BOS. Comme attendu, le pourcentage de fibrose parenchymateuse était significativement plus important dans les RAS, avec une importante hétérogénéité inter- et intra-individuelle. Le degré de fibrose pleurale était également plus important chez les RAS, cependant sans différence significative avec les BOS.

Les modifications morphologiques affectant l'épithélium bronchique n'étaient pas différentes entre les BOS et les RAS. Nous avons observé une corrélation significative entre la sévérité de ces modifications et le degré d'inflammation autour des voies aériennes. Cela conforte l'hypothèse selon laquelle les lésions des cellules épithéliales sont considérées comme un événement clé dans le développement de CLAD et peuvent déclencher une cicatrisation exagérée via la transition épithéliale à mésenchymateuse, où les fibroblastes, les myofibroblastes et le collagène oblitèrent ensuite les voies respiratoires.(169)

Nos résultats en immunofluorescence ont montré une proportion plus élevée de cellules épithéliales apoptotiques dans les échantillons CLAD par rapport aux témoins, principalement dans les échantillons où le degré d'inflammation autour des voies aériennes était plus élevé, en particulier dans les BOS. Ce phénomène affectait de manière importante les cellules club, avec un degré d'apoptose plus sévère par rapport aux autres types de cellules épithéliales. Nous avons observé une corrélation négative entre le degré d'obstruction fibreuse des voies respiratoires et la fréquence des cellules club dans l'épithélium des petites voies respiratoires, ce qui correspond aux observations antérieures de réduction des cellules de club dans le CLAD.(81,169) Nos données ont confirmé la plus grande susceptibilité à l'apoptose des cellules de club, ce qui pourrait faire partie des mécanismes conduisant au CLAD.

### Conclusion

Cette étude a mis en évidence l'hétérogénéité des lésions affectant les différents compartiments des greffons pulmonaires chez 20 patients ayant subi une reTP pour CLAD, avec des variations importantes inter- et intra-individuelles. Nos résultats confirment un chevauchement histologique significatif entre BOS et RAS. Cela pourrait indiquer une physiopathologie commune. L'étendue et la localisation des atteintes histologiques pourraient influencer l'orientation vers un phénotype clinique de CLAD. Notre score de classement semi-quantitatif pourrait être utile pour les futures évaluations histologiques du CLAD, permettant une meilleure collaboration et une validation croisée entre les centres de transplantation pulmonaire.

Ce travail a été soumis au *Journal of Heart and Lung Transplantation*, et est en cours de révision.

## **Spectrum of chronic lung allograft dysfunction pathology in human lung transplantation**

*Benjamin Renaud-Picard<sup>1,2,3</sup>, Gregory Berra<sup>1,2,4</sup>, David Hwang<sup>5</sup>, Ella Huszti<sup>6</sup>, Ei Miyamoto<sup>1,2</sup>, Gerald J Berry<sup>7</sup>, Prodipto Pal<sup>8</sup>, Stephen Juvet<sup>1,2,9</sup>, Shaf Keshavjee<sup>1,2,9</sup>, Tereza Martinu<sup>1,2,9</sup>*

<sup>1</sup>Latner Thoracic Research Laboratories, Toronto General Hospital Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

<sup>2</sup>Toronto Lung Transplant Program, Ajmera Transplant Centre, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada

<sup>3</sup>INSERM Unité mixte de recherche 1260, Regenerative nanomedicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Service de pneumologie, Département de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Genève, Geneva, Switzerland

<sup>5</sup>Department of Pathology, Sunnybrook Hospital, Toronto, Ontario, Canada

<sup>6</sup>Biostatistics Research Unit, University Health Network, Toronto, ON, Canada

<sup>7</sup>Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

<sup>8</sup>Laboratory Medicine Program, University Health Network, Toronto, ON, Canada

<sup>9</sup>University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

### **Corresponding author:**

Dr Tereza Martinu  
Toronto General Hospital  
585 University Ave, 9-MARS-9092  
Toronto, ON, M5G 2N2  
Tel: [416-340-4800](tel:416-340-4800)  
Fax: [416-340-3252](tel:416-340-3252)  
E-mail address: [Tereza.Martinu@uhn.ca](mailto:Tereza.Martinu@uhn.ca)

### Word count

Abstract: 249/250

Manuscript: 3000/3000

## ABSTRACT (249/250)

**Background:** Long-term survival after lung transplantation (LTx) remains limited by Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD), which includes two main phenotypes: bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and restrictive allograft syndrome (RAS), with possible overlap. We aimed to detail and quantify pathological features of these CLAD subtypes.

**Methods:** Peripheral and central paraffin-embedded explanted lung samples were obtained from 20 consecutive patients undergoing a second LTx for CLAD, from 3 lobes. Thirteen lung samples, collected from non-transplant lobectomies or donor lungs, were used as controls. Blinded semi-quantitative grading was performed to assess airway fibrotic changes, parenchymal and pleural fibrosis, as well as epithelial and vascular abnormalities.

**Results:** CLAD lung samples had higher scores for all airway- and lung-related parameters compared to controls. There was a notable overlap in pathological scores between BOS and RAS, with a wide range of scores in both conditions. Parenchymal and peri-vascular fibrosis scores were significantly higher in RAS compared to BOS ( $p=0.003$  for both). We observed a significant positive correlation between the degree of inflammation around each airway, the severity of epithelial changes and airway fibrosis. Immunofluorescence staining demonstrated a trend towards a lower frequency of club cells in CLAD, and a higher frequency of apoptotic club cells in BOS samples ( $p=0.01$ ).

**Conclusions:** Our results confirmed that bronchiolitis obliterans and parenchymal fibrosis can coexist to different degrees of severity in both patients with RAS and BOS. Our semi-quantitative grading score showed a high inter-reader reliability and may be useful for future CLAD pathological assessments, allowing for better collaboration and cross-validation between centers.



## **ABBREVIATIONS**

BOS: Bronchiolitis obliterans syndrome

CCSP: Club cell secretory protein

CF: Cystic fibrosis

CLAD: Chronic lung allograft dysfunction

EF: Epithelial flattening

EH: Epithelial hyperplasia

GERD: Gastroesophageal reflux disease

HE: Hematoxylin & Eosin

IAFE: Intra-alveolar fibroelastosis

ICC: Interclass correlation coefficient

IF: Immunofluorescence

LA: Lymphoid aggregates

LLL: Left lower lobe

LTx: Lung transplantation

LUL: Left upper lobe

OAF: Obliterative airway fibrosis

PAF: Peri-airway fibrosis

PF: Parenchymal fibrosis

PLF: Pleural fibrosis

PFT: Pulmonary function test

PLF: Pleural fibrosis

IAFE: Intra-alveolar fibroelastosis

RAS: Restrictive allograft syndrome

RUL: Right upper lobe

TLO: Tertiary lymphoid organs

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase DUTP nick end labeling

## **1. INTRODUCTION**

Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is the main limitation to long-term survival after lung transplantation (LTx).(1–3). CLAD pathophysiology remains poorly understood despite recently acquired knowledge and consensus publications.(4,5)

Over the last two decades, two main CLAD phenotypes have been described, bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and restrictive allograft syndrome (RAS).(4,6–8) The primary histological feature of BOS is bronchiolitis obliterans (BO), a fibrotic obliterative lesion of small airways. The main histological feature of RAS is pleuro-parenchymal or intra-alveolar fibro-elastosis (IAFE), in addition to other pathological patterns such as diffuse alveolar damage, organizing pneumonia, and BO.(5,9) The 2019 international guidelines on CLAD also introduced the mixed and undefined CLAD phenotypes.(4)

Several studies have shown that there may be significant histological overlap between the different CLAD phenotypes.(10–13) These data suggest that CLAD encompasses a wide spectrum of pathologies, where BOS and RAS represent its extreme forms. A similar concept was illustrated in a prior animal study from our group (14), describing a wide range of histological features of CLAD in a murine single LTx model of chronic rejection. In this study, a histological scoring system was developed for obliterative airway fibrosis (OAF), peri-airway fibrosis (PAF), parenchymal fibrosis (PF), as well as epithelial and vascular changes, reminiscent of features seen in human CLAD. The study highlighted that CLAD features were not an all-or-nothing phenomenon in this model, but rather a spectrum of disease.

Airway fibrosis, mainly BO, is the main histological characteristic of CLAD overall. After LTx, the airway epithelium is heavily involved in interactions with the immune system, as well as in tissue repair and remodeling.(15,16) Repeated inflammatory insults lead to damage of the epithelial barrier, associated with decreased epithelial regeneration and reduced secretion of protective proteins.(17) This accumulation of epithelial injuries is likely what leads to fibrosis, in a common final pathway to CLAD.(17–21). There are several types

of airway epithelial cells. The most common types include ciliated cells, mucus-secreting goblet cells, basal cells and club cells. Club cells are non-ciliated secretory epithelial cells, that can function as progenitor cells and produce the anti-inflammatory club cell secretory protein (CCSP), helping to maintain airway homeostasis.(22–24) Reductions in club cells and CCSP have been described in association with CLAD.(17) The exact mechanisms of injury to airway epithelial cells, specifically to club cells, in CLAD have not been fully characterized.

In the present study, we aimed to confirm the relevance of our semi-quantitative pathological grading system in human CLAD lungs and to highlight the histopathological overlap existing between human BOS and RAS.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Sample selection and preparation**

The study was approved by the University Health Network Research Ethics Board (#15-9531). Patient information was deidentified and stored in the Toronto Lung Transplant Program (TLTP) Database (#11-0170) and samples were collected as part of the TLTP Biobank protocol (#11-0509).

Lung explant samples were collected between 2015 and 2018, at the time of retransplantation from 20 patients who underwent a second LTx for end-stage CLAD at our center. Clinical CLAD management is described in supplemental methods. The CLAD phenotype was adjudicated for each patient at the time of retransplantation and was based on obstruction and/or restriction on PFT and presence or absence of fibrosis-like opacities on imaging, as previously described.(25) Lung biopsies were collected from four different locations for each patient: one from the right upper lobe (RUL), two from the left upper lobe (LUL), and one from the left lower lobe (LLL) (figure 1). For each location, one sample was collected from the central area of the lung and one from the peripheral area. In addition, to serve as control samples, 13 lung biopsies were collected from patients undergoing lobectomy for suspected cancer (n=9) or from excess donor lung tissue obtained at the end of cold ischemic time during LTx (n=4) (1 sample/patient). Lung tissue was formalin-fixed and

paraffin-embedded, sectioned, and stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) or Elastic-Trichrome stains (see supplemental methods for details).

## 2.2 Pathology grading score

A semi-quantitative scoring system was developed by BRP, TM, and DH in order to assess CLAD-related histological parameters, based on the previously published schema used for a mouse LTx model.(14) Each sample was scored in a blinded fashion by BRP. Approximately 10% of cases, deemed to be representative, were reviewed with TM and DH while developing the scoring system. Additionally, to formally assess inter-rater reliability, a sub-cohort of 27 samples was randomly selected, ensuring equal distribution between sample groups and a minimum of one airway per sample, for independent scoring by GJB, in addition to BRP.

Histological features graded per airway and samples are summarized in table 1 and figure 2. All the details are described in supplemental methods.

Acute cellular rejection A-grade and B-grade were scored for each slide using the criteria from the International society for heart and lung transplantation (ISHLT). (26)

To obtain a final score for each sample, per-airway scores were averaged. To obtain a final score for each patient, scores of all 8 samples (central and peripheral for RUL, 2 LUL, and LLL) were averaged.

## 2.3 Immunofluorescent staining and cell quantification

Immunofluorescent (IF) staining for CCSP, Pankeratin (all epithelial cells), Muc-5AC (goblet cells) and apoptosis was performed on 2 slides (1 central and 1 peripheral) selected for each of the 20 CLAD patients, and 10 slides of control lung samples. See supplemental methods for details.

## 2.4 Statistical analysis

The Mann–Whitney U test was used to compare two groups and comparison of proportions was made using the Chi-square test. Multiple groups were compared using the Kruskal–Wallis test, followed by, when appropriate, a pairwise comparison analysis using Mann-Whitney test to compare two specific groups (BOS to control, RAS to control, and RAS to BOS). A Wilcoxon matched-pairs rank test was used to compare paired scores of central and peripheral samples. Spearman's R test was used to assess the correlation between parameters. A two-way ANOVA analysis was used to assess the impact of lobe and CLAD phenotype, as well as the interaction term, on histological grades. If a significant interaction was found, a one-way ANOVA was performed to assess the lobe effect in each CLAD phenotype separately. To compare grading results between two observers, we determined an interclass correlation coefficient (ICC) using a one-way random model with agreement definition and 95% confidence interval. Statistical significance was defined as a two-tailed P value  $\leq 0.05$ . Most analyses were conducted using Graphpad Prism version 9 for Windows (GraphPad, La Jolla, USA). ICC analyses were performed using R statistical software version 3.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## 3. RESULTS

### 3.1 Study population

Samples were obtained from 12 patients with BOS, 7 patients with RAS and one with mixed phenotype. RAS and mixed patients were combined in the RAS category for all analyses. Patient characteristics are summarized in table 2 and did not differ significantly between RAS and BOS. Patients included in the control group were older compared to the CLAD patients ( $p=0.003$ ).

### 3.2 Development and validation of a histopathological scoring system for CLAD

The histopathological scoring system is summarized in table 1. Representative examples of the different grades of histopathological scores for PAF, OAF, PF, PLF, EH, EF,

peri-airway inflammation, LA, vascular fibrosis, and endothelialitis are shown in figure 2. Twenty-seven samples (5 normal, 11 BOS and 11 RAS, including 8 central and 3 peripherals for each CLAD phenotype) were randomly selected and scored independently by BRP and GJB. Interclass correlation coefficients (ICC) for PAF, OAF, PF, PLF, EH and EF are shown in table 3. The inter-rater agreement was “good” for PAF (ICC 0.60 to 0.74) and “excellent” for all other parameters (ICCs 0.75 to 1.0).

### 3.3 CLAD histopathological scoring applied to explanted CLAD lungs and controls

#### 3.3.1 Airway fibrosis

PAF (Figures 2A and 3A) and OAF (Figure 2A and 3B) were significantly higher in both BOS ( $p=0.002$  and  $p<0.0001$ , respectively) and RAS ( $p=0.0008$  and  $p<0.0001$ , respectively) compared to control samples. PAF scores were higher in RAS compared to BOS ( $p=0.05$ ) (Figure 3A), while OAF was similar between BOS and RAS (Figure 3B). The variability of OAF scores between CLAD patients appeared to be greater than for PAF scores (Figures S1A and S1B).

#### 3.3.2 Parenchymal and pleural fibrosis

Lung PF scores were significantly higher in RAS compared to controls ( $p<0.0001$ ) and BOS ( $p=0.003$ ) (Figure 3C) and higher in BOS compared to controls ( $p=0.02$ ) (Figure 3C). There was a large heterogeneity in PF severity between patients in the RAS group (Figure S1C). For every sample with  $PF \geq 20\%$ , we report the predominant PF patterns (figure S2B). Most PF samples exhibited IAFE, diffuse alveolar septal fibrosis, or a combination of both (Figures 2A and S2A). The degree of pleural fibrosis was also highly variable between patients, with significantly higher scores in BOS and RAS compared to controls ( $p<0.0001$ ) and higher scores in RAS compared to BOS ( $p=0.09$ ) (Figures 2A and 3D).

### 3.3.3 Epithelial changes

EH (Figures 2B and 3E) and EF (Figures 2B and 3F) scores were significantly higher in BOS ( $p=0.003$  and  $p<0.0001$ , respectively), and RAS ( $p=0.0003$  and  $p<0.0001$  respectively) compared to controls, without any significant difference between CLAD phenotypes. Changes within the bronchial epithelium such as hyperplasia or flattening were also highly heterogenous between patients in the CLAD groups, and from one biopsy to another and even from one airway to another within the same biopsy (Figures S1D and S1E).

### 3.3.4 Inflammation

No difference was observed between BOS and RAS, but both had higher lymphocytic bronchiolitis compared to controls (Figure 3I). We also assessed the presence of overall inflammatory cell infiltration around each airway. Peri-airway inflammation was significantly higher in patients with BOS ( $p=0.001$ ) and RAS ( $p=0.001$ ) compared to controls, with no significant difference between BOS and RAS (Figures 2C,D and 3G). We observed that the number of LA per  $\text{cm}^2$  for each biopsy was significantly higher in BOS ( $p=0.04$ ) and RAS ( $p=0.01$ ) than in control samples (Figures 2E and 3H), but not different between BOS and RAS.

### 3.3.5 Vascular changes

No difference was observed between BOS and RAS, but both had more frequent perivascular inflammatory infiltrates compared to controls (Figure 3L). The degree of vascular fibrosis was graded and found to be significantly higher in RAS patients, compared to both BOS ( $p=0.003$ ) and controls ( $p=0.009$ ). (Figures 2F,G and 3J). No significant difference in vascular fibrosis was observed between BOS and control samples. Endothelialitis scores were significantly higher in RAS compared to controls ( $p=0.02$ ) and with a trend to higher values compared to BOS samples ( $p=0.09$ ) (Figures 2H,I and 3K).

### 3.4 Correlation between airway pathology scores

Fibrosis parameters had a strong correlation with each-other. There was a significant positive correlation between peri-airway inflammation and PAF, OAF, EH ( $p < 0.0001$  for all), whereas a significant negative correlation existed between peri-airway inflammation and EF ( $p = 0.01$ ). Airway fibrosis-related parameters (PAF and OAF) were also significantly related to epithelial hyperplasia ( $p < 0.0001$  for both) (Figure 4).

### 3.5 Assessment of epithelial cell composition and apoptosis in CLAD using immunostaining

We aimed to further characterize airway epithelial cells through immunostaining. Some cells showed double staining for Muc-5AC and CCSP (Figure 5A-C). The frequency of CCSP+ club cells among all epithelial cells was higher in the controls [11.4% (0.7–29.3)] compared to BOS or RAS [1.3% (0.4–3.8) and 0.4% (0.21–14.9) respectively ( $p = 0.07$ )], without any difference observed between the two CLAD phenotypes (Figure 5D). Meanwhile, the frequency of goblet cells among all epithelial cells did not differ between the three groups (Figure 5E). A trend toward a negative correlation was observed between the frequency of club cells and OAF ( $p = 0.09$ ) (Figure 5F) and EF ( $p = 0.09$ ) (Figure 5G). The frequency of goblet cells had a significant positive correlation with EH ( $p = 0.0009$ ) (Figure 5H) and a significant negative correlation with EF ( $p = 0.03$ ) (Figure 5I).

We also aimed to assess whether the frequency of apoptotic epithelial cells varied between samples (Figure 6A-C). The total frequency of TUNEL+ cells was lower in controls [0.60% (0.3–4.6)] compared to BOS or RAS [5.76% (0.6–40.5) and 5.02% (2.7–11.1) respectively ( $p = 0.08$ )] (Figure 6D), without any difference between the two CLAD phenotypes. We observed high frequencies of apoptotic epithelial and club cells in several CLAD patients, especially with BOS phenotype. No significant difference was observed between the three groups regarding the frequency of apoptotic epithelial cells among all epithelial cells (Figure 6E). However, apoptotic club cells among all club cells were significantly more frequent in BOS samples compared to controls [12.86% (2.1–76.6) versus



1.57% (0.1-5.8); p=0.01], without any difference between RAS and controls or RAS and BOS (Figure 6F).

#### 4. DISCUSSION

We performed a detailed analysis of the airway fibrotic changes in CLAD, focusing on collagen deposition around and within the airways. PAF was fairly homogeneous between samples and similar between BOS and RAS. For OAF, which can be equated with BO, the results were more variable, especially for BOS, with the percentage of airways affected by fibrous obstruction ranging from 4.4 to 25.6% between samples. Verleden et al. (27) have also observed that fibrotic obstruction often affects the airways incompletely, with obstructive lesions alternating with relatively normal and open airways. Our observation also confirms prior publications that showed BO being present in both BOS and RAS samples, in a heterogenous distribution, sparing large areas of the lung.(27–29)

As expected, compared to BOS, the percentage of parenchymal fibrosis was significantly higher in RAS, but varying greatly from one sample to another. It is interesting to note that significant PF was seen in BOS patients as well, particularly in one patient with an average PF percentage of 25.6%. In the patients with significant PF>20%, the most common pattern was IAFE, sometimes associated with areas of diffuse alveolar septal fibrosis (which resembled non-specific interstitial pneumonia in some locations). Consistent with prior published reports of pleural fibrosis and radiological pleural thickening in RAS, pleural fibrosis was also seen to a larger extent in the RAS lungs in our cohort, even though this difference did not achieve statistical significance.(8)

Regarding morphological epithelial changes, no significant differences were observed between BOS and RAS, although we did observe significant heterogeneity between patients and areas of the lung. Interestingly, we observed a significant positive correlation between the degree of inflammation around each airway, the severity of epithelial changes and airway

fibrosis. Previous studies have shown that small airway fibrotic lesions in CLAD lung tissue are associated with inflammation, especially acute rejection.(29) This supports the working hypothesis that the pathophysiology of CLAD involves a progression from inflammation to epithelial damage to fibrosis.(28) Indeed, epithelial cell injury is thought to be a key event in the development of CLAD and may trigger exaggerated wound healing and epithelial-to-mesenchymal transition, where mesenchymal cells subsequently obliterate the airway.(30) Our results showed a higher proportion of apoptotic club cells in BOS, mostly in samples where the degree of peri-airway inflammation was greater. Club cells are involved in bronchial epithelium regeneration and appear to be severely affected by the repeated inflammatory insults occurring after LTx. Consistent with this, we observed a negative correlation between the degree of fibrous airway obstruction and the frequency of club cells within the epithelium of the small airways, consistent with prior observations of club cell reduction in CLAD.(17,30) A greater susceptibility to apoptosis of club cells may be part of mechanisms leading to CLAD.

The degree of inflammation within samples was also explored by measuring peri-airway infiltrates, A-grade and B-grade rejection, without any difference between BOS and RAS. Lymphoid aggregates (LA) or tertiary lymphoid organs have been previously described in lung allografts and may play an immunoregulatory or pathogenic role in transplantation.(31–37) In our study, the number of LA per cm<sup>2</sup> was significantly higher in CLAD compared to controls, but not different in BOS vs. RAS.

Specific vascular injuries are often observed in allograft lung samples from CLAD patients, and less frequently in CLAD-free LTx patients.(13,29) We observed that vascular changes, such as vascular fibrosis and endothelialitis, were more frequently observed in RAS phenotype than in BOS. Chronic vascular rejection has been described in the ISHLT rejection pathology classification.(38) A more intense inflammatory response has been associated with RAS in some studies, consistent with a trend towards higher A-grades in RAS in our study: this vascular inflammation may be the cause of a higher degree of

vascular injury in RAS.(32,39) Additionally, Ofek et al.(29) described acute and organizing thromboemboli in RAS lung biopsies, suggesting a role for vascular injury in the pathophysiology of IAFE.

The strengths of this study include systematic and standardized phenotyping of CLAD patients at the time of lung explantation, as well as the relatively short period of time over which samples were collected, with little variations in therapeutic and surgical management. The inclusion of control non-graft lungs is also helpful to compare CLAD features to a baseline. Another important feature is the validation of our grading score for human lungs with satisfactory ICC results between two independent raters. This histological tool may be useful to assess chronic allograft lung injuries across LTx centers or research groups. Conversely, the current results should be interpreted considering some limitations. This was a descriptive, retrospective, single-center study. Despite a well-defined multi-biopsy strategy for the lung sample collection in each patient recruited, the representativity of our samples of all the inflammatory and fibrotic processes occurring within entire lungs may still be limited. In some samples, the histological assessment may have been over- or underestimated for certain parameters, for instance with epithelial hyperplasia and flattening, where a tangential cut could have been made across the airway.

In conclusion, this study highlights the inter- and intra-patient heterogeneity of injuries affecting the different compartments of CLAD lung allografts and confirm a significant histological overlap between well-defined BOS and RAS. This may indicate a common pathophysiology, while the extent and location of histological changes or injuries may determine the clinical phenotype. This is the first study showing a grading system for fibrotic features in human lung allograft, with a high inter-reader reliability. Our detailed airway epithelial characterization points to an important role of airway injury in CLAD pathogenesis, which warrants further investigation.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Toronto Lung Transplant Program Database team for help with clinical data extraction and the Toronto Lung Transplant Program Biobank team for help with sample retrieval. They would also like to thank all the staff, fellows and students who helped with collection and processing of the human CLAD and control lungs, often at odd hours of the night: Hisashi Oishi, Jussi Tikkanen, Tatsuaki Watanabe, Yohei Taniguchi, Alexander Tigert, Liran Levy, Allen Duong, Matthew White, Mitsuaki Kawashima, Akihiro Takahagi, Kristen Boonstra.

## **Funding sources**

This research was supported by a “Fondation du souffle” research grant (BRP), a “Le nouveau souffle” research grant (BRP), and a Cystic Fibrosis Foundation grant (to TM and SJ).

## **Disclosure**

BRP has received a research grant from Elivie.

TM has received CCSP-related research material from APCBio Innovations Inc and collaborates with Trove Therapeutics Inc. These relationships are not directly related to this study. Otherwise, the authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

1. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2014 Oct;33(10):1009–24.
2. Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, 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*. 2017 Oct;36(10):1047–59.
3. Kulkarni HS, Cherikh WS, Chambers DC, Garcia VC, Hachem RR, Kreisel D, 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*. 2019 Jan;38(1):5–16.
4. Verleden GM, Glanville AR, Lease ED, Fisher AJ, Calabrese F, Corris PA, 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 May;38(5):493–503.
5. Glanville AR, Verleden GM, Todd JL, Benden C, Calabrese F, Gottlieb J, et al. Chronic lung allograft dysfunction: Definition and update of restrictive allograft syndrome-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2019 May;38(5):483–92.
6. 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 Feb;33(2):127–33.
7. Sato M. Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome after lung transplantation: why are there two distinct forms of chronic lung allograft dysfunction? *Ann Transl Med*. 2020 Mar;8(6):418.
8. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2011 Jul;30(7):735–42.
9. Paraskeva M, McLean C, Ellis S, Bailey M, Williams T, Levvey B, et al. Acute fibrinoid organizing pneumonia after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jun 15;187(12):1360–8.
10. Verleden SE, Von Der Thüsen J, Van Herck A, Weynand B, Verbeken E, Verschakelen J, et al. Identification and characterization of chronic lung allograft dysfunction patients with mixed phenotype: A single-center study. *Clin Transplant*. 2020 Feb;34(2):e13781.
11. Byrne D, Nador RG, English JC, Yee J, Levy R, Bergeron C, et al. Chronic Lung Allograft Dysfunction: Review of CT and Pathologic Findings. *Radiol Cardiothorac Imaging*. 2021 Feb;3(1):e200314.
12. Towe C, Chester Ogborn A, Ferkol T, Sweet S, Huddleston C, White F, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome is not specific for bronchiolitis obliterans in pediatric lung transplant. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2015 Apr;34(4):516–21.
13. Vanstapel A, Verleden SE, Verbeken EK, Braubach P, Goos T, De Sadeleer L, et al. Beyond Bronchiolitis Obliterans: In-Depth Histopathologic Characterization of Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplantation. *J Clin Med*. 2021 Dec 25;11(1):111.

14. Martinu T, Oishi H, Juvet SC, Cypel M, Liu M, Berry GJ, et al. Spectrum of chronic lung allograft pathology in a mouse minor-mismatched orthotopic lung transplant model. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2019 Jan;19(1):247–58.
15. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:172–90.
16. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Sep 15;5(7):772–7.
17. Kelly FL, Kennedy VE, Jain R, Sindhvani NS, Finlen Copeland CA, Snyder LD, et al. Epithelial clara cell injury occurs in bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2012 Nov;12(11):3076–84.
18. Ward C, Forrest IA, Murphy DM, Johnson GE, Robertson H, Cawston TE, et al. Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax*. 2005 Oct;60(10):865–71.
19. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, Johnson GE, Gorowiec MR, Ward C, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax*. 2009 Sep;64(9):770–7.
20. Weigt SS, DerHovanessian A, Wallace WD, Lynch JP, Belperio JA. Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013 Jun;34(3):336–51.
21. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *Chest*. 2016 Jul;150(1):219–25.
22. Stripp BR, Reynolds SD. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Apr 15;5(3):328–33.
23. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jan;42(1):1–4.
24. Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *Eur Respir J*. 1994 Sep;7(9):1690–706.
25. Levy L, Huszti E, Renaud-Picard B, Berra G, Kawashima M, Takahagi A, et al. Risk assessment of chronic lung allograft dysfunction phenotypes: Validation and proposed refinement of the 2019 International Society for Heart and Lung Transplantation classification system. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2020 Aug;39(8):761–70.
26. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, 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*. 2007 Dec;26(12):1229–42.
27. Verleden SE, Vasilescu DM, Willems S, Ruttens D, Vos R, Vandermeulen E, et al. The site and nature of airway obstruction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Feb 1;189(3):292–300.
28. Glanville AR, Benden C, Bergeron A, Cheng GS, Gottlieb J, Lease ED, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome after lung or haematopoietic stem cell transplantation: current management and future directions. *ERJ Open Res*. 2022 Jul;8(3):00185–2022.
29. Ofek E, Sato M, Saito T, Wagnetz U, Roberts HC, Chaparro C, et al. Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2013 Mar;26(3):350–6.

30. Levy L, Tigert A, Huszti E, Saito T, Mitsakakis N, Moshkelgosha S, et al. Epithelial cell death markers in bronchoalveolar lavage correlate with chronic lung allograft dysfunction subtypes and survival in lung transplant recipients-a single-center retrospective cohort study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2019 Sep;32(9):965–73.
31. Koenig A, Thauinat O. Lymphoid Neogenesis and Tertiary Lymphoid Organs in Transplanted Organs. *Front Immunol*. 2016;7:646.
32. Vandermeulen E, Lammertyn E, Verleden SE, Ruttens D, Bellon H, Ricciardi M, et al. Immunological diversity in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction: a comprehensive immunohistochemical analysis. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2017 Feb;30(2):134–43.
33. Hsiao HM, Li W, Gelman AE, Krupnick AS, Kreisel D. The Role of Lymphoid Neogenesis in Allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2016 Apr;16(4):1079–85.
34. Thauinat O, Graff-Dubois S, Fabien N, Duthey A, Attuil-Audenis V, Nicoletti A, et al. A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int*. 2012 Jan;81(2):207–19.
35. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol*. 2011 Jan;41(1):89–96.
36. Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011 Mar;11(3):429–38.
37. Sato M, Hirayama S, Hwang DM, Lara-Guerra H, Wagnetz D, Waddell TK, et al. The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jun 1;182(11):7307–16.
38. Greenland JR, Jones KD, Hays SR, Golden JA, Urisman A, Jewell NP, et al. Association of large-airway lymphocytic bronchitis with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Feb 15;187(4):417–23.
39. Bos S, Filby AJ, Vos R, Fisher AJ. Effector immune cells in chronic lung allograft dysfunction: A systematic review. *Immunology*. 2022 May;166(1):17–37.
40. Levy L, Huszti E, Tikkanen J, Ghany R, Klement W, Ahmed M, et al. The impact of first untreated subclinical minimal acute rejection on risk for chronic lung allograft dysfunction or death after lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2020 Jan;20(1):241–9.
41. Berra G, Farkona S, Mohammed-Ali Z, Kotlyar M, Levy L, Clotet-Freixas S, et al. Association between the renin-angiotensin system and chronic lung allograft dysfunction. *Eur Respir J*. 2021 Oct;58(4):2002975.

## **Supplemental methods:**

### Clinical management of CLAD

The clinical management of CLAD during this time included conversion from cyclosporine to tacrolimus, a initiation of azithromycin, treatment of gastroesophageal reflux, treatment of infections, bronchodilators and inhaled corticosteroids, and referral for retransplantation when appropriate.(170,171)

### Details for histological gradings

Histological features graded per airway are summarized in table 1 and figure 2 and include the following: Peri-airway fibrosis (PAF) quantifies the extent of fibrosis around each airway, graded from 0 to 4 (none to severe), depending on its severity and involvement of alveolar or vascular structures. An obliterative airway fibrosis (OAF) score is assigned to each airway based on the percentage of fibrotic obliteration of the lumen, graded from 0 to 4 (none to severe). Epithelial hyperplasia (EH) is defined by an increased height of columnar epithelial cells, cell crowding, and prominent secretory granules/mucin. For each airway, the percentage of evaluable epithelium affected by hyperplasia was graded from 0 to 3 (none to severe). Epithelial flattening (EF) refers to the percentage of evaluable epithelium affected by flattening, graded from 0 to 3 (none to severe). Peri-airway inflammation is defined by the presence of inflammatory cells adjacent to each airway.

Histological features graded per sample are summarized in table 1 and figure 2 and include the following: Parenchymal fibrosis (PF) is an estimate of the percentage of lung parenchyma affected by fibrosis. Pleural fibrosis (PLF) was assessed for peripheral samples only and was based on the thickest visible portion of the pleura and graded from 0 to 4 (from 1-1.5X the usual thickness to 4x the usual thickness); normal pleura was defined as <50µm. Lymphoid aggregates (LA) were quantified based on the number of LA per sample, adjusted to the total surface area of each sample (number of LA/mm<sup>2</sup>). Endothelialitis was defined by intimal thickening with inflammatory cells in subendothelial space. For each sample, the percentage of vessels affected by endothelialitis was graded from 0 to 4 (none to severe).



Vascular fibrosis relates to the percentage of vessels per sample affected by vascular fibrosis, graded from 0 to 4 (none to severe).

#### Lung tissue processing

Lung tissue was inflated with and submerged in 10% formalin for 24 hours, followed by submersion in 70% ethanol for another 24 hours, followed by paraffin embedding. 4µM sections of paraffin-embedded lung tissue were placed on slides and stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) or Elastic-Trichrome stains.

#### Immunofluorescent staining and cell quantification

4µM sections of formalin-fixed paraffin-embedded samples were placed on slides and immediately stored at -80°C for later immunostaining. After defrosting, slides were hydrated through a series of xylene and progressive alcohol baths to water. Antigen retrieval was performed using Antigen Unmasking Solution (1:10) in citrate buffer solution (Antigen retrieval pH=6 – Dako, Santa Clara, CA, USA) in the autoclave for 15 minutes 121-degree steam mode to induce epitope retrieval. A Dako pen was used to encircle the tissue. Blocking was performed with Dako protein block overnight in humid chamber. Immunostaining was performed with purified primary antibodies: anti-Pankeratin (1:100, rabbit monoclonal, ab9377, Abcam, Cambridge, UK) for epithelial cells, anti-CCSP (1:200, rat monoclonal, MAB4218, R&D Systems, Minneapolis, MN USA) for club cells, anti-Muc-5AC (1:100, mouse monoclonal, ab3649, Abcam, Cambridge, UK) for goblet cells, diluted in blocking solution (2% bovine serum albumin (BSA) in Superblock overnight 4°C), and *in situ* cell death detection kit for Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining (TMR red, Sigma Roche, Manheim, Germany) to detect apoptotic cells. After IF staining, the entire slide was digitized at high resolution with the Zeiss AxioScan at 20X power. For IF quantification, the Halo software was used (Indica Labs, Albuquerque, New Mexico, USA) for automated quantification of positive cells (CytoNuclear FL v1.4 algorithm). The algorithm identified cells by their nucleus (DAPI) and each antibody

fluorescence was determined in a pre-defined radius from the nucleus. All parameters were kept constant for quantitative comparison between slides, using a medium-high threshold for positive staining to avoid false positives that could be related to uneven background fluorescence from slide to slide. We applied the algorithm to all the airways for each sample, selected as specific regions of interest.

## Supplemental results

### Impact of the sample original location on histopathological scores

- *Central versus peripheral sample origin*

We compared the grading results obtained from paired central and peripheral samples collected for all CLAD patients, to assess whether the depth of sampling may impact the grading values. PAF average values were significantly lower in peripheral samples ( $p=0.009$ ) (**Figure S3A**); no significant difference was observed in OAF (**Figure S3B**) and PF (**Figure S3C**) scores, although there was heterogeneity within individual patients. Regarding the epithelial-related parameters, EH was significantly lower in the peripheral samples ( $p=0.01$ ) (**Figure S3D**) while EF was significantly higher in the peripheral samples ( $p=0.03$ ) (**Figure S3E**).

- *Lobe-specific origin*

We aimed to assess whether the lobe of origin of the samples affected the pathology scores, while also adjusting for CLAD phenotype. For this analysis, grades from left upper lobe 1 (LUL1) and 2 (LUL2) were averaged. We observed a significant lobe effect with lower values of OAF ( $p=0.004$ ) (**Figure S4B**), EH ( $p=0.0005$ ) (**Figure S4D**) and higher values of EF ( $p<0.0001$ ) (**Figure S4E**) within the upper lobes. Higher inter-lobe heterogeneity in PAF ( $p=0.02$ ) (**Figure S4A**) and PF (**Figure S4C**) was observed in RAS samples compared to BOS. To determine whether the lobe location had different effects on the gradings depending on phenotype, a one-way ANOVA test was performed for PF and EF values, for which a significant interaction between CLAD phenotype and lobe was previously found. A significant lobe effect on EF grades was observed in RAS samples only ( $p=0.001$ ) and not in BOS.

- *Intra-lobe consistency*

We also compared scores in samples obtained in adjacent locations within the same lobe, LUL1 and LUL2. We confirmed the absence of any significant consistent differences in pathology scores between the samples collected in LUL1 and LUL2 for PAF, OAF, PF, EH

and EF (**figure S5**). However, in some specific cases, the two LUL samples were very dissimilar.

In summary, our analyses in this section showed that airway fibrosis and epithelial changes can vary based on the depth of sampling or lobe of sampling, while histopathological scores were consistent when assessing adjacent samples within a similar location of the same lobe.



## TABLES

| HISTOLOGIC FEATURES (GRADED PER AIRWAY)  | SCORE | SEVERITY | FEATURES  |
|--|-------|----------|---|
| <b>Peri-Airway Fibrosis (PAF) (scored per airway)</b>  | 0     | None     | No fibrous tissue   |
|  | 1     | Minimal  | Fibrous tissue within muscle layer                                    |
|  | 2     | Mild     | Moderate fibrous tissue extension beyond muscle layer, around airway  |
|  | 3     | Moderate | Prominent fibrous tissue extension reaching peri-airway alveoli       |
|  | 4     | Severe   | Extended fibrous tissue, reaching other vascular or airway structures |
| <b>Obliterative-Airway Fibrosis (OAF) (scored per airway)</b>  | 0     | None     | No obliteration   |
|  | 1     | Minimal  | 1-25% of AW lumen obliterated with fibrous tissue                     |
|  | 2     | Mild     | 26-50% of AW lumen obliterated with fibrous tissue                    |
|  | 3     | Moderate | 51-90% of AW lumen obliterated with fibrous tissue                    |
|  | 4     | Severe   | Complete obliteration of AW with fibrous tissue                       |
| <b>Epithelial hyperplasia (EH) (=increased height of columnar epithelial cells, cell crowding, prominent secretory granules/mucin)</b> | 0     | None     | 0% of evaluable epithelium of the AW affected by hyperplasia          |
|  | 1     | Mild     | 1-25%   |
|  | 2     | Moderate | 26-50%  |
|  | 3     | Severe   | >50%  |
| <b>Epithelial flattening (EF)</b>  | 0     | None     | 0% of evaluable epithelium of the AW affected by flattening           |
|  | 1     | Mild     | 1-25%   |
|  | 2     | Moderate | 26-50%  |
|  | 3     | Severe   | >50%  |
| <b>Peri-airway inflammation (per airway)</b>   | 0     |          | No inflammatory cells adjacent to the airway                          |
|  | 1     |          | Inflammatory cells present adjacent to the airway                     |

**Table 1 (part 1)**

| HISTOLOGIC FEATURES (GRADED PER SAMPLE)  |                  |          |  |
|--|------------------|----------|--|
| <b>Parenchymal fibrosis (PF)</b>   | Percent affected |          | Estimation of % of lung parenchyma affected by PF  |
| <b>Pleural fibrosis (PLF), based on thickest visible portion of the pleura</b>               | 0                | None     | Normal pleura (<50 µm)   |
|  | 1                | Minimal  | Denser pleura that is 1-1.5 x the usual thickness (50-199 µm)  |
|  | 2                | Mild     | 2x the usual thickness (200-349 µm)  |
|  | 3                | Moderate | 3x the usual thickness (350-499 µm)  |
|  | 4                | Severe   | 4x the usual thickness (≥500 µm)   |
| <b>Lymphoid aggregates (LA) (total number of LA present per sample)</b>                      |                  |          | Number of LA per sample, adjusted to the surface for each sample (LA/mm <sup>2</sup> )                   |
| <b>Endothelialitis (=intimal thickening with inflammatory cells in subendothelial space)</b> | 0                | None     | No endothelialitis   |
|  | 1                | Minimal  | An occasional blood vessel with infrequent endothelialitis   |
|  | 2                | Mild     | Approximately 10% of blood vessels with mild endothelialitis   |
|  | 3                | Moderate | Approximately 10% of blood vessels with severe endothelialitis or >25% with mild endothelialitis         |
|  | 4                | Severe   | >25% of blood vessels with severe endothelialitis, often accompanied by intravascular fibrin deposition  |
| <b>Vascular fibrosis</b>   | 0                | None     | No vascular fibrosis   |
|  | 1                | Minimal  | An occasional blood vessel with partial fibrosis   |
|  | 2                | Mild     | Approximately 10% of blood vessels with partial fibrosis   |
|  | 3                | Moderate | Approximately 10% of blood vessels with complete fibrosis or >25% of blood vessels with partial fibrosis |
|  | 4                | Severe   | >25% of blood vessels with complete fibrosis   |

**Table 1 (part 2): Proposed grading system to assess the histopathological spectrum in chronic lung allograft dysfunction.** Histological features were graded per airway or per sample. AW: airway, EF: epithelial flattening, EH: epithelial hyperplasia, LA: lymphoid aggregates, OAF: obliterative airway fibrosis, PF: parenchymal fibrosis, PLF: pleural fibrosis.

|  | Control (=13) <sup>#</sup> | BOS (n=12)       | RAS (n=8)         | p value      |
|--|----------------------------|------------------|-------------------|--------------|
| <b>Age at transplant, median (IQR)</b>           | NA                         | 27 (18.5-34)     | 21.5 (19-41.7)    | 0.92         |
| <b>Age at CLAD onset, median (IQR)</b>           | NA                         | 28.5 (18.5-41.5) | 24 (22.2-43.2)    | 0.69         |
| <b>Age at sample collection, median (IQR)</b>    | 62.5 (37-69.5)             | 31 (21.5-45.8)   | 27 (24.5-46.9)    | <b>0.003</b> |
| <b>Patient sex, male (%)</b>                     | 5 (41%)                    | 4 (33%)          | 5 (62.5%)         | 0.42         |
| <b>Sex match (D/R)*:</b>                         |                            |                  |                   | 0.11         |
| M/F  | NA                         | 4                | 0                 |              |
| M/M  | NA                         | 4                | 2                 |              |
| F/F  | NA                         | 4                | 3                 |              |
| F/M  | NA                         | 0                | 2                 |              |
| <b>Smoking history:</b>                          |                            |                  |                   | >0.99        |
| Patient, n (%)                                   | 6 (50%)                    | NA               | NA                |              |
| Donor, n (%)                                     | NA                         | 6 (50%)          | 4 (50%)           |              |
| <b>Native lung disease:</b>                      |                            |                  |                   | 0.72         |
| Pulmonary fibrosis                               | NA                         | 3                | 1                 |              |
| Cystic fibrosis                                  | NA                         | 7                | 6                 |              |
| COPD   | NA                         | 1                | 0                 |              |
| Bronchiectasis                                   | NA                         | 1                | 1                 |              |
| <b>CMV matching (R/D)*:</b>                      |                            |                  |                   | 0.8          |
| R-/D-  | NA                         | 2                | 1                 |              |
| R+/D- or R+/D+                                   | NA                         | 5                | 2                 |              |
| R-/D+  | NA                         | 5                | 4                 |              |
| <b>Donor type:</b>                               |                            |                  |                   | 0.24         |
| DBD  | NA                         | 9                | 8                 |              |
| DCD  | NA                         | 3                | 0                 |              |
| <b>Donor age, mean (SD)</b>                      | NA                         | 39.6 (14.1)      | 39.3 (8)*         | 0.95         |
| <b>Donor lung processed by EVLP, n (%)</b>       | NA                         | 3                | 2                 | >0.99        |
|  |                            |                  |                   |              |
| <b>Transplant related scores:</b>                |                            |                  |                   |              |
| A-score, mean (SD)                               | NA                         | 0.27 (0.32)      | 0.34 (0.15)*      | 0.51         |
| B-score, median (IQR)                            | NA                         | 0 (0-0.38)       | 0 (0-0.5)*        | 0.93         |
| Infection score, median (IQR)                    | NA                         | 0.2 (0.17-0.50)  | 0.38 (0.26-0.43)* | 0.38         |
| <b>Infectious status at the time of explant:</b> |                            |                  |                   | 0.2          |
| No infection, n (%)                              | NA                         | 2 (16.6%)        | 4 (50%)           |              |
| Colonization, n (%)                              | NA                         | 5 (41.7%)        | 1 (12.5%)         |              |
| Active infection, n (%)                          | NA                         | 5 (41.7%)        | 3 (37.5%)         |              |

**Table 2: Clinical characteristics of BOS, RAS, and control patients at the time of sample collection.** An active infection was defined by the presence of compatible clinical symptoms, positive microbiological test, and the prescription of an antimicrobial treatment that was started less than 14 days prior to sample collection. A-score is the sum of all A-grades from the post-transplant course divided by the number of evaluable transbronchial biopsies. B-score is the sum of all B-grades from the post-transplant course divided by the number of evaluable transbronchial biopsies. Infection score is the sum of bronchoscopies that yielded pathogenic organisms divided by all post-transplant bronchoscopies. The Student t-test was applied for statistical evaluation of differences between two groups with a normal distribution and Mann–Whitney U test was applied when distribution was not normal. CLAD: chronic lung allograft dysfunction, BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome. \* Some clinical donor data were missing for one RAS patient who was transplanted at an outside institution. <sup>#</sup> Some data were missing for one control patient.



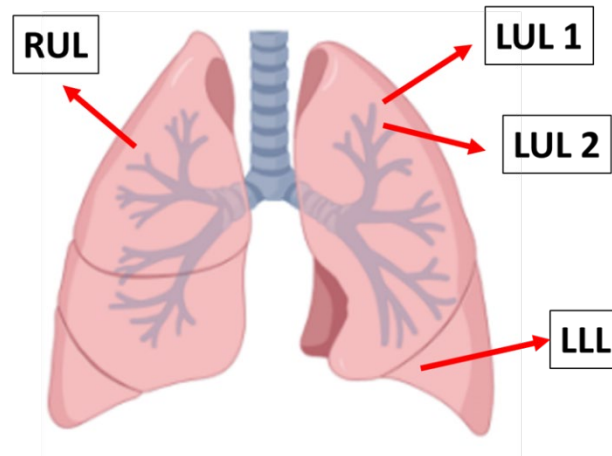
|                              | Intraclass correlation coefficient | 95% CI      | F test  |
|------------------------------|------------------------------------|-------------|---------|
| Peri-airway fibrosis         | 0.636                              | 0.209-0.833 | p<0.001 |
| Obliterative airway fibrosis | 0.751                              | 0.46-0.886  | p<0.001 |
| Parenchymal fibrosis         | 0.923                              | 0.834-0.965 | p<0.001 |
| Pleural fibrosis             | 0.793                              | 0.149-0.952 | p:0.015 |
| Epithelial hyperplasia       | 0.892                              | 0.887-0.977 | p<0.001 |
| Epithelial flattening        | 0.862                              | 0.695-0.938 | p<0.001 |

**Table 3: Inter-observer validation of the use of the histopathological grading system.**

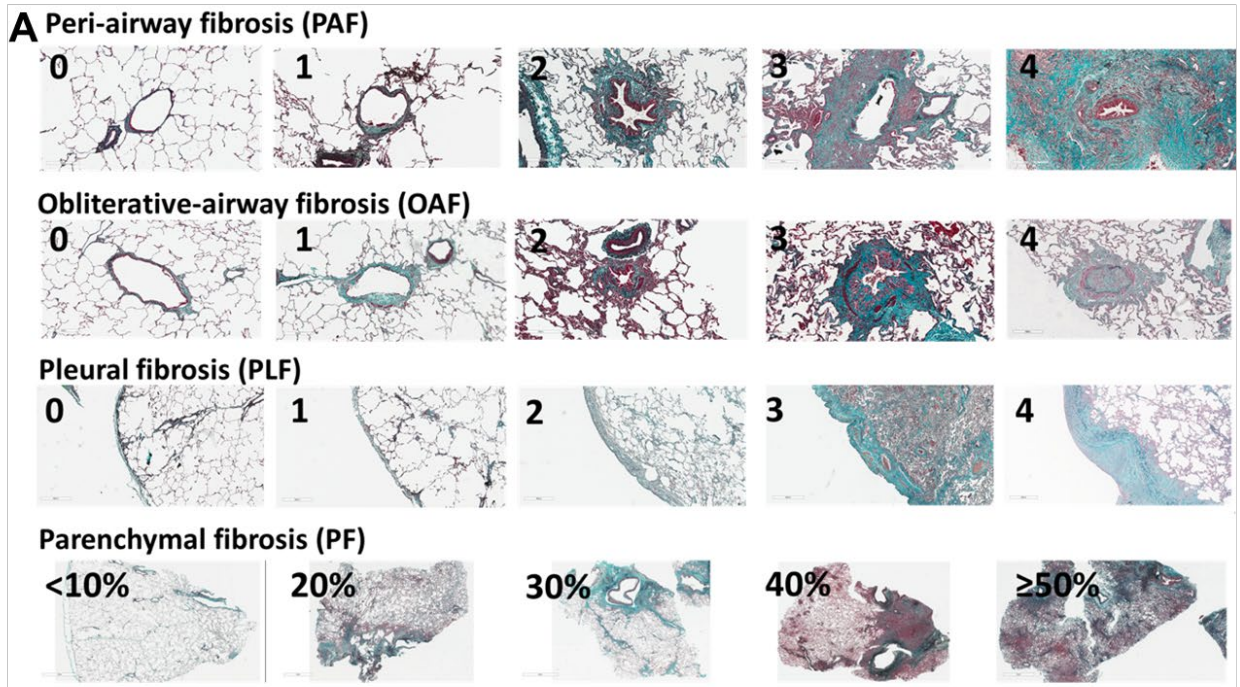
A collection of 27 representative slides was selected, ensuring adequate airways present on each slide, and submitted to a second observer (GJB) without any additional information regarding the CLAD phenotype. Grading results from observer 2 were then compared to observer 1's (BRP) results. Scores from observer 2 were significantly higher for peri-airway fibrosis and obliterative airway fibrosis compared to observer 1, and scores from observer 2 for epithelial flattening were significantly lower compared to the first observer. Interclass correlation coefficient (ICC), using a one-way random model with agreement definition and 95% confidence interval, showed a strong reliability in consistency between the two observers for all the parameters, ICC values being above 0.5 for all of them. The inter-rater agreement was "good" for PAF (ICC 0.60 to 0.74) and "excellent" for all other parameters (ICCs 0.75 to 1.0).



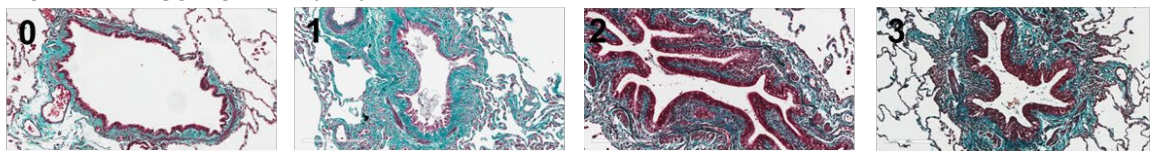
## FIGURES



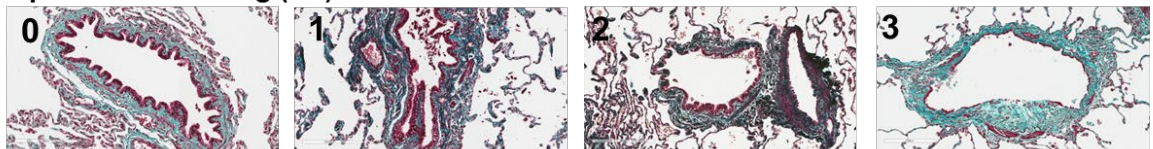
**Figure 1: Schematic representation of the four locations where the samples were collected.** Central and peripheral paraffin-embedded explanted lung allograft samples were obtained from 20 consecutive patients undergoing second lung transplantation for chronic lung allograft dysfunction, from the left upper lobe (LUL, 2 adjacent locations), the left lower lobe (LLL) and the right upper lobe (RUL).



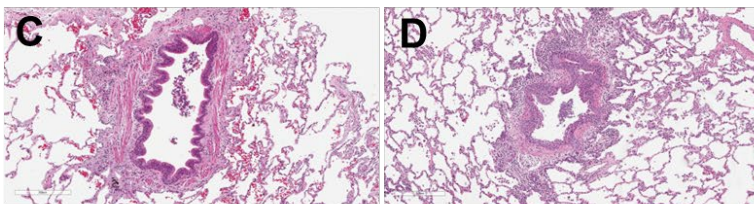
**B** Epithelial hyperplasia (EH)



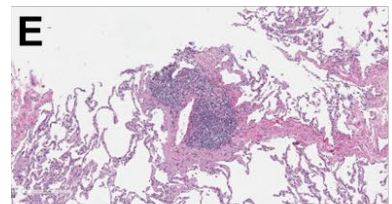
Epithelial flattening (EF)



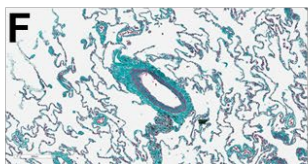
Peri-airway inflammation



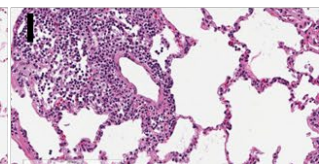
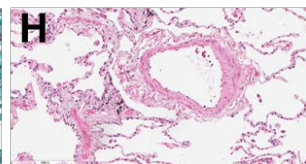
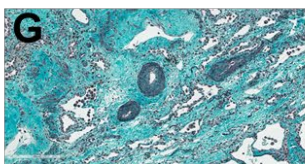
Lymphoid aggregate (LA)



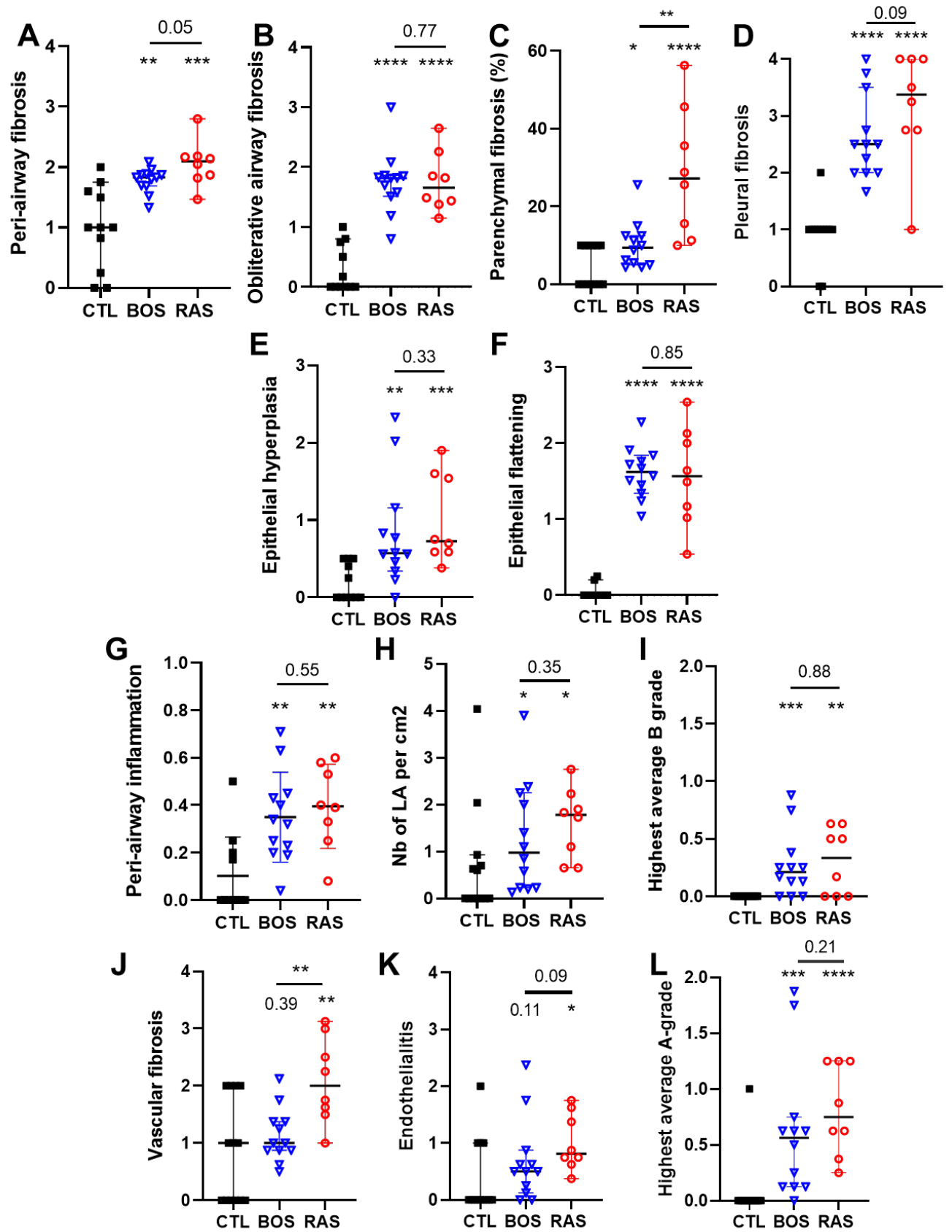
Vascular fibrosis



Endothelialitis



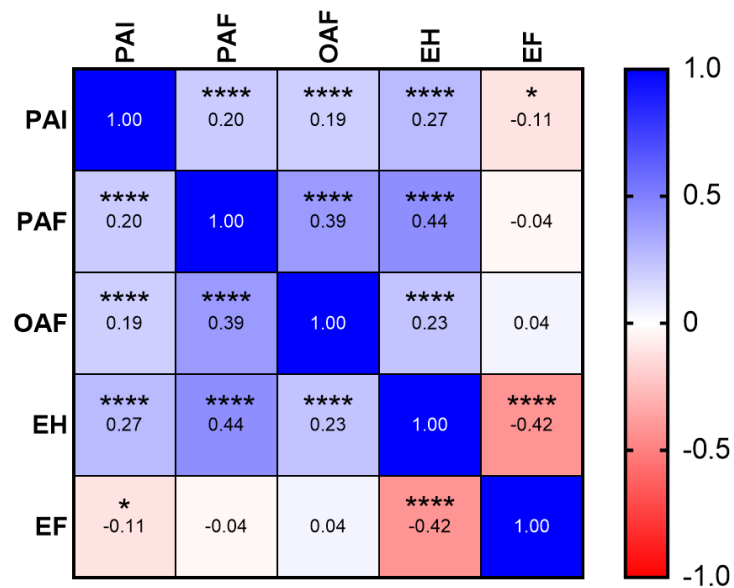
**Figure 2: Histological parameters used for the grading system assessing the pathological spectrum in chronic lung allograft dysfunction. (A):** Examples of grades 0-4 for peri-airway fibrosis (PAF), obliterative airway fibrosis (OAF), and pleural fibrosis (PLF). Parenchymal fibrosis (PF) is assessed by estimating the % of parenchyma affected by fibrosis. **(B): Epithelial changes:** Examples of grades 0-3 (referring to frequency of airways affected) for epithelial hyperplasia (EH) and epithelial flattening (EF). **(C-D): Peri-airway inflammation:** Hematoxylin and eosin-stained (HE) slides showing an example of airway without **(C)** and with **(D)** peri-airway inflammation. **E:** HE-stained slides with presence of a **lymphoid aggregate (LA)**. **Vascular fibrosis:** Elastic trichrome-stained slides showing an example of vessel without **(F)** and with **(G)** vascular fibrosis. **Endothelialitis:** HE-stained samples showing an example of vessel without **(H)** and with **(I)** endothelialitis. Scale bar in pictures for pleural fibrosis: 600  $\mu\text{m}$ ; in pictures for endothelialitis: 200  $\mu\text{m}$ . Scale bar in every other picture: 300  $\mu\text{m}$ .



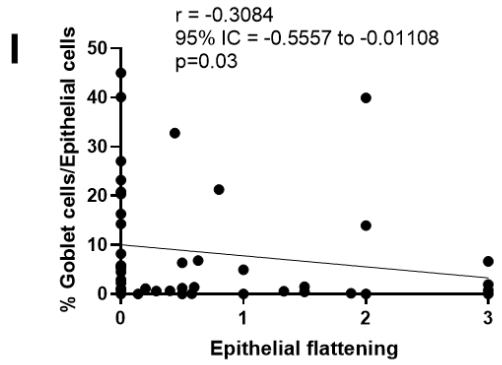
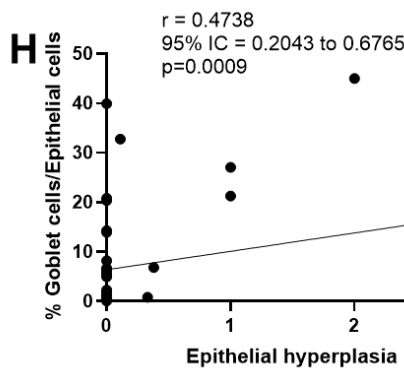
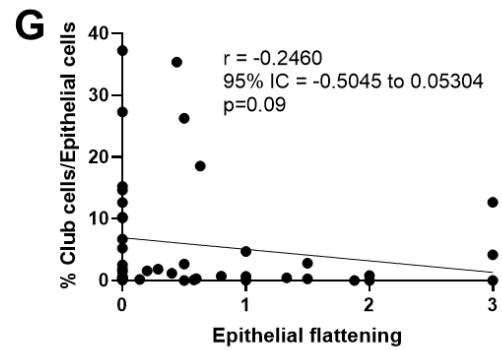
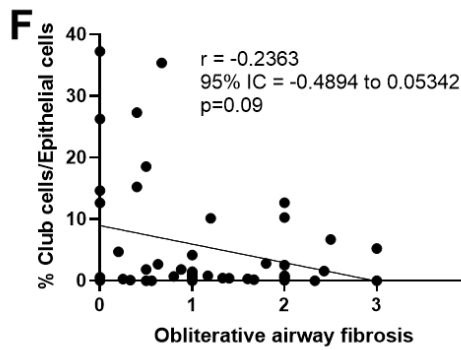
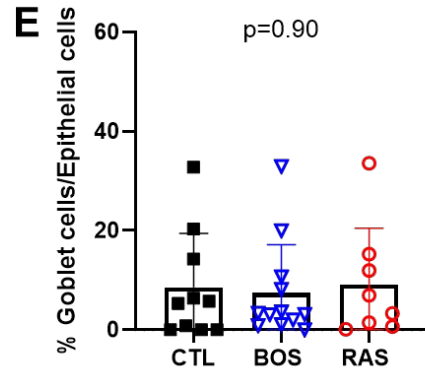
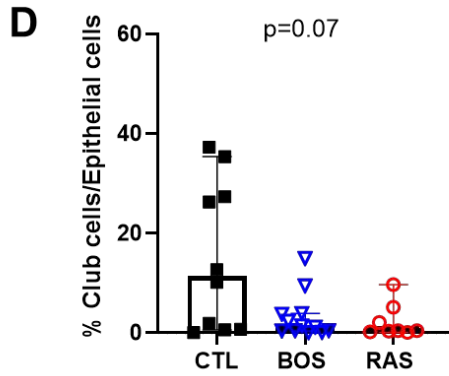
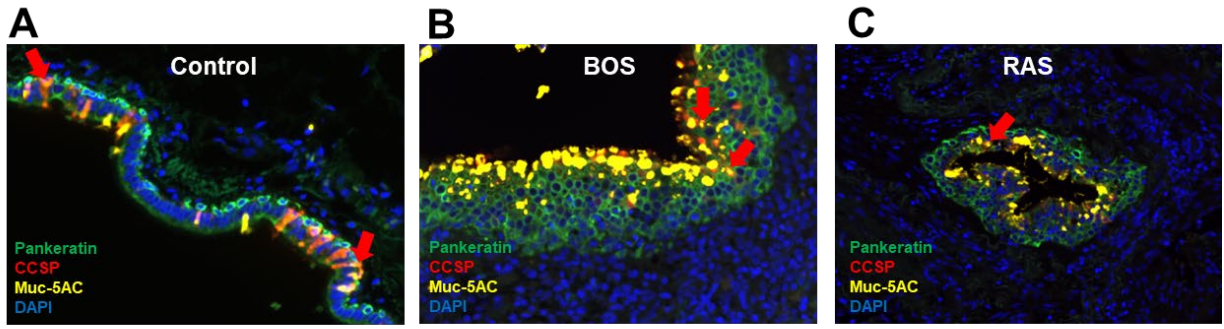
**Figure 3: Overlap between BOS and RAS samples in pathological features except for parenchymal fibrosis and vascular fibrosis. Airway (A,B), parenchymal (C) and pleural fibrosis (D):** Normal lung gradings were significantly lower compared to both BOS and RAS for PAF (respectively  $p=0.002$  and  $p=0.0008$ ), OAF ( $p<0.0001$  for both BOS and RAS), parenchymal (respectively  $p=0.02$  and  $p<0.0001$ ) and pleural fibrosis ( $p<0.0001$  for both BOS and RAS); no significant difference was observed between the two CLAD phenotypes expect for parenchymal fibrosis ( $p=0.003$ ). **Epithelial changes (E-F):** Epithelial hyperplasia (EH) and flattening (EF) were significantly more frequent in BOS and RAS samples compared to normal (EH respectively  $p=0.003$  and  $p=0.0003$ ; EF  $p<0.0001$  for both BOS and RAS), without any difference between BOS and RAS samples. **Inflammation-related features (G-I):** Peri-airway inflammation and LA gradings were all significantly lower in normal samples, without any significant difference between BOS and RAS samples. The highest B-grade value did not differ between BOS and RAS samples, but both types had higher B-grades compared to normal lungs. **Vascular changes (J-L):** Vascular fibrosis was significantly higher in RAS samples compared to BOS ( $p=0.003$ ) and normal lung samples ( $p=0.009$ ), meanwhile no difference was observed between BOS and normal samples. Endothelialitis was significantly higher in RAS samples only compared to normal lung ( $p=0.02$ ), and no difference was observed between BOS and RAS. The highest A-grade value did not differ between BOS and RAS samples, but both types had higher A-grades compared to normal lungs. A post-hoc multiple comparison analysis using Mann-Whitney test was performed after a non-parametric analysis with Kruskal-Wallis test to compare grades between three groups. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, CTL: controls. \* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ , \*\*\*\* $p<.0001$ , ns: not significant.





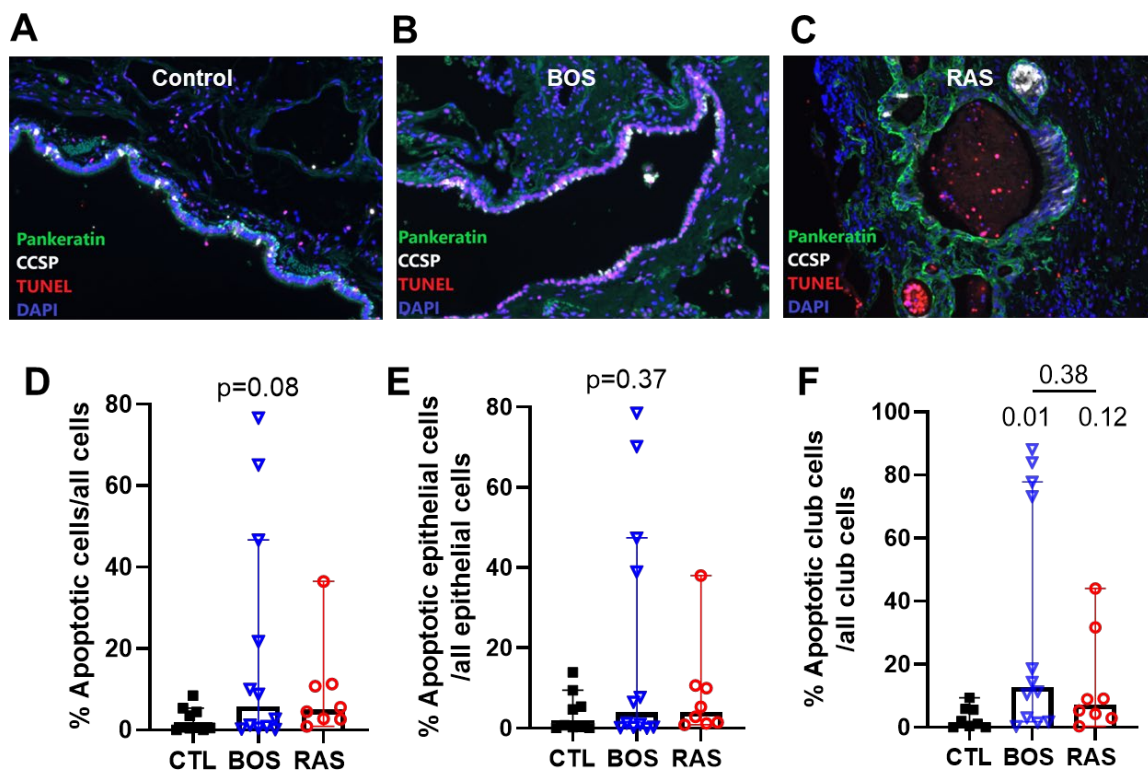


**Figure 4: Significant correlation between peri-airway inflammation, airway fibrosis-related parameters and epithelial gradings.** Correlation matrix analysis was performed using the gradings obtained from every single airway in the lung samples. There was a significant positive correlation between peri-airway inflammation, peri-airway fibrosis ( $p < 0.0001$ ), obliterative airway fibrosis ( $p < 0.0001$ ) and epithelial hyperplasia ( $p < 0.0001$ ); we observed a significant negative correlation between peri-airway inflammation and epithelial flattening ( $p = 0.01$ ). Airway fibrosis and epithelial hyperplasia were also significantly correlated. Spearman's R correlation was used to assess the interactions between each set of parameters. \* $p < .05$ , \*\*\*\* $p < .0001$ . PAI: peri-airway inflammation, PAF: peri-airway fibrosis, OAF: obliterative airway fibrosis, EH: epithelial hyperplasia, EF: epithelial flattening.



**Figure 5: A lower frequency of club cells was observed in CLAD samples compared to controls.** Immunofluorescence (IF) staining targeting epithelial bronchial proteins was performed on 2 formalin-fixed paraffin-embedded slides (1 central and 1 peripheral) selected for each of the 20 CLAD patients, and on 10 control lung slides. **A-C:** Examples of IF staining targeting epithelial proteins in control lungs (**A**), BOS (**B**) and RAS tissue slides (**C**) - pankeratin (green) for all epithelial cells, CCSP (red) for club cells, Muc-5AC (yellow) for goblet cells and DAPI (blue) for nuclei. Some cells showed double staining for Muc-5AC and CCSP (red arrows). **D-E:** The frequency of club cells among all the epithelial cells was higher in the control lung samples compared to both BOS and RAS samples ( $p=0.07$ ) (**D**). Regarding the frequency of goblet cells among all the epithelial cells, no significant difference was observed between the three categories (**E**). A negative correlation was observed between the frequency of club cells and obliterative airway fibrosis ( $p=0.009$ ) (**F**) and epithelial flattening ( $p=0.09$ ) (**G**); the frequency of goblet cells exhibited a significant positive correlation with epithelial hyperplasia ( $p=0.0009$ ) (**H**), and a significant negative correlation with epithelial flattening ( $p=0.03$ ) (**I**). Non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare results between the three groups; Spearman  $r$  correlation was used to describe the association between cell frequency and histological parameters. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, CTL: control, CLAD: chronic lung allograft dysfunction.

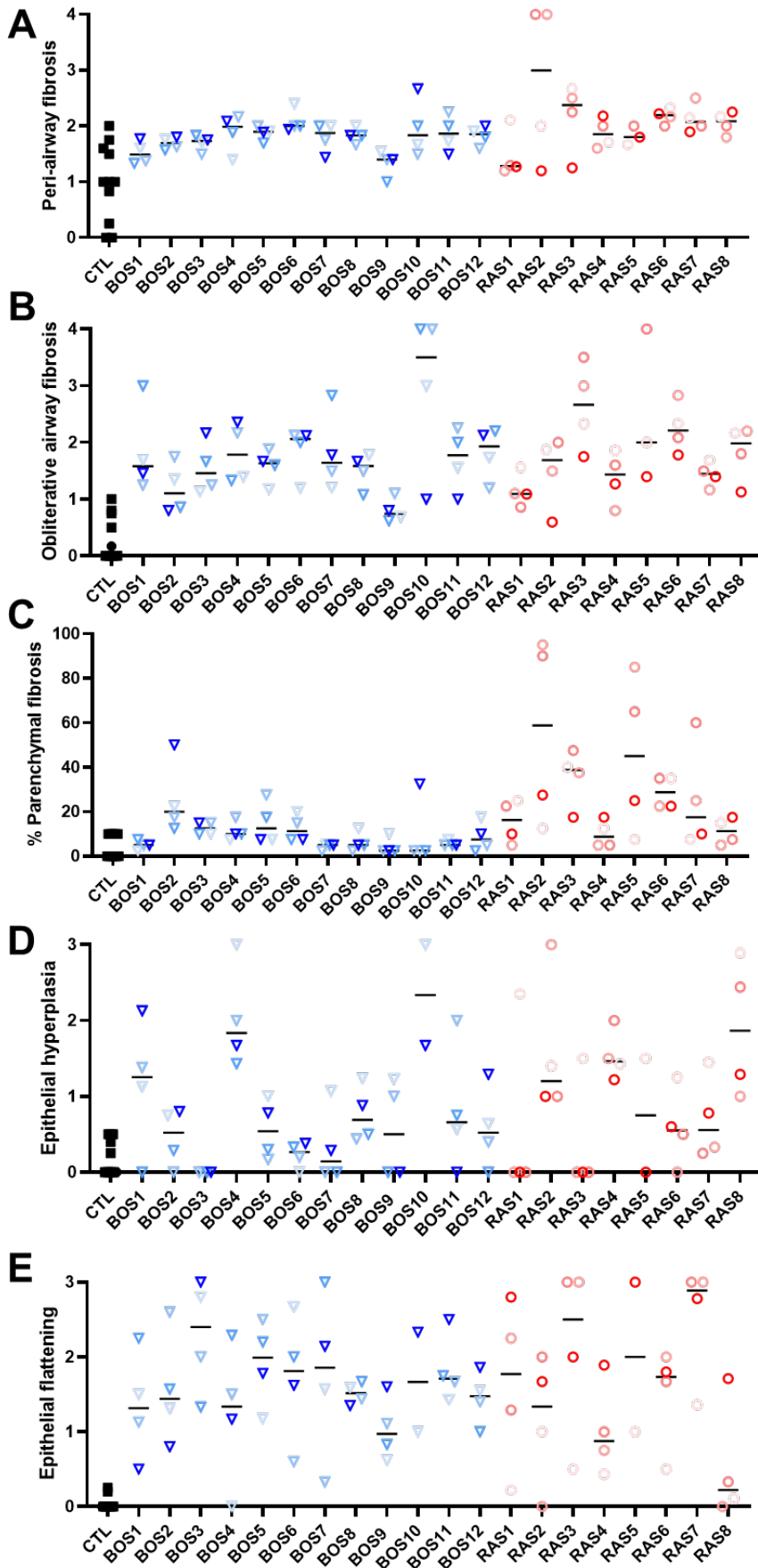




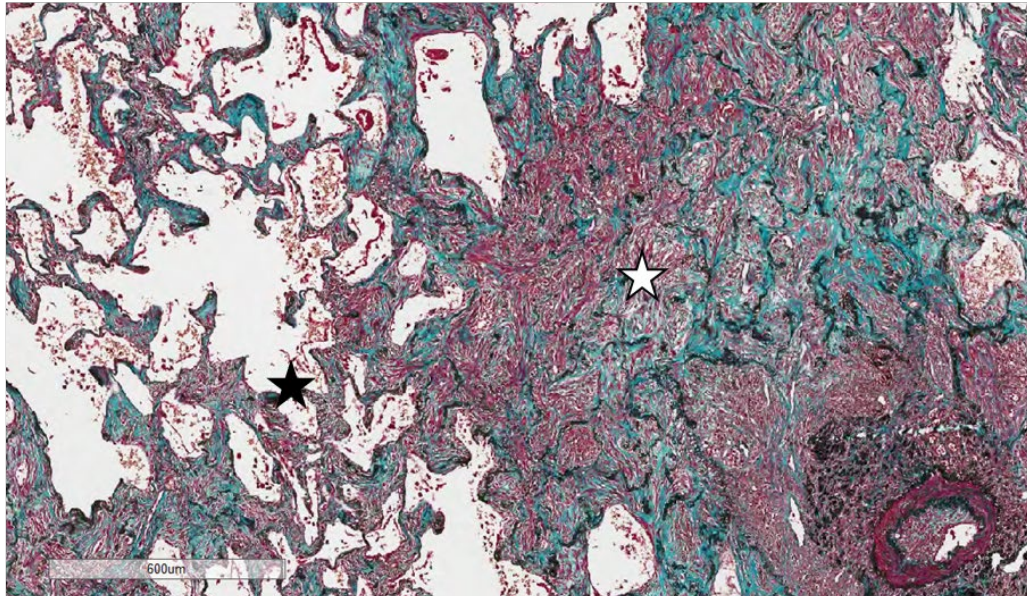
**Figure 6: Higher frequency of apoptotic club cells in BOS samples.** Immunofluorescence (IF) staining was performed to assess the frequency of apoptotic cells in 2 formalin-fixed paraffin-embedded slides (1 central and 1 peripheral) selected for each of the 20 patients retransplanted for CLAD, and in 10 normal lung slides. **A-C**: Examples of IF staining targeting epithelial proteins and apoptotic cells in control lung (**A**), BOS (**B**) and RAS tissue slides (**C**). Pankeratin (green) for all epithelial cells, CCSP (white) for Club cells, TUNEL (red) for apoptotic cells and DAPI (blue) for the nuclei. **D-F**: We observed a trend toward a higher frequency of apoptotic cells within both BOS and RAS samples compared to controls (**D**). No significant difference regarding the frequency of apoptotic epithelial cells among all epithelial cells was observed between the three groups (**E**). The frequency of apoptotic club cells among all club cells was significantly higher in BOS samples compared to controls (**F**). Non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare results between the three groups followed by a post-hoc analysis with Mann-Whitney test in case of significant difference. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, CTL: control, CLAD: chronic lung allograft dysfunction.

LLL  
LUL1  
LUL2  
RUL

LLL  
LUL1  
LUL2  
RUL



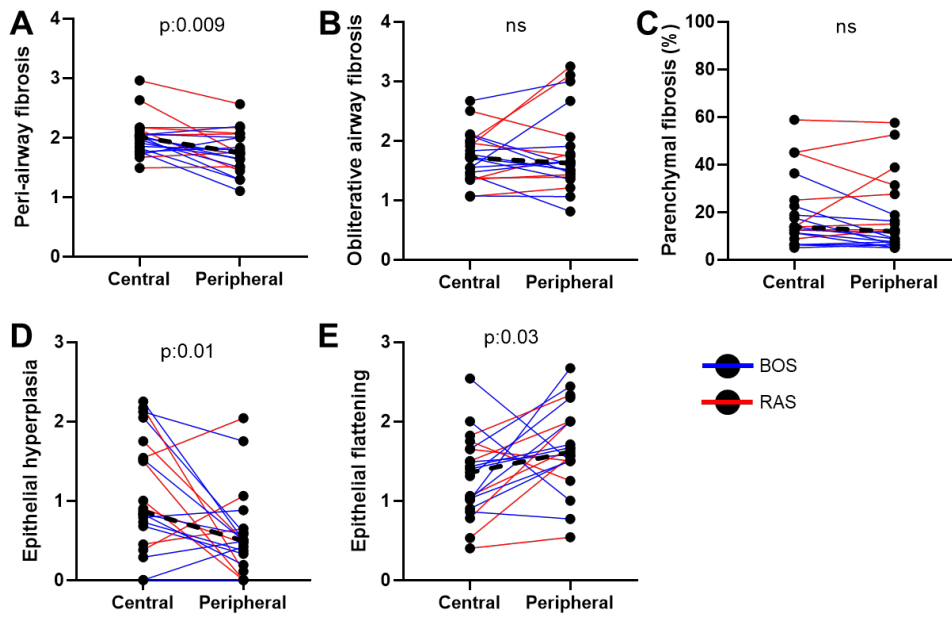
**Figure S1: Inter-lobe histological grade variability within samples for all CLAD and control patients.** All histological grades for peri-airway fibrosis (**A**), obliterative airway fibrosis (**B**), parenchymal fibrosis (**C**), epithelial hyperplasia (**D**), and epithelial flattening (**E**) are shown for all samples. LLL: left lower lobe; LUL: left upper lobe; RUL: right upper lobe. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome; RAS: restrictive allograft syndrome; CTL: control.

**A****B**

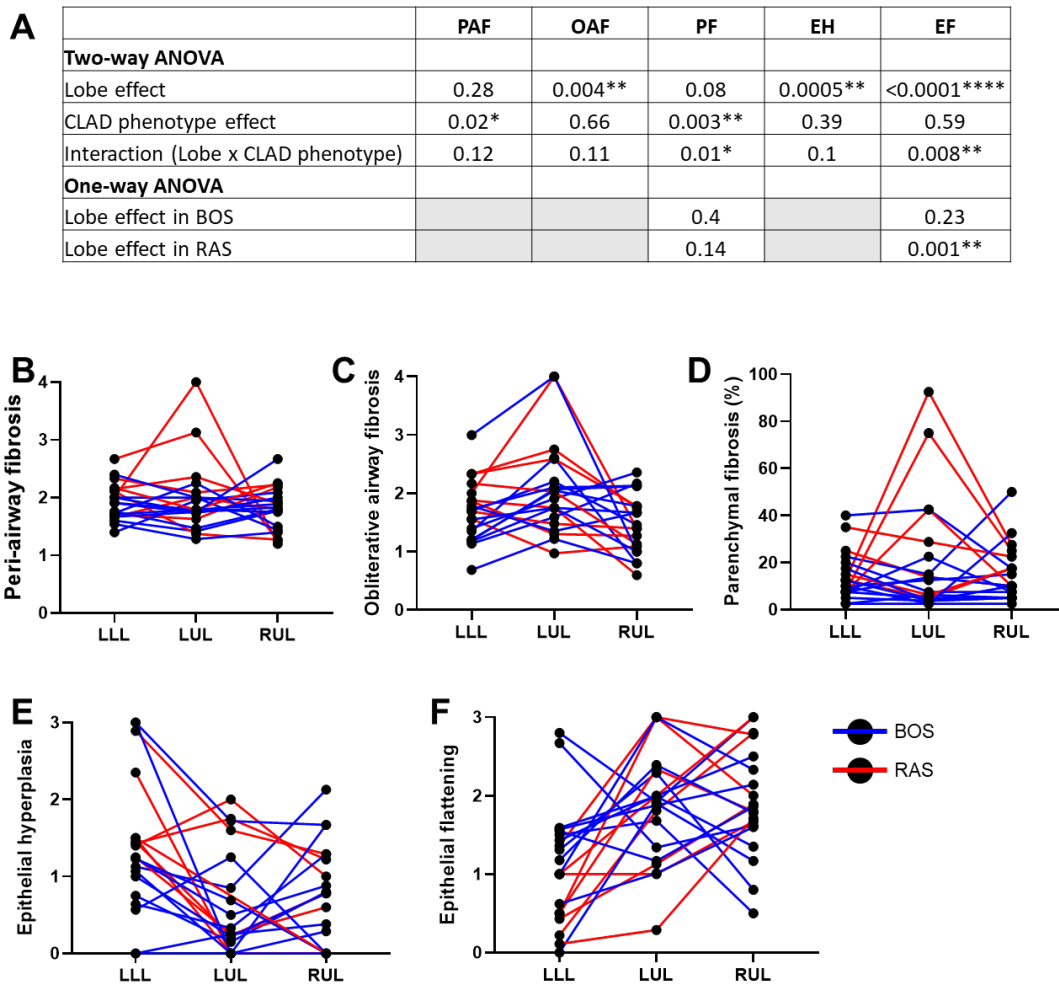
|      | Lobe            | Predominant patterns  |
|------|-----------------|---|
| BOS1 | LUL2 3          | IAFE  |
| BOS2 | LLL 5           | Diffuse alveolar septal fibrosis  |
| RAS2 | LUL1 4          | IAFE with traction bronchiectasis, areas of ALI   |
|      | LUL2 4<br>RUL 4 | IAFE with small areas of diffuse alveolar septal fibrosis<br>IAFE                       |
| RAS3 | LLL 6           | IAFE  |
|      | LUL1 6          | IAFE with ALI   |
|      | LUL2 6<br>RUL 6 | Diffuse alveolar septal fibrosis<br>IAFE with areas of diffuse alveolar septal fibrosis |
| RAS5 | LUL1 8          | IAFE with some areas of diffuse alveolar septal fibrosis                                |
|      | LUL2 8<br>RUL 8 |   |
| RAS6 | LUL1 12         | Diffuse alveolar septal fibrosis  |
|      | LUL2 12         | Diffuse alveolar septal fibrosis with areas of organizing ALI, areas of IAFE            |
|      | RUL 12          | Diffuse alveolar septal fibrosis with small areas of IAFE                               |
|      | RLL 12 P        | IAFE with small areas of diffuse alveolar septal fibrosis                               |
| RAS7 | LUL1 15         | IAFE predominant with areas of diffuse alveolar septal fibrosis                         |
|      | LUL2 15         |   |

**Figure S2: Patterns of parenchymal fibrosis pathology. A:** Example of predominant intra-alveolar fibroelastosis (IAFE) (white star) with areas of diffuse alveolar septal fibrosis (black star). **B:** Table showing the predominant patterns of PF across the CLAD lung biopsies collected in the peripheral areas with a PF score  $\geq 20\%$ . ALI: acute lung injury. BOS: Bronchiolitis obliterans syndrome; LLL: left lower lobe; LUL: left upper lobe; RUL: right upper lobe; RAS: Restrictive allograft syndrome.

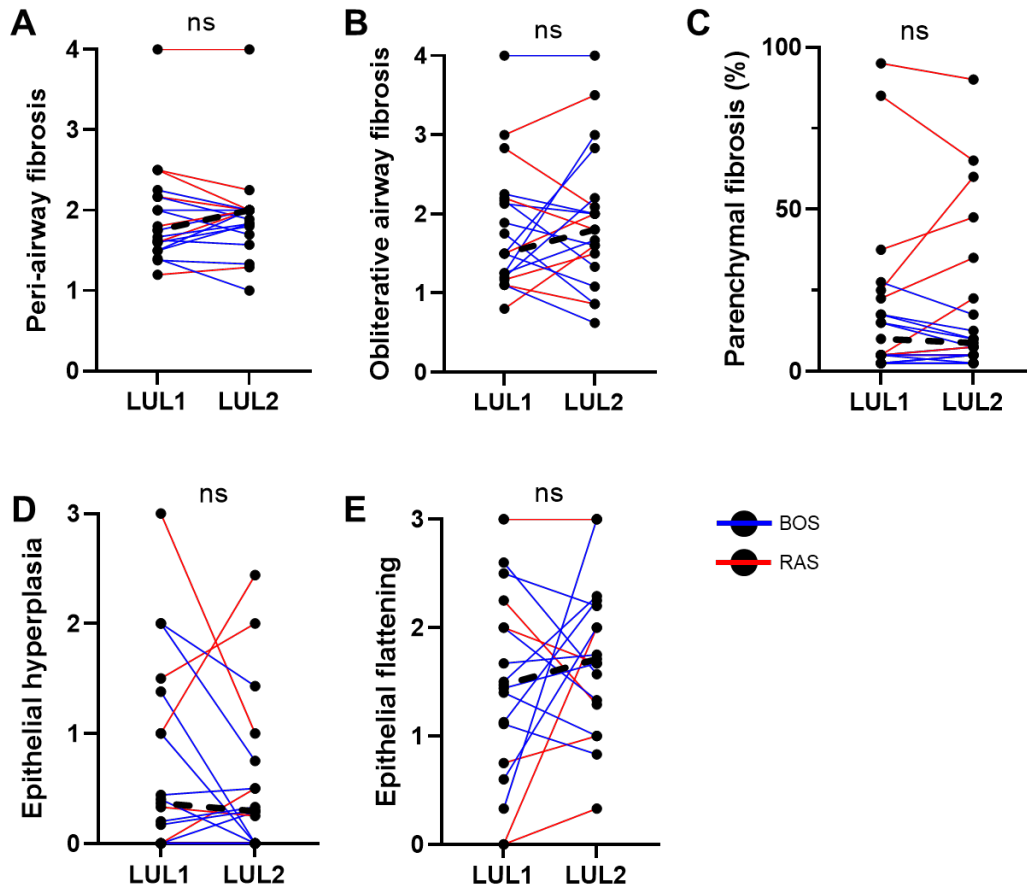




**Figure S3: Comparison of central versus peripheral sample histopathological grades.** Peri-airway fibrosis average values were significantly lower in peripheral samples compared to central samples ( $p=0.009$ ) (A); no significant differences between central and peripheral samples were observed for obliterative airway fibrosis (B) and parenchymal fibrosis (C). Regarding epithelial-related parameters, epithelial hyperplasia was significantly lower in the peripheral samples ( $p=0.01$ ) (D) while epithelial flattening was significantly higher in the peripheral samples ( $p=0.03$ ) (E). A Wilcoxon matched-pairs rank test was used to compare central and peripheral samples. Dash lines represent median values. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome.



**Figure S4: Evaluation of lobe and CLAD phenotype effects on the histological grading parameters.** For this analysis, values from left upper lobe 1 (LUL1) and 2 (LUL2) were averaged. We used a two-way ANOVA test to assess the impact of the lobe where the samples were collected and the CLAD phenotype, on the histological grading results (**A**), for peri-airway fibrosis (PAF) (**B**), obliterative airway fibrosis (OAF) (**C**), parenchymal fibrosis (PF) (**D**), epithelial hyperplasia (EH) (**E**) and epithelial flattening (EF) (**F**). We observed a significant lobe effect on OAF ( $p=0.004$ ) (**A,C**), EH ( $p=0.0005$ ) (**A,E**) and EF ( $p<0.0001$ ) (**A,F**) grades. As expected, CLAD phenotype introduced a significant variation in peri-airway fibrosis ( $p=0.02$ ) (**B**) and parenchymal fibrosis ( $p=0.003$ ) (**D**) grades. For parenchymal fibrosis and epithelial flattening, where a significant interaction between phenotype and lobe was observed (respectively  $p=0.01$  and  $p=0.008$ ), one-way ANOVA test was performed to assess the lobe effect for each CLAD phenotype separately. There was a lobe effect in RAS samples for EF only ( $p=0.001$ ). \* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ , \*\*\*\* $p<.0001$ , ns: not significant. CLAD: chronic lung allograft dysfunction, BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, LLL: left lower lobe, LUL: left upper lobe, RUL: right upper lobe.



**Figure S5: Comparison of histopathological grades between samples collected in the 2 locations from the left upper lobe.** No significant consistent differences were observed between the samples collected from the two different locations in the left upper lobe (LUL1 and LUL2) in our 20 CLAD patients, regarding the average values scored for the following histological parameters: peri-airway fibrosis (A), obliterative airway fibrosis (B), parenchymal fibrosis (C), epithelial hyperplasia (D) and epithelial flattening (E). However, in several occasions, the two samples from the same lobe had very dissimilar grades. A paired Wilcoxon test was used to compare the samples from each patient. Dashed lines represent median values. CLAD: chronic lung allograft dysfunction, LUL: left upper lobe.



## Article 2 : Utilisation de l'Imaging mass cytometry pour une analyse cellulaire et spatiale détaillée de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire

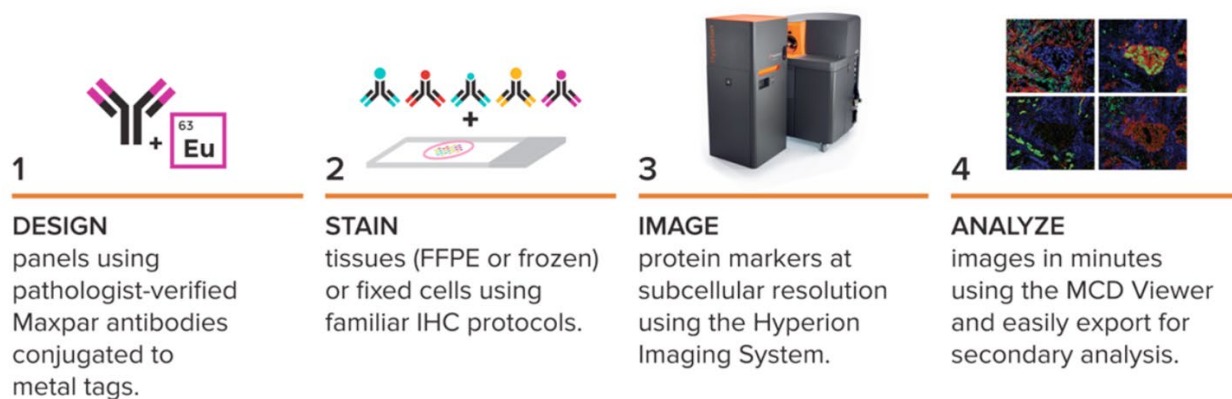
### Contexte

La survie à long terme après transplantation pulmonaire (TP) reste limitée, principalement en raison de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire.(56,58,61,62)

L'identification des sous-types cellulaires impliqués est cruciale afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du CLAD. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est considérée comme l'un des principaux, notamment en raison des agressions inflammatoires répétées survenant après une TP.(64,82,120,172)

L'identification précoce des lésions de l'épithélium du greffon pulmonaire pourrait permettre des interventions rapides et ainsi prévenir le développement du CLAD. Il est fréquent d'utiliser des techniques basées sur la fluorescence pour l'étude des tissus (immunofluorescence, cytométrie en flux...). Cependant, leur utilisation est souvent limitée dans l'étude du tissu pulmonaire en raison de son autofluorescence, provoquée notamment par la présence de protéines comme le collagène.(173) De nouvelles technologies plus spécifiques ont récemment été mises au point pour améliorer l'exploration du tissu pulmonaire.

La technique « Imaging mass cytometry » (IMC), est une méthode permettant une analyse spectroscopique de masse avec caractérisation multidimensionnelle à haute résolution de la surface des cellules et des protéines intracellulaires à l'échelle d'une seule cellule, à l'aide d'un marquage par des anticorps conjugués avec des métaux lourds, permettant de s'affranchir du problème d'autofluorescence (**figure 22**).



**Figure 22 : Technique d’Imaging mass cytometry (site web de la compagnie Fluidigm).**

Cette technique permet de marquer des fragments de tissu congelé ou en paraffine, avec un panel pouvant contenir jusqu’à 50 anticorps. La sélection des anticorps est réalisée dans le but de cibler des protéines et/ou des cellules d’intérêt. Les prélèvements une fois marqués sont ensuite analysés à l’aide de la technique Hyperion, permettant la création d’images révélant le marquage des protéines d’intérêt à l’échelle cellulaire. Après cette étape de traitement, des images à haute résolution peuvent être créées à l’aide de logiciels spécifiques. Des études antérieures ont montré l’intérêt d’utiliser l’IMC pour identifier des marqueurs immunitaires, structurels et tumoraux en utilisant des panels de 40 anticorps.(174–176) Un travail utilisant une approche VISNE, avec réduction dimensionnelle et algorithme de visualisation permettant de créer une représentation en 2 dimensions de données à haut niveau paramétrique, avait permis d’effectuer une cartographie cellulaire spécifique sur différents types de tissus, et d’identifier des sous-populations de cellules carcinomateuses, immunitaires, stromales, épithéliales et épidermoïdes.

L’IMC a également été utilisé sur des biopsies de poumons explantés obtenus lors de TP, chez des patients atteints d’une forme pulmonaire de maladie du greffon contre l’hôte, afin d’étudier la nature des lésions histologiques.(177) Cette étude avait notamment permis d’identifier des populations spécifiques de lymphocytes B et T autour des bronchioles.

Dans une étude récente, un panel de 10 marqueurs a été utilisé en IMC pour caractériser le profil des cellules immunitaires impliquées dans le rejet chronique de greffe hépatique.(178)

La plupart des sous-populations immunitaires étaient plus nombreuses et interconnectées dans les échantillons de greffon hépatique avec rejet chronique, en particulier deux populations de lymphocytes T cytotoxiques CD45+/CD3+/CD8+ et une population de macrophages CD68+, qui n'ont pas été observées dans les biopsies hépatiques sans rejet.

L'étude que nous avons réalisée ici est à notre connaissance le premier travail visant à évaluer l'intérêt de l'utilisation de l'IMC sur des biopsies issues de greffons pulmonaires. Le but était d'étudier la morphologie détaillée de l'épithélium du greffon pulmonaire et de déterminer les relations spatiales entre les populations cellulaires immunitaires et non immunitaires (en particulier des sous-population de cellules épithéliales bronchiques) dans des poumons affectés par le CLAD à l'aide de la technique IMC.

### Matériel et méthodes

Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique du University Network Hospital de Toronto (#15-9531).

Nous avons utilisé des biopsies pulmonaires collectées chez 12 patients issus de la même cohorte que dans l'étude décrite dans la partie précédente, en sélectionnant 4 BOS, 4 RAS et 4 contrôles (2 biopsies issues de lobectomies pulmonaires, et 2 biopsies prélevées à partir de poumons de donneurs à la fin de la période d'ischémie froide).

Pour chaque patient atteint de CLAD, nous avons sélectionné une biopsie pulmonaire en paraffine, issue d'un lobe supérieur afin d'obtenir une meilleure représentativité des lésions histologiques du CLAD par rapport aux lobes inférieurs, plus souvent touchés par des infections. Pour chaque échantillon, nous avons sélectionné trois régions d'intérêt (region of interest — ROI) de 1x1mm centrées sur une voie aérienne, dans le but d'avoir des bronchioles de différents calibres pour chaque patient (calibre >600µm, 300-600µm et <300µm).

Les échantillons ont été marqués avec un panel de 35 anticorps conjugués aux métaux lourds en se basant sur les données de Chang et al.(174) et sur des résultats antérieurs du

laboratoire notamment en immunofluorescence. Nous avons sélectionné des anticorps spécifiques pour certaines protéines épithéliales (Pankératine, E-cadhérine et d'autres plus spécifiques pour les populations d'intérêt : CCSP pour les cellules club et p40 pour les cellules basales) et aussi des marqueurs immunitaires afin d'identifier des sous-populations de cellules immunitaires impliquées dans le CLAD, notamment certaines sous-populations de lymphocytes B et T.

Le protocole d'acquisition des données IMC utilisé était similaire à celui d'études antérieures et est détaillé dans l'article présenté après.(175,179) A l'aide d'une méthode similaire à celle d'Ung et al (178), une analyse non supervisée en cluster avec agrégation des données en « single cell » provenant de tous les échantillons a été réalisée en utilisant méthode de transformation « t-distributed stochastic neighbor embedding » (tSNE), pour créer une représentation en 2D de l'ensemble des cellules, organisées en 50 clusters immunitaires et non immunitaires en fonction de la similarité de leur liaison aux anticorps dans un espace à 35 dimensions. Nous avons également cherché à évaluer les interactions spatiales de voisinage (proximité relative et évitement) entre les clusters cellulaires. Les résultats de quantification des différents types cellulaires montrés dans les résultats ont été obtenus par comptage manuel des cellules.

Les études statistiques ont été menées de la même manière que pour l'étude précédente.

## Résultats

L'utilisation de la technique IMC sur des biopsies en paraffine congelées de tissu pulmonaire nous a permis d'obtenir des images de haute qualité. Il y avait une tendance à une fréquence plus élevée de cellules épithéliales dans les échantillons contrôles ( $p=0,09$ ). Nous avons également observé une infiltration importante de cellules immunitaires CD45+ autour de certaines voies aériennes dans les échantillons de CLAD, principalement BOS, même si la fréquence des cellules immunitaires CD45+ ne différait pas entre les trois groupes ( $p=0,17$ ), ni celle des lymphocytes T CD3+ ( $p=0,07$ ).



Afin d'identifier des sous-ensembles cellulaires spécifiques identifiés selon les combinaisons de marqueurs de notre panel, nous avons utilisé une stratégie en tSNE pour créer 50 clusters de cellules. Nous avons pu identifier plusieurs sous-populations de cellules épithéliales, parmi lesquelles les cellules épithéliales club (cluster 25 : Pankératine+, E-cadhérine+ et CCSP+), ainsi que deux sous-populations de cellules basales : une sous-population « classique » (Cluster 22 : Pankératine+, E-cadhérine+, p40+, et CD138+) et des cellules basales exprimant fortement Ki67 (cluster 40). La fréquence des cellules club était significativement plus importante dans les échantillons de poumons contrôles ( $p=0.006$ ). Nous avons observé une tendance à une fréquence plus importante des cellules basales « classiques » dans les échantillons contrôle ( $p=0.32$ ), tandis que les cellules basales Ki67+ semblaient plus souvent présentes dans les échantillons CLAD, en particulier RAS ( $p=0.20$ ).

Nous avons pu également identifier des sous-populations de cellules immunitaires précises. Notre analyse a mis en évidence un cluster de lymphocytes T CD8 mémoire (cluster 6 : CD45+CD3+CD8a+CD45RO+PD1+CD196+) un cluster de lymphocytes T CD4 mémoire (cluster 7 : CD45+CD3+CD4+CD45RO+PD1+CD196+), et un cluster de lymphocytes T régulateurs (cluster 41 : CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3+CD45RO+). Parmi l'ensemble des cellules CD3+, nous avons constaté une tendance à une fréquence plus importante des lymphocytes T CD8 mémoire et de lymphocytes T CD4 mémoire dans les échantillons de poumon CLAD ( $p=0.06$  et  $p=0.32$  respectivement). Il y avait une tendance à une fréquence plus importante de lymphocytes T régulateurs dans les échantillons de poumon RAS ( $p=0.13$ ).

Un cluster de lymphocytes B a également été identifié (cluster 8 : CD45+CD20+PD1+CD196+), dont la fréquence était significativement plus importante dans les échantillons de poumons CLAD, en particulier RAS ( $p=0.03$ ). L'organisation des cellules de ce cluster est intéressante. En effet, nous avons pu observer des agrégats lymphocytaires, considérés comme des organes lymphoïdes tertiaires, dont le rôle dans le développement du rejet d'allogreffe n'est pas clairement défini.(180–186) Nos analyses ont montré que les principales populations constituant ces agrégats lymphocytaires étaient des lymphocytes B (cluster 8).

Nous avons également réalisé une analyse de voisinage pour évaluer le niveau de proximité des clusters cellulaires entre eux. Le cluster de cellules basales Ki67+ (cluster 40), était fréquemment à proximité d'un cluster de polynucléaires neutrophiles (Cluster 20 : CD45+CD11b+Granzyme B+MPO+), et du cluster de lymphocytes T cytotoxiques mémoires (cluster 6) décrit précédemment dans des échantillons de poumon avec CLAD.

Les cellules du cluster de lymphocytes T régulateurs (cluster 41) étaient fréquemment à proximité des lymphocytes T CD4+ mémoires (cluster 7) ainsi que de cellules plasmatiques (cluster 10 : CD138+CD196+) dans certains échantillons de poumons avec CLAD.

## Discussion

Nos résultats ont montré que l'utilisation de l'IMC permettait d'obtenir des images de haute qualité, avec des résultats satisfaisants pour la quasi-totalité des marqueurs en termes de spécificité.

Notre analyse à l'échelle cellulaire (single cell) a permis de déterminer 50 clusters de cellules immunitaires et non immunitaires en fonction de leur expression de chacun des 35 marqueurs de notre panel. Nous avons pu identifier un cluster de cellules club, dont la fréquence était significativement inférieure dans les échantillons de poumon BOS et RAS, confirmant des données d'autres études.(86,187,188) Nous avons pu identifier un cluster de cellules basales exprimant Ki67, marqueur d'activité cellulaire, essentiellement observé dans les échantillons de poumons avec CLAD. Le développement du CLAD, et notamment de la BO, repose essentiellement sur une dysfonction des cellules club et des cellules basales, peut-être lié à un effet de sénescence accélérée de ces cellules. Les cellules basales jouent un rôle important en tant que progéniteurs dans la protection et le renouvellement de l'épithélium bronchique, et la survenue du CLAD peut entraîner l'apoptose des cellules basales.(189) Naikawadi et al (190) ont observé que les cellules épithéliales bronchiques de poumons avec CLAD avaient une longueur de télomères plus courte comparé à des poumons normaux. La proportion de cellules épithéliales exprimant Ki67+ était significativement augmentée dans les poumons affectés par le CLAD, synonyme d'une

sénescence accélérée par le biais d'une activité accrue. D'autres études ont montré que la dysfonction des télomères pouvait favoriser le développement d'une fibrose pulmonaire en dehors du contexte de la TP, limiter les capacités de régénération des cellules progénitrices épithéliales bronchiques et alvéolaires.(191,192) La mise en évidence de cette sous-population de cellules basales Ki67+ dans nos résultats sont concordants avec ces données. Il était également intéressant de noter que certaines sous-populations de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes T) étaient fréquemment à proximité des cellules basales Ki67+. Récemment, une étude a montré que l'activation de la signalisation JAK-STAT conduisait à une régulation positive du complexe majeur d'histocompatibilité 1 dans les cellules basales ce qui conduisait à leur apoptose médiée par les lymphocytes T cytotoxiques.(193) Nos résultats confirment donc que les cellules basales occupent une place importante dans la physiopathologie du CLAD.

L'analyse de voisinage nous a également permis d'observer une proximité fréquente entre certaines sous-populations de cellules immunitaires effectrices et d'autres régulatrices.

Au total, nous avons confirmé avec cette étude que l'IMC était un outil très performant pour l'analyse du greffon pulmonaire notamment lors du CLAD, permettant une nouvelle approche afin d'étudier les sous-populations cellulaires immunitaires et non immunitaires présentes au sein du greffon pulmonaire. L'identification de plusieurs clusters cellulaires précis nous a permis de mieux définir la nature, la localisation ainsi que les rapports de proximité entre certaines populations de cellules épithéliales et certaines sous-populations de cellules immunitaires. L'utilisation de l'IMC peut être réalisée sur des blocs de tissus en paraffine déjà prélevés, en complément d'autres techniques telles que l'immunohistochimie, l'immunofluorescence et l'analyse histologique macroscopique afin de confirmer les données obtenues.

Il s'agit ici d'une étude préliminaire, d'autres travaux seront évidemment nécessaires pour continuer d'optimiser les analyses à l'aide de cette technique.

La rédaction de cet article est en cours de finalisation, et nous envisageons une soumission à *l'American Journal of Transplantation*.



## **Imaging mass cytometry for detailed cellular and spatial characterization of chronic lung allograft dysfunction**

*Benjamin Renaud-Picard<sup>1,2,3</sup>, May Cheung<sup>4</sup>, Sajad Moshkelgosha<sup>1,2</sup>, Gregory Berra<sup>1,2,5</sup>, David Hwang<sup>6</sup>, David Hedley<sup>4</sup>, Stephen Juvet<sup>1,2,7</sup>, Tereza Martinu<sup>1,2,7</sup>*

<sup>1</sup>Latner Thoracic Research Laboratories, Toronto General Hospital Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

<sup>2</sup>Toronto Lung Transplant Program, Ajmera Transplant Centre, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada

<sup>3</sup>INSERM Unité mixte de recherche 1260, Regenerative nanomedicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>4</sup>Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, ON

<sup>5</sup>Service de pneumologie, Département de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Genève, Geneva, Switzerland

<sup>6</sup>Department of Pathology, Sunnybrook Health Sciences Center, Toronto, ON

<sup>7</sup>University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

## **ABSTRACT (250 words)**

Background: Long-term survival after lung transplantation remains limited by Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD), which includes two main phenotypes: bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and restrictive allograft syndrome (RAS). We aimed to assess CLAD lung allografts using imaging mass cytometry (IMC), a high dimensional tissue imaging system allowing a multiparametric in situ exploration of tissue microenvironments at a single cell level, using heavy metal-tagged antibodies.

Methods: Explanted lung tissue was obtained at the time of retransplantation from 4 BOS patients, 4 RAS patients, and 4 control lungs. Paraffin-embedded lung tissue was sectioned and stained with 35 heavy-metal-tagged antibodies selected to identify structural and immune proteins of interest. For each sample, three 1 mm<sup>2</sup> regions of interest, centered on an airway, were ablated and analyzed.

Results: To identify specific cell subsets by using combinations of markers, we used tSNE to create a 2D representation of cells organised in 50 immune and non-immune clusters according to the similarity of their antibody-binding in 35-dimensional space. CLAD lungs had significantly reduced club cells and a trend towards reduced basal cells. A Ki67-high basal cell population was mostly present in RAS samples and in close proximity to memory T cells. Memory CD8<sup>+</sup> T cells were more frequent in CLAD lungs with prominent regulatory T cells in RAS.

Conclusion: IMC allowed us to identify distinct basal cells and their proximity to inflammatory cells in CLAD lungs. IMC is a powerful technology for detailed cellular analysis within intact organ structures that may shed further light on CLAD mechanisms.

## **ABBREVIATIONS**

Alpha-SMA: alpha-smooth muscle actin

BOS: Bronchiolitis obliterans syndrome

BSA: Bovine serum albumin

CCSP: Club cell secretory protein

CF: Cystic fibrosis

CLAD: Chronic lung allograft dysfunction

EMT: Epithelial to mesenchymal transition

FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded

HE: Hematoxylin & Eosin

IAFE: Intra-alveolar fibroelastosis

IF: Immunofluorescence

IMC: Imaging mass cytometry

LA: Lymphoid aggregates

LTx: Lung transplantation

PBS: Phosphate-buffered saline

PPFE: Pleuro-parenchymal fibro-elastosis

RAS: Restrictive allograft syndrome

ROI: Regions of interest

TLO: Tertiary lymphoid organs

tSNE: t-distributed stochastic neighbor embedding

## **1. INTRODUCTION**

The long-term survival after a lung transplantation (LTx) remains limited, mostly affected by Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD). Over the last two decades, two main phenotypes have been described: bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and restrictive allograft syndrome (RAS).(1-6) The primary histological feature of BOS is bronchiolitis obliterans (BO), leading to fibrotic obliterative lesions of small airways. The main histological feature of RAS is pleuro-parenchymal or intra-alveolar fibro-elastosis (IAFE), in addition to other pathological patterns such as diffuse alveolar damage, organizing pneumonia, as well as BO.(7,8)

Several studies showed that there may be a clinical, radiological, and histological overlap between the different CLAD phenotypes, and the distinction between CLAD phenotypes may be not that clear.(9-12) A previous study from our group highlighted that CLAD features were not an all-or-nothing phenomenon in a mouse model, but rather a spectrum of disease.(13) Acutely, prior to CLAD development, cumulative post-transplant inflammatory insults lead to damage of the epithelial barrier, associated with decreased epithelial regeneration and reduced secretion of protective proteins, as well as increased production of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors. This accumulation of epithelial injuries is likely what leads to fibrosis, in a common final pathway to CLAD.(5,14-17) Early identification of injuries to the lung allograft epithelium may allow for timely interventions that might prevent CLAD.

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is considered as one of the main mechanism involved in CLAD pathophysiology.(18) During EMT, epithelial cells lose their epithelial properties and gain mesenchymal cells' phenotype.(19) A consequence is the decrease of the expression of membrane proteins such as E-cadherin, and the increase of the expression of some mesenchymal proteins, like Vimentin. Repeated epithelial injuries happening after LTx could be responsible for EMT dysregulation contributing to an excessive wound healing and (myo)fibroblasts accumulation and activation.(18-20)



Understanding individual cell subsets in rejection lesions is highly informative. However, the fluorescent antibody-based techniques used for monitoring posttransplant processes within the allograft have been often limited by the significant autofluorescence of the lung tissue, induced by the presence of certain proteins such as collagen.(21)

With this study, we proposed to assess CLAD lung allografts using Imaging mass cytometry (IMC), a mass spectroscopic technology with high-resolution, multi-dimensional characterization of lung cell surface and intracellular proteins at a single cell level, using heavy metal-tagged antibodies. Previous studies have already proved the high interest to use IMC to identify immune, structural and tumoral markers using up-to 40 markers, and to perform a specific cell mapping using ViSNE approach.(22-24) Recently, IMC was used to assess pathological injuries within explanted lungs affected with pulmonary graft versus host disease from patients who underwent a lung transplantation, allowing the authors to identify specific B cell and T cell populations around the bronchioles.(25)

Ung et al (26) used IMC to characterize the immune landscape of chronic rejection in clinical tissue samples obtained from liver transplant recipients. Most immune subpopulations were more frequent and interconnected in liver graft samples with chronic rejection, especially two populations of cytotoxic CD45+/CD3+/CD8+ T cells and one population of CD68+ macrophages, which were not observed in liver biopsies without rejection.

The aim of our study was to assess the detailed morphology of lung allograft epithelium and determine spatial relationships between immunological and structural cell clusters in CLAD lungs using IMC.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Sample selection and preparation**

The study was approved by the University Health Network Research Ethics Board (#15-9531). Patient information was deidentified and stored in the Toronto Lung Transplant Program (TLTP) Database (#11-0170) and samples were collected as part of the TLTP biobank (#11-0509).

Lung explant samples were collected between 2015 and 2018, at the time of retransplantation from 8 patients who underwent a second LTx for end-stage CLAD at our center (4 BOS and 4 RAS). The CLAD phenotype was adjudicated for each patient at the time of retransplantation and was based on obstruction and/or restriction on pulmonary function test and presence or absence of fibrosis-like opacities on imaging, as previously described.(27) The clinical management of CLAD during this time included conversion from cyclosporine to tacrolimus, an initiation of azithromycin, treatment of gastroesophageal reflux, treatment of infections, bronchodilators and inhaled corticosteroids, and referral for retransplantation when appropriate.(28,29)

For each patient with CLAD, we selected a biopsy from one upper lobe to get a better representativity of CLAD histological features in comparison to lower lobes, more frequently affected by infections, and regarding the quality of the tissue. For each sample, we selected three 1x1mm region of interest (ROI) centered on an airway, with aim to have different size of airway for each patient (calibre >600µm, 300-600µm and <300µm).

In addition, to serve as control samples, 4 lung biopsies were collected from patients undergoing lobectomy for suspected cancer (n=2) or from excess donor lung tissue obtained at the end of cold ischemic time during lung transplantation (n=2).

Lung tissue was inflated with and submerged in 10% formalin for 24 hours, followed by submersion in 70% ethanol for another 24 hours, followed by paraffin embedding. 4µM sections of paraffin-embedded lung tissue were placed on slides and stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) or Elastic-Trichrome stains.

The next step consisted to stain our samples with a panel of 35 heavy-metal-tagged antibodies (**table 1**), selected to identify structural and immune proteins of interest, and according to previous results obtained by *Chang et al* (23). With this study, we aimed to characterize in detail certain populations of bronchial epithelium (club cells, basal cells), by selecting antibodies specific for certain epithelial proteins (Pankeratin, E-cadherin and others more specific for the populations of interest: CCSP for club cells and p40 for basal cells). Our panel also included immune markers to identify subpopulations of immune cells involved in CLAD pathophysiology, notably certain subpopulations of B and T lymphocytes.

## **2.2. Heavy-metal-tagged antibody staining protocol**

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections were then prepared using the protocol followed by Chang et al.(22) Slides were baked at 60°C for 2 hours then dewaxed in xylene twice for 10 minutes. Samples were then hydrated in descending grades of ethanol (100%, 95%, 80%, 70%), 5 minutes each, then rinsed in ddH<sub>2</sub>O for 5 minutes. Slides were then inserted into preheated retrieval solution (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) (high pH) and incubate at 96°C for 30 minutes. Following the incubation, the tube containing the retrieval solution and slides was cooled down at room temperature for 45 minutes. After cooling, the sections were blocked using with 3% Bovine serum albumin (BSA) in Phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature for 1 hour. Samples were then incubated with antibody cocktail (a mix of metal-conjugated antibodies at concentrations specific for the assay, diluent: 0.5% BSA in PBS; volume: about 100 µl per 1 cm<sup>2</sup> tissue) at 4°C overnight in a hydration chamber (**table 1**). Samples were then washed three times in 0.1% Tween-20 in PBS for 5 minutes, three times in PBS for 5 minutes and stained with Ir-Intercalator (1:3,000) 5fluidigm) in PBS at room temperature for 30 minutes. The samples were then rinsed in PBS for 5 minutes and in ddH<sub>2</sub>O for 1 minutes before IMC analysis. Described in their own study. The 3 regions of interest selected for each stained tissue slides were ablated using the Hyperion Imaging System (Fluidigm) at a laser frequency of 200Hz with a power range of 3.5-4.5. The ablation procedure produced.txt and.mcd files which were used in the analysis.(30)

## **2.3. IMC data acquisition, image visualization and data analysis**

The IMC data acquisition protocol is similar to what was used in previous studies.(22,31) All the acquired data are based on raw measurements, were not transformed and were exported from the mass cytometer in text format. We acquired multichannel images using the Hyperion Tissue Imager and converted the IMC data into single-page TIFF files which were exported to MCD™ Viewer software (Fluidigm, Markham, Canada). Three markers at a time were visualized to facilitate data analysis and structure identification such

as stroma and epithelium. Thereafter, a detailed analysis of the cells populations present within the ROIs of the 3 phenotypes was performed. To achieve this, a tissue cell segmentation was performed using CellProfiler™ software (Broad institute). Specific pipelines and algorithms were created to identify nuclei as primary objects and cells as secondary objects, then used to distinguish individual cells and specific structures such as stroma, epithelium and immune cells. Cells masks were created to separate all cells from each other and then exported to Histocat™ software v.1.76 (Fluidigm, Markham, Canada) for a high-dimensional single-cell analysis. Raw data were examined directly and pseudocolored to identify individual markers.

Similarly to Ung et al (26), an unsupervised clustering and aggregation of single cell data from the entire study population was completed using t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) transformation, a nonlinear dimensionality reduction useful for high-dimensional data, and the Phenograph function in Histocat.

We aimed to assess spatial, single cell pairwise neighbor interactions (relative proximity and avoidance) between 122istoCAT122h clusters, examined using the validated neighborhood analysis function in Histocat.

The quantification results of the different cell types shown in the results were obtained by manual cell counting.

#### **2.4. Statistical analysis**

The Mann–Whitney U test was used to compare two groups and comparison of proportions was made using the Chi-square test. Multiple groups were compared using the Kruskal–Wallis test, followed by, when appropriate, a pairwise comparison analysis using Mann-Whitney test to compare two specific groups (BOS to control, RAS to control, and RAS to BOS). Statistical significance was defined as a two-tailed P value  $\leq 0.05$ . Most analyses were conducted using Graphpad Prism version 9 for Windows (GraphPad, La Jolla, USA).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Study population

Samples were obtained from 4 patients with BOS, 4 patients with RAS and 4 patients included in the control group. Patient characteristics are summarized in **table 2** and did not differ significantly between BOS, RAS and controls.

#### 3.2. Morphological description of the samples

We selected one example to show of one ROI stained with HE for BOS (**figure 1A**), RAS (**figure 1B**) and controls (**figure 1C**). All the ROIs selected for the 3 groups can be seen in **figures S1 (BOS), S2 (RAS) and S3 (controls)**. In comparison with controls, peri-airway fibrosis and obliterative airway fibrosis were more frequently observed within CLAD samples. The degree of parenchymal fibrosis seemed to be more important in RAS samples, especially RAS 3. The infiltration of immune cells looked more important within CLAD samples, especially with the peri-airway immune cell infiltration in the BOS samples, and the presence of lymphoid aggregates, especially in the RAS samples.

When comparing the three groups, the average total number of cells per sample was significantly higher in BOS samples ( $p=0.01$ ) (**figure S4A**), the average tissue surface did not differ ( $p=0.62$ ) (**Figure S4B**) and the average number of cells per  $\text{mm}^2$  was significantly higher in BOS ( $p=0.001$ ) (**Figure S4C**).

Highly detailed pictures were obtained using the MCD viewer™ software. Examples of images displaying structural proteins (E-cadherin in green, alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) in red and DNA in blue) are shown for BOS (**Figure 1D**), RAS (**Figure 1E**) and a control lung biopsy (**Figure 1F**). Alpha-SMA was used to improve the identification of the visible structures and was mainly expressed within the smooth bronchial and vascular muscles, and also expressed by myofibroblasts within in the fibrinous areas of the RAS sample. E-cadherin, an epithelial protein, was present within the bronchial and alveolar walls, but absent from the fibrinous and stromal tissue areas. The intensity of the E-cadherin

staining appeared higher in the control samples, as expected. There was a trend toward a higher frequency of epithelial cells in control samples ( $p=0.09$ ) (**Figure S4D**). When adjusting the number of epithelial cells to the length of the basal membrane, average values did not differ between BOS and controls, but we observed a trend toward lower values in RAS samples ( $p=0.45$ ) (**Figure S4E**).

Examples of images showing the expression of immune markers (CD45 for leukocytes, CD3 for T cells) are shown for BOS (**Figure 1G**), RAS (**Figure 1H**) and a control lung biopsy (**Figure 1I**). As shown in **figure 1G**, we observed an important infiltration of CD45+ immune cells around some airways within CLAD samples, mostly BOS, even if the frequency of CD45+ cells among all cells did not differ significantly between the three groups ( $p=0.17$ ) (**figure S4F**), neither for CD3+ T cells ( $p=0.07$ ) (**figure S4G**).

### 3.3. Single cell analysis and cell clusters identification

Another aim of our study was to compare the expression of the 35 markers between the different phenotypes and to perform a more detailed analysis of these markers expression at a single cell level. We used Histocat™ software (Fluidigm, Markham, Canada) to conduct a high-dimensional single-cell analysis of our data.

The 4 ROIs for each lung phenotype were merged to optimize the data analysis. To determine specific cell subsets identified by combinations of markers, we used tSNE to create a 2D representation of cells organised in 50 immune and non-immune clusters according to the similarity of their antibody-binding in 35-dimensional space (**figure 2A**). Examples of the expression of several structural and immune cell markers on the tSNE map are also shown for all the ROIs from all samples. The **figure S5** shows a representation of the expression of a selection of immune markers within the individualized tSNE maps for BOS, RAS and controls.

Details of the 50 cell clusters created semi-automatically according to the expression of the 35 markers are shown in the heatmap in **figure 2B**. Among these clusters, we were able to

identify specific cellular subpopulations, which could then be localized directly on the lung samples.

Several epithelial cell subpopulations were individualized, including epithelial club cells (Cluster 25: Pankeratin+, E-cadherin+ and CCSP+), as well as two basal cell subpopulations: a “classic” subpopulation (Cluster 22: Pankeratin+, E-cadherin+, p40+, and CD138+) and basal cells strongly expressing Ki67 (Cluster 40). The frequency of club cells from cluster 25 was significantly higher in control lung samples ( $p=0.006$ ) (**figure 3A**). We observed a trend towards a higher frequency of “classic” basal cells from cluster 22 in control samples ( $p=0.32$ ) (**figure 3B**), while Ki67+ basal cells from cluster 40 appeared to be more frequently present in CLAD samples, particularly RAS ( $p=0.20$ ) (**figure 3C**). Examples of the localization of these clusters on BOS, RAS and control samples are shown in **Figures 3D, 3E** and **3F** respectively.

We were also able to identify specific immune cell subpopulations. Our analysis revealed a cluster of memory CD8 T cells (cluster 6: CD45+CD3+CD8a+CD45RO+PD1+CD196+), a cluster of memory CD4 T cells (cluster 7: CD45+CD3+CD4+CD45RO+PD1+CD196+), and a cluster of regulatory T cells (cluster 41: CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3+CD45RO+). Among all CD3+ T cells, there was a trend towards a higher frequency of memory CD8 T cells and memory CD4 T cells in CLAD lung samples ( $p=0.06$  and  $p=0.32$  respectively) (**Figures 4A** and **4B**). On the other hand, there was a trend towards a higher frequency of regulatory T cells in RAS lung samples ( $p=0.13$ ) (**figure 4C**). Examples of the localization of these clusters on BOS, RAS and control samples are shown in **Figures 4D, 4E** and **4F** respectively.

A B-cell cluster was also precisely identified (cluster 8: CD45+CD20+PD1+CD196+). The frequency of cells in this B-cell cluster was significantly greater in CLAD lung samples, especially RAS ( $p=0.03$ ) (**Figure 5A**). Examples of the localization of this cluster on BOS, RAS and control samples are shown in **figures 5B, 5C** and **5D** respectively. The organization of the cells of the cluster 8 was of interest. Indeed, within some of our samples, we observed the presence of lymphocyte aggregates, considered as tertiary lymphoid organs, whose role in the development of allograft rejection is not clearly defined.(32-35) Our

analyses showed that the main cell population constituting these lymphocyte aggregates were B lymphocytes (cluster 8). As examples, **figures 5E** and **5F** show the cellular composition of two lymphocyte aggregates in one BOS and one RAS biopsy respectively, with a clear predominance of B cells (CD45+CD20+), a limited number of T cells (CD45+CD3+) being also observed.

#### 3.4. Neighborhood analysis

Our single-cell analysis also enabled us to perform a neighborhood analysis to assess the level of proximity between cell clusters. By selecting a specific cluster, we could determine the frequency of vicinity with every other cluster in all the regions of interest of the sample set. These results are represented as a clustergram (**Figures 6A and 7A**), where the X axis shows the two clusters analyzed, while the right Y axis shows all the regions of interest. The heatmap in **figure S6** shows the neighboring cell interactions between all cell clusters across all ROIs: red for significantly neighbored, blue for significantly avoided.

For the Ki67+ basal cell cluster (cluster 40) (**figure 6A**), analysis showed a frequent proximity to the cytotoxic memory T lymphocyte cluster (cluster 6) previously described, as well as a neutrophil cell cluster (Cluster 20: CD45+CD11b+Granzyme B+MPO+) in lung samples with CLAD. **Figure 6B** shows an example of the proximity of Ki67+ basal cells to these two immune cell subpopulations in a BOS sample, and **Figure 6C** in a RAS sample, put side by side with the same regions of interest stained in HE.

Neighborhood analysis of the other two bronchial epithelial cell clusters described above (cluster 22: basal cells and cluster 25: club cells) only revealed frequent proximity to other bronchial epithelial cell clusters.

We also analyzed the proximities of interest of the regulatory T cell cluster previously described (cluster 41) (**figure 7A**). We observed that these cells were frequently in close proximity to memory CD4+ T cells (cluster 7) as well as plasma cells (cluster 10: CD138+CD196+) some lung samples with CLAD. **Figures 7B** and **7C** show an example of



the proximity of these three immune cell types in a BOS and RAS sample respectively, put side by side with the same regions of interest stained in HE.

#### **4. DISCUSSION**

Our study aimed to assess the feasibility and interest of using Imaging mass cytometry on lung biopsies collected from CLAD-affected lung allografts. We performed several previous pilot studies, to optimize the protocol for preparing and antibody-labeling the lung biopsies. Our results showed that IMC is a powerful tool for precise localization of cells within lung tissue samples, allowing both hypothesis-driven comparisons as well as exploratory analyses. IMC enabled us to obtain high-quality images, with satisfactory results for almost all marker staining in terms of specificity.

As expected, we observed a strong expression of the epithelial markers within small airways and alveoli walls. We identified several subtypes of bronchial epithelial cell populations. The frequency of the different epithelial cell subtypes, determined from a manual count of the cells expressing these markers was, as expected, greater in control lung samples than in BOS and RAS lungs.

The quality of staining for most antibodies targeting immune cells (notably CD45, CD3, CD4, CD8a, CD20, CD45RO) was also satisfactory, making it possible to distinguish some T and B lymphocyte subpopulations, with a higher frequency in BOS and RAS samples. CD20+ B lymphocytes were mostly observed within lymphocyte aggregates, especially present in RAS lung samples.

We also performed a single-cell analysis and semi-automatically obtained 50 clusters of immune and non-immune cells based on their expression of each of the 35 markers in our panel. We observed a single cluster of club cells. The frequency of these cells was significantly lower in BOS and RAS lung samples compared with controls, in line with the data from previous studies.(17,36,37)

We also identified two clusters of basal cells. The first one, mainly found within the bronchiolar walls in the control lung samples. A second one, highly expressing Ki67, a marker of cellular activity, mainly found in lung samples with CLAD, especially in 3 RAS samples. The development of CLAD, and in particular the BOS phenotype, is essentially based on club cell and basal cell dysfunction, maybe secondary to an accelerated senescence of these cells. Basal cells play an important role as progenitors in the protection and renewal of the bronchial epithelium, and the onset of CLAD can lead to an apoptosis of the basal cells.(38) In a study assessing telomere dysfunction in bronchial epithelial cells in patients affected with CLAD, Naikawadi et al (39) observed that bronchial epithelial cells from lungs with CLAD had a shorter telomere length compared with normal lungs. These cells also exhibited an increased expression of senescence markers ( $\beta$ -galactosidase, p16, p21, p53), and the proportion of epithelial cells expressing Ki67+ was significantly increased in CLAD-affected lungs, synonymous with accelerated senescence caused by an increased activity.

Other studies have shown that telomere dysfunction can promote the development of pulmonary fibrosis outside the context of lung transplantation, limiting the regenerative capacity of bronchial and alveolar epithelial progenitor cells.(40,41) The identification of this subpopulation of Ki67+ basal cells in our results is consistent with these data.

Neighborhood analysis was also used to assess the proximity of Ki67+ basal epithelial cells to other observed clusters. It was interesting to note that certain subpopulations of inflammatory cells (neutrophils and T lymphocytes) were frequently in close proximity to the Ki67+ basal cells. Recently, a study showed that activation of JAK-STAT signaling led to up-regulation of major histocompatibility complex 1 in basal cells, leading to their apoptosis mediated by cytotoxic T lymphocytes.(42) Our results therefore confirm that basal cells occupy an important place in the pathophysiology of CLAD, and play a central role its development.

The neighborhood analysis also enabled us to observe frequent proximity between certain effector and regulatory immune cell subpopulations. However, the panel of antibodies selected for this study was not designed to perform a detailed study of the immune subpopulations involved in CLAD. Further studies will be needed to explore this more in detail.

To our knowledge, this is the first study performed to assess the use of IMC on CLAD-affected lung allografts. Our results confirmed that this technique is a powerful tool, capable of providing large quantities of detailed data, and of carrying out “single cell” analysis by establishing cell clusters, enabling more precise identification of different immune and non-immune cell subpopulations. There are, however, certain limitations to this study. It was a monocentric study, involving a limited number of patients. The samples were not randomly selected, but on the basis of their quality, and the areas of interest were chosen to be centred on airways of different calibres. Furthermore, cluster analysis showed that a certain number of clusters did not allow us to identify a precise cell subpopulation. The IMC technique enables us to obtain a very large amount of data from a limited number of samples. However, to avoid over-interpretation of the results, it seems necessary to establish a clear research hypothesis and precise objectives beforehand.

We confirmed with this study that IMC is a highly effective tool for lung graft analysis, particularly during CLAD, enabling a new approach to studying the immune and non-immune cell subpopulations present within the lung allograft. The identification of several specific cell clusters allowed us to better define the nature, location and proximity relationships between certain epithelial cell and immune cell subpopulations. IMC can be completed on existing formalin-fixed paraffin-embedded tissue slides, in addition to other techniques such as immunohistochemistry, immunofluorescence and classic macroscopic histological analysis. This is a preliminary study, and further work will be needed to further optimize analyses using this technique.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Toronto Lung Transplant Program Database team for help with clinical data extraction and the Toronto Lung Transplant Program Biobank team for help with sample retrieval. They would also like to thank all the staff, fellows and students who helped with collection and processing of the human CLAD and control lungs, often at odd hours of the night: Hisashi Oishi, Jussi Tikkanen, Tatsuaki Watanabe, Yohei Taniguchi, Alexander Tigert, Liran Levy, Allen Duong, Matthew White, Mitsuaki Kawashima, Akihiro Takahagi, Kristen Boonstra, Napoleon Law.

## **Funding sources**

This research was supported by a “Fondation du souffle” research grant (BRP), a “Le nouveau souffle” research grant (BRP), and a Cystic Fibrosis Foundation grant (to TM and SJ).

## **Disclosure**

BRP has received a research grant from Elivie.

TM has received CCSP-related research material from APCBio Innovations Inc and collaborates with Trove Therapeutics Inc. These relationships are not directly related to this study. Otherwise, the authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

1. Sato M. Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome after lung transplantation: why are there two distinct forms of chronic lung allograft dysfunction? *Ann Transl Med.* 2020 Mar;8(6):418.
2. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2011 Jul;30(7):735–42.
3. Verleden GM, Glanville AR, Lease ED, Fisher AJ, Calabrese F, Corris PA, 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.
4. 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 Feb;33(2):127–33.
5. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2014 Oct;33(10):1009–24.
6. Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, 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.* 2017 Oct;36(10):1047–59.
7. Glanville AR, Verleden GM, Todd JL, Benden C, Calabrese F, Gottlieb J, et al. Chronic lung allograft dysfunction: Definition and update of restrictive allograft syndrome-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2019 May;38(5):483–92.
8. Paraskeva M, McLean C, Ellis S, Bailey M, Williams T, Levvey B, et al. Acute fibrinoid organizing pneumonia after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jun 15;187(12):1360–8.
9. Verleden SE, Von Der Thüsen J, Van Herck A, Weynand B, Verbeken E, Verschakelen J, et al. Identification and characterization of chronic lung allograft dysfunction patients with mixed phenotype: A single-center study. *Clin Transplant.* 2020 Feb;34(2):e13781.
10. Vanstapel A, Verleden SE, Verbeken EK, Braubach P, Goos T, De Sadeleer L, et al. Beyond Bronchiolitis Obliterans: In-Depth Histopathologic Characterization of Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplantation. *J Clin Med.* 2021 Dec 25;11(1):111.
11. Byrne D, Nador RG, English JC, Yee J, Levy R, Bergeron C, et al. Chronic Lung Allograft Dysfunction: Review of CT and Pathologic Findings. *Radiol Cardiothorac Imaging.* 2021 Feb;3(1):e200314.
12. Towe C, Chester Ogborn A, Ferkol T, Sweet S, Huddleston C, White F, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome is not specific for bronchiolitis obliterans in pediatric lung transplant. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2015 Apr;34(4):516–21.

13. Martinu T, Oishi H, Juvet SC, Cypel M, Liu M, Berry GJ, et al. Spectrum of chronic lung allograft pathology in a mouse minor-mismatched orthotopic lung transplant model. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2019 Jan;19(1):247–58.
14. Weigt SS, DerHovanesian A, Wallace WD, Lynch JP, Belperio JA. Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013 Jun;34(3):336–51.
15. Borthwick LA, Suwara MI, Carnell SC, Green NJ, Mahida R, Dixon D, 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*. 2016;16(6):1751–65.
16. Banerjee B, Ling KM, Sutanto EN, Musk M, Yerkovich ST, Hopkins PMA, 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*. 2011 Oct;30(10):1175–85.
17. Kelly FL, Kennedy VE, Jain R, Sindhvani NS, Finlen Copeland CA, Snyder LD, et al. Epithelial clara cell injury occurs in bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2012 Nov;12(11):3076–84.
18. Borthwick LA, Corris PA, Mahida R, Walker A, Gardner A, Suwara M, et al. TNF $\alpha$  from classically activated macrophages accentuates epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013 Mar;13(3):621–33.
19. Renaud-Picard B, Vallière K, Toussaint J, Kreutter G, El-Habhab A, Kassem M, et al. Epithelial-mesenchymal transition and membrane microparticles: Potential implications for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transpl Immunol*. 2020 Apr;59:101273.
20. Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, et al. Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 2014 Mar 1;23(131):118–30.
21. Davis AS, Richter A, Becker S, Moyer JE, Sandouk A, Skinner J, et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2014 Jun;62(6):405–23.
22. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Straus R, Baranov VI, Hedley DW. Biodistribution of cisplatin revealed by imaging mass cytometry identifies extensive collagen binding in tumor and normal tissues. *Sci Rep*. 2016 04;6:36641.
23. Chang Q, Ornatsky O, Hedley D. Staining of Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues with Metal-Labeled Antibodies for Imaging Mass Cytometry Analysis. *Curr Protoc Cytom*. 2017 Oct 2;82:12.47.1-12.47.8.
24. Cao Y, Chang Q, Zhang W, Ornatsky O, Hedley D, Chen EX. Skin platinum deposition in colorectal cancer patients following oxaliplatin-based therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Dec;84(6):1195–200.
25. Muranushi H, Shindo T, Chen-Yoshikawa TF, Yoshizawa A, Ngo HT, Gochi F, et al. Dual inhibition of the MEK/ERK and PI3K/AKT pathways prevents pulmonary GVHD suppressing perivenulitis and bronchiolitis. *Blood Adv*. 2022 Apr 25;bloodadvances.2021006678.

26. Ung N, Goldbeck C, Man C, Hoeflich J, Sun R, Barbetta A, et al. Adaptation of Imaging Mass Cytometry to Explore the Single Cell Alloimmune Landscape of Liver Transplant Rejection. *Front Immunol*. 2022;13:831103.
27. Levy L, Huszti E, Renaud-Picard B, Berra G, Kawashima M, Takahagi A, et al. Risk assessment of chronic lung allograft dysfunction phenotypes: Validation and proposed refinement of the 2019 International Society for Heart and Lung Transplantation classification system. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2020 Aug;39(8):761–70.
28. Levy L, Huszti E, Tikkanen J, Ghany R, Klement W, Ahmed M, et al. The impact of first untreated subclinical minimal acute rejection on risk for chronic lung allograft dysfunction or death after lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2020 Jan;20(1):241–9.
29. Berra G, Farkona S, Mohammed-Ali Z, Kotlyar M, Levy L, Clotet-Freixas S, et al. Association between the renin-angiotensin system and chronic lung allograft dysfunction. *Eur Respir J*. 2021 Oct;58(4):2002975.
30. Schapiro D, Jackson HW, Raghuraman S, Fischer JR, Zanotelli VRT, Schulz D, et al. histoCAT: analysis of cell phenotypes and interactions in multiplex image cytometry data. *Nat Methods*. 2017 Sep;14(9):873–6.
31. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, Zivanovic N, Jacobs A, Hattendorf B, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):417–22.
32. Koenig A, Thauinat O. Lymphoid Neogenesis and Tertiary Lymphoid Organs in Transplanted Organs. *Front Immunol*. 2016;7:646.
33. Vandermeulen E, Lammertyn E, Verleden SE, Ruttens D, Bellon H, Ricciardi M, et al. Immunological diversity in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction: a comprehensive immunohistochemical analysis. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2017 Feb;30(2):134–43.
34. Hsiao HM, Li W, Gelman AE, Krupnick AS, Kreisel D. The Role of Lymphoid Neogenesis in Allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2016 Apr;16(4):1079–85.
35. Sato M, Hirayama S, Hwang DM, Lara-Guerra H, Wagnetz D, Waddell TK, et al. The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jun 1;182(11):7307–16.
36. Todd JL, Weber JM, Kelly FL, Neely ML, Nagler A, Carmack D, et al. Early posttransplant reductions in club cell secretory protein associate with future risk for chronic allograft dysfunction in lung recipients: results from a multicenter study. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2023 Jun;42(6):741–9.
37. Liu Z, Liao F, Scozzi D, Furuya Y, Pugh KN, Hachem R, et al. An obligatory role for club cells in preventing obliterative bronchiolitis in lung transplants. *JCI Insight*. 2019 Apr 16;5(9):e124732, 124732.
38. Greenland JR, Wang P, Brotman JJ, Ahuja R, Chong TA, Kleinhenz ME, et al. Gene signatures common to allograft rejection are associated with lymphocytic bronchitis. *Clin Transplant*. 2019 May;33(5):e13515.

39. Naikawadi RP, Green G, Jones KD, Achar-Zadeh N, Mieszkowski JE, Arnould I, et al. Airway Epithelial Telomere Dysfunction Drives Remodeling Similar to Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020 Oct;63(4):490–501.
40. Alder JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tudor RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 21;112(16):5099–104.
41. Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, La JL, et al. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight*. 2016 Sep 8;1(14):e86704.
42. Khatri A, Todd JL, Kelly FL, Nagler A, Ji Z, Jain V, et al. JAK-STAT activation contributes to cytotoxic T cell-mediated basal cell death in human chronic lung allograft dysfunction. *JCI Insight*. 2023 Mar 22;8(6):e167082.



## TABLES

| Tag     | Marker              | Clone        |
|---------|---------------------|--------------|
| 141Pr   | <b>alphaSMA</b>     | 1A4          |
| 142Nd   | <b>CD68</b>         | KP1          |
| 143Nd   | <b>Vimentin</b>     | RV202        |
| 144Nd   | <b>CD14</b>         | EPR3653      |
| 145Nd   | <b>CD31</b>         | EPR3094      |
| 146Nd   | <b>CD16</b>         | EPR16784     |
| 147Sm   | <b>CD163</b>        | EDHu-1       |
| 148Nd   | <b>Pan-keratin</b>  | C11          |
| 149Sm   | <b>CD11b</b>        | EPR1344      |
| 150Nd   | <b>PD-L1</b>        | E1L3N        |
| 151Eu   | <b>IgM</b>          | Poly Rb      |
| 152Sm   | <b>CD45</b>         | D9M8I        |
| 153Eu   | <b>CD138</b>        | SDC1         |
| 154Sm   | <b>CD11c</b>        | Poly         |
| 155Gd   | <b>FoxP3</b>        | 236A/E7      |
| 156Gd   | <b>CD4</b>          | EPR6855      |
| 158Gd   | <b>p-STAT3</b>      | 4/P-STAT3    |
| 159Tb   | <b>p21</b>          | 12D1         |
| 160Gd   | <b>Vista</b>        | D1L2G        |
| 161Dy   | <b>CD20</b>         | H1           |
| 162Dy   | <b>CD8a</b>         | C8/144B      |
| 163Dy   | <b>CD196/CCR6</b>   | G034E3       |
| 164Dy   | <b>CCSP</b>         | 394324       |
| 165Ho   | <b>PD-1</b>         | EPR4877(2)   |
| 166Er   | <b>CD141</b>        | M80          |
| 167Er   | <b>GranzymeB</b>    | EPR20129-217 |
| 168Er   | <b>Ki-67</b>        | B56          |
| 169Tm   | <b>Collagen I</b>   | Goat Poly    |
| 170Er   | <b>CD3</b>          | Poly         |
| 171Yb   | <b>MPO</b>          | E1E71        |
| 172Yb   | <b>CD57</b>         | HCD57        |
| 173Yb   | <b>CD45RO</b>       | UCHL1        |
| 174Yb   | <b>E-cadherin</b>   | 24E 10       |
| 175Lu   | <b>CD25</b>         | EPR6452      |
| 176Yb   | <b>p40</b>          | Poly         |
| 191/3Ir | <b>Intercalator</b> |              |

**Table 1: panel of 35 heavy-metal-tagged antibodies used in our study.**

|  | Control    | BOS               | RAS *             | p value |
|--|------------|-------------------|-------------------|---------|
| <b>Age at transplant, median (IQR)</b>           | NA         | 19.5 (17.2, 30.7) | 20 (18.2, 21.7)   | 0.82    |
| <b>Age at CLAD onset, median (IQR)</b>           | NA         | 21.5 (18.5, 39.5) | 23 (22.2, 24.5)   | 0.68    |
| <b>Age at sample collection, median (IQR)</b>    | 37 (32,57) | 21.5 (19.2, 43.2) | 26.5 (24.5, 28.3) | 0.06    |
| <b>Patient sex, male (%)</b>                     | 3 (75%)    | 1 (25%)           | 3 (75%)           | 0.25    |
| <b>Sex match (D/R):</b>                          |            |                   |                   | 0.52    |
| M/F  | NA         | 1                 | 0                 |         |
| M/M  | NA         | 1                 | 1                 |         |
| F/F  | NA         | 2                 | 1                 |         |
| F/M  | NA         | 0                 | 1                 |         |
| <b>Primary disease:</b>                          |            |                   |                   |         |
| Cystic fibrosis                                  | NA         | 4                 | 4                 | >0.99   |
| <b>CMV matching (R/D):</b>                       |            |                   |                   | 0.18    |
| R-/D-  | NA         | 0                 | 1                 |         |
| R+/D- or R+/D+                                   | NA         | 1                 | 2                 |         |
| R-/D+  | NA         | 2                 | 0                 |         |
| <b>Donor age, mean (SD)</b>                      | NA         | 33.5 (19.2, 44)   | 42 (33, 45)       | 0.4     |
| <b>Transplant related scores:</b>                |            |                   |                   |         |
| A score, mean (SD)                               | NA         | 0.25 (0, 0.57)    | 0.2 (0.2, 0.38)   | >0.99   |
| B score, mean (SD)                               | NA         | 0.5 (0, 1)        | 0 (0.33)          | 0.4     |
| Infection score, mean (SD)                       | NA         | 0.27 (0.14, 0.46) | 0.41 (0.25, 0.42) | 0.62    |
| <b>Infectious status at the time of explant:</b> |            |                   |                   | 0.2     |
| No infection, n (%)                              | NA         | 3 (75%)           | 2 (50%)           |         |
| Colonization, n (%)                              | NA         | 1 (25%)           | 0                 |         |
| Active infection, n (%)                          | NA         | 0                 | 2 (50%)           |         |

**Table 2: characteristics of the patients included in our study.**

FIGURES

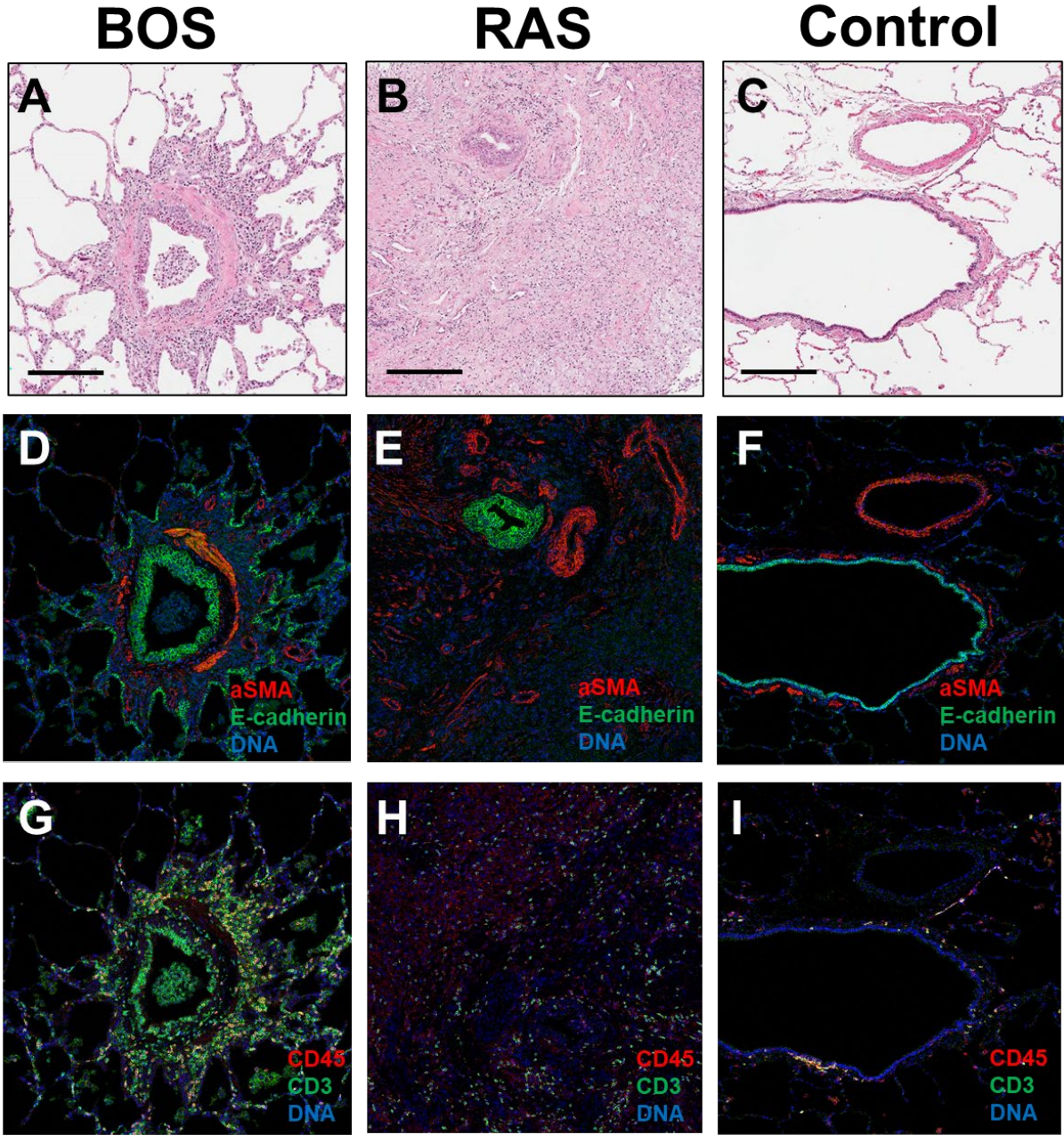
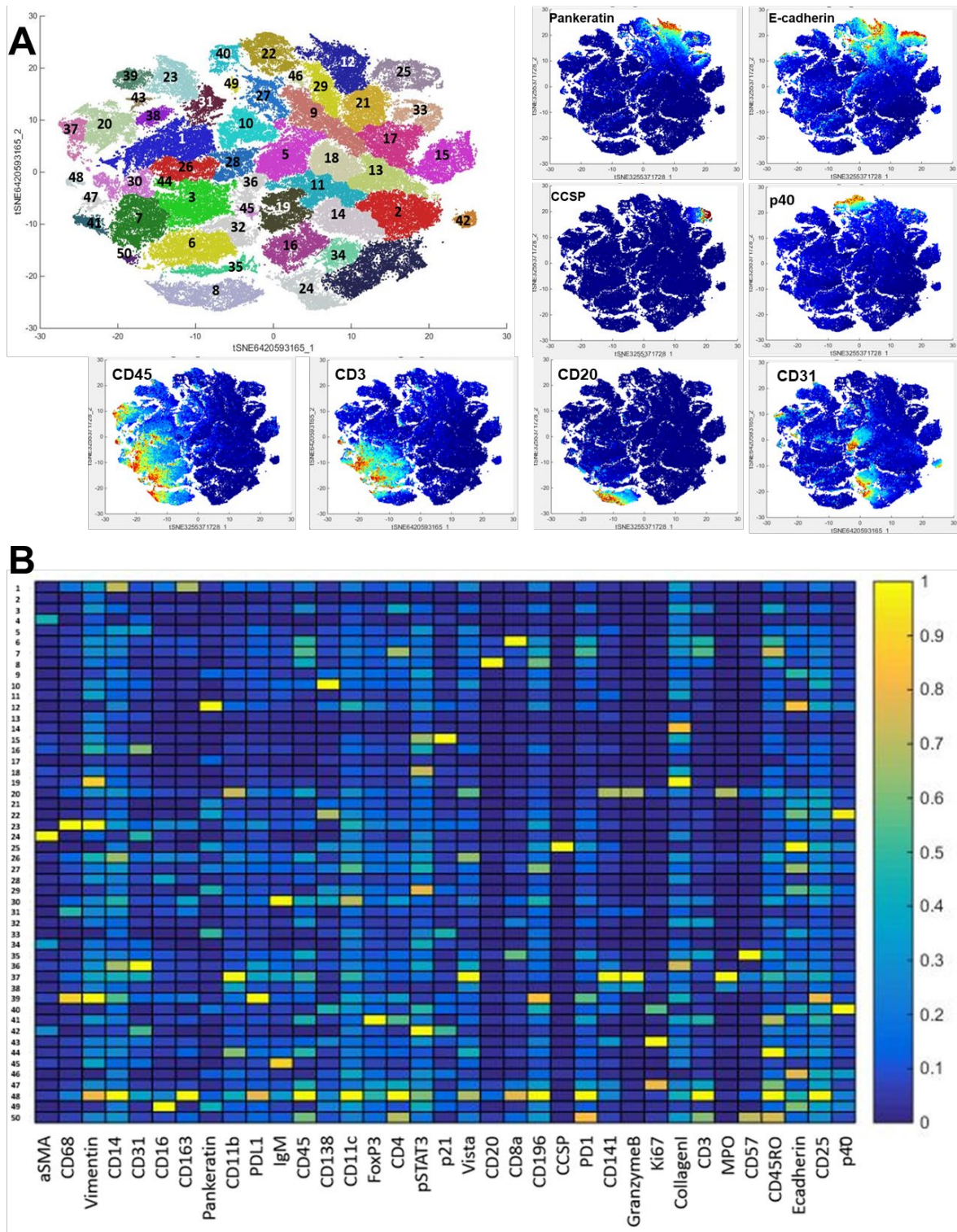
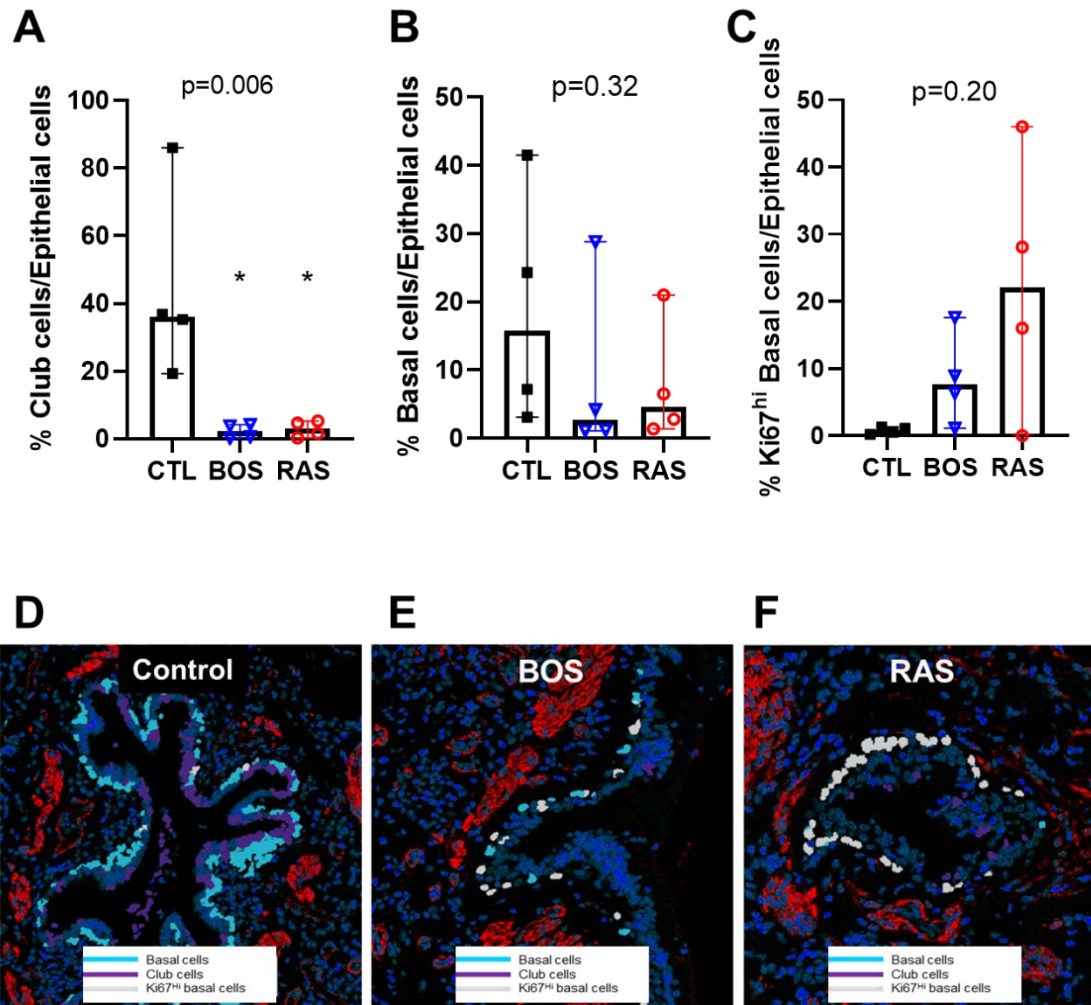


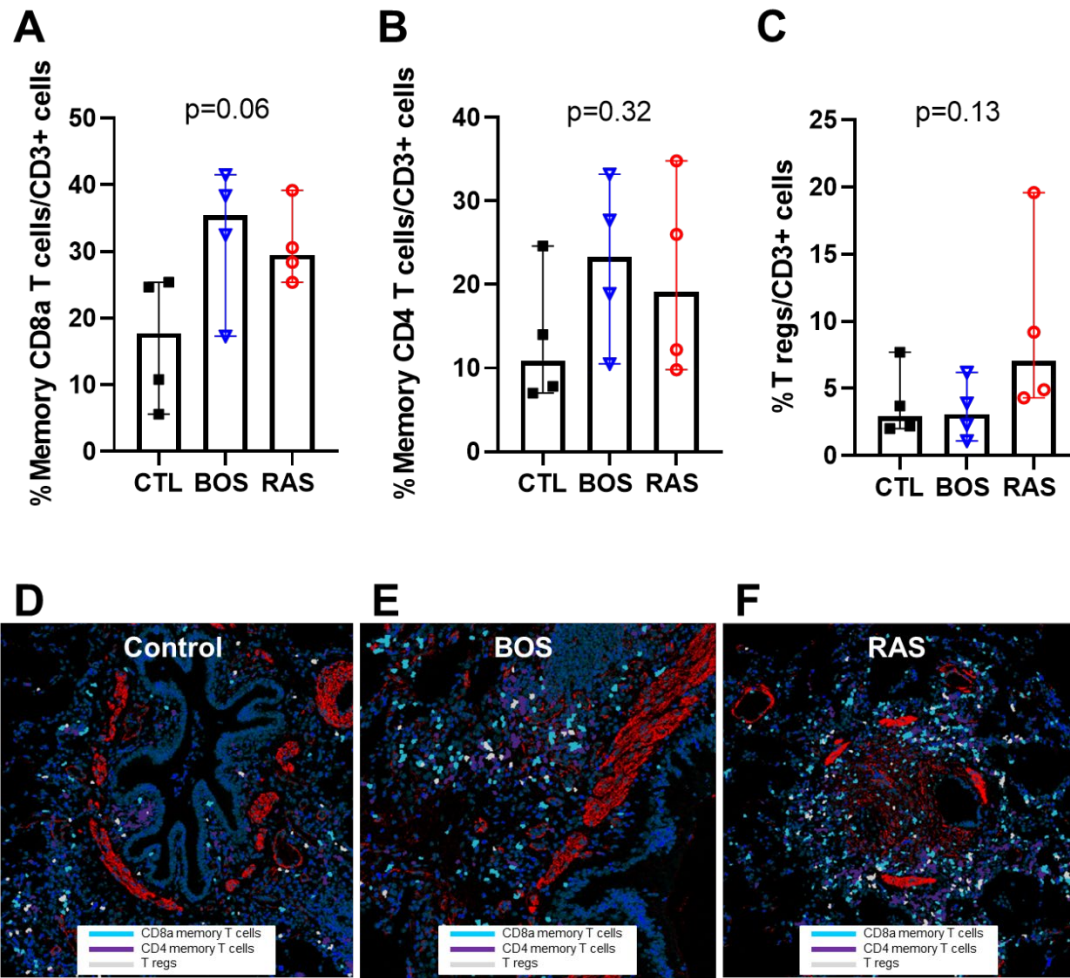
Figure 1: Examples of images obtained using Imaging mass cytometry on lung allograft samples with BOS, RAS and controls. A-C: Hematoxylin-eosin-stained images for BOS (A), RAS (B) and a control (C). D-F: Examples of images displaying structural proteins (E-cadherin in green, alpha-SMA in red for smooth muscle and DNA in blue) are shown for BOS (D), RAS (E) and a control lung biopsy (F). BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, aSMA: alpha-smooth muscle actin. Scale bar: 200  $\mu$ m.



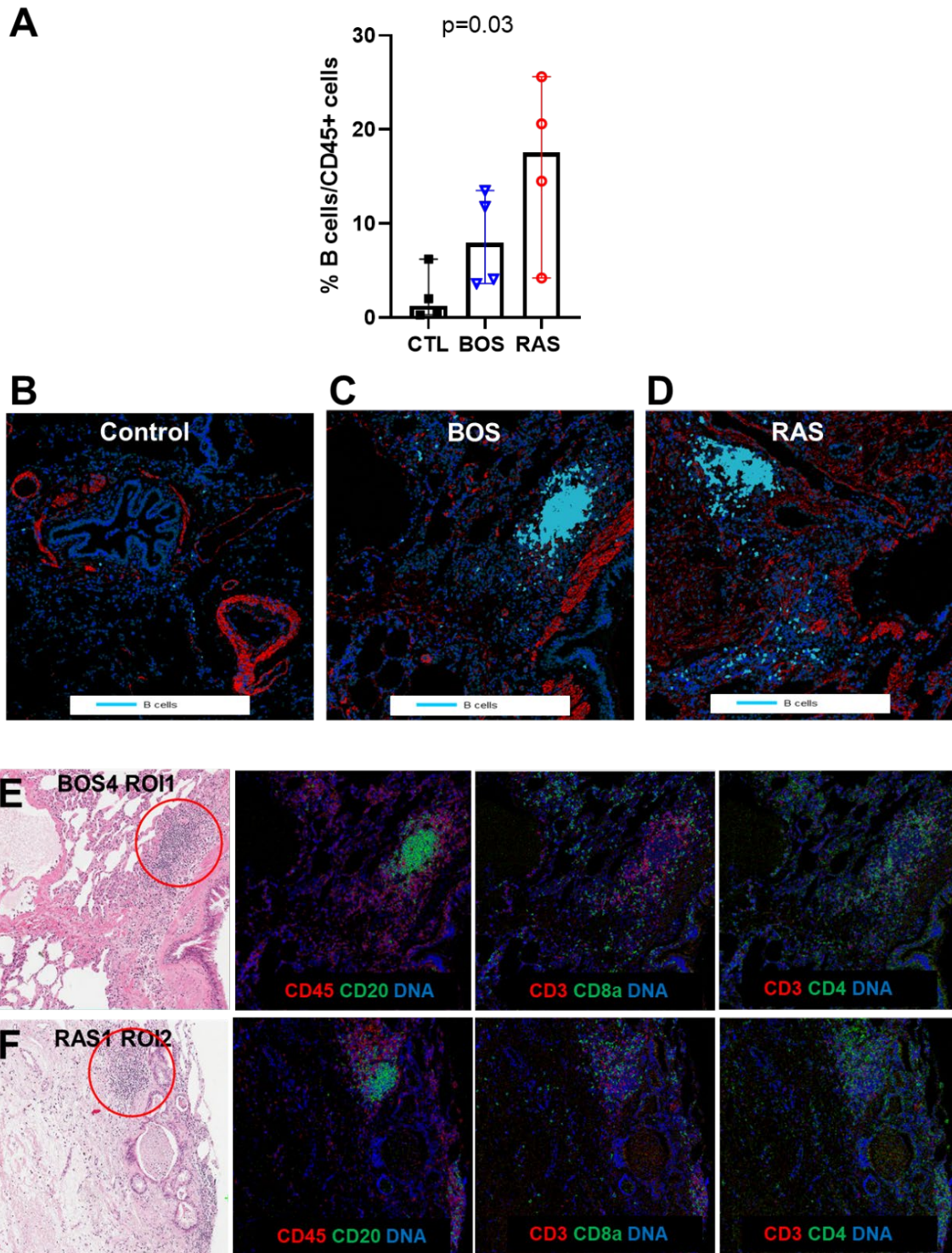
**Figure 2: Identification of immune and non-immune cell subpopulations, using a tSNE approach, with a 2-dimensional representation, and distribution into 50 clusters. A:** use of tSNE to create a 2D representation of cells organised in 50 immune and non-immune clusters according to the similarity of their antibody-binding in 35-dimensional space. Examples of the expression of several structural and immune cell markers on the tSNE map are also shown. **B:** heatmap showing the details of the 50 cell clusters, defined by the expression of the pa'e'l's 35 antibodies by all the cells from the 12 samples.



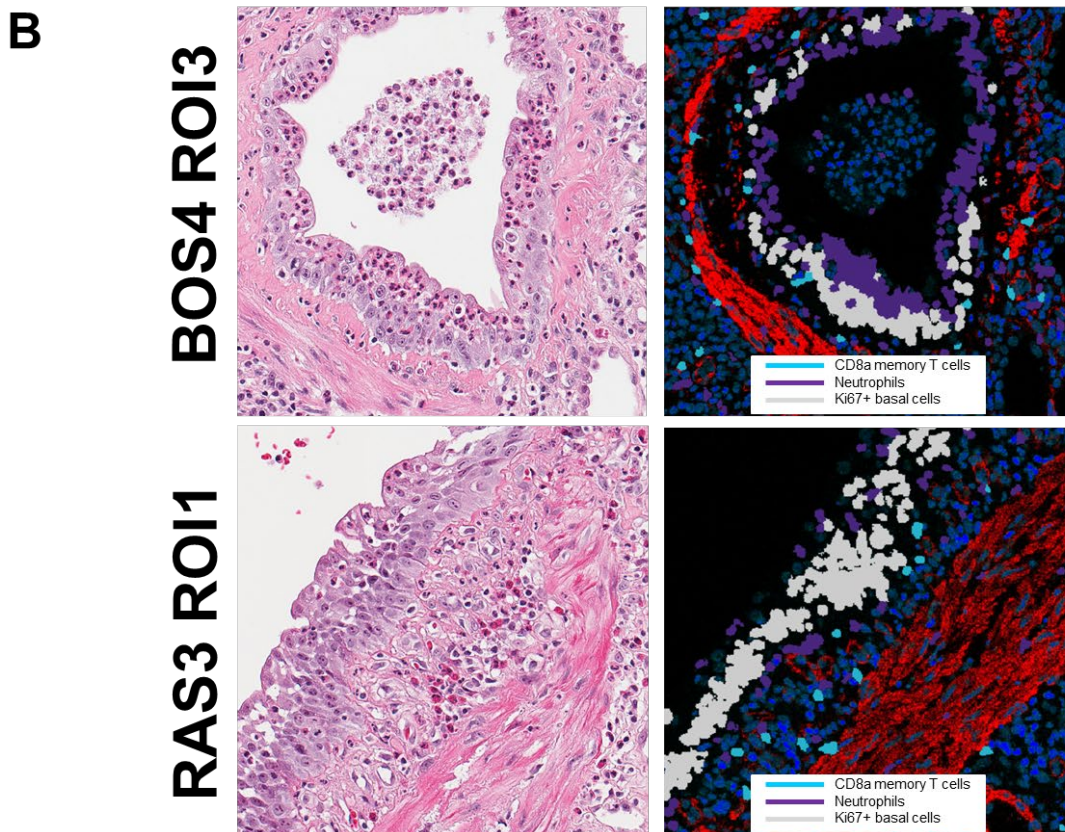
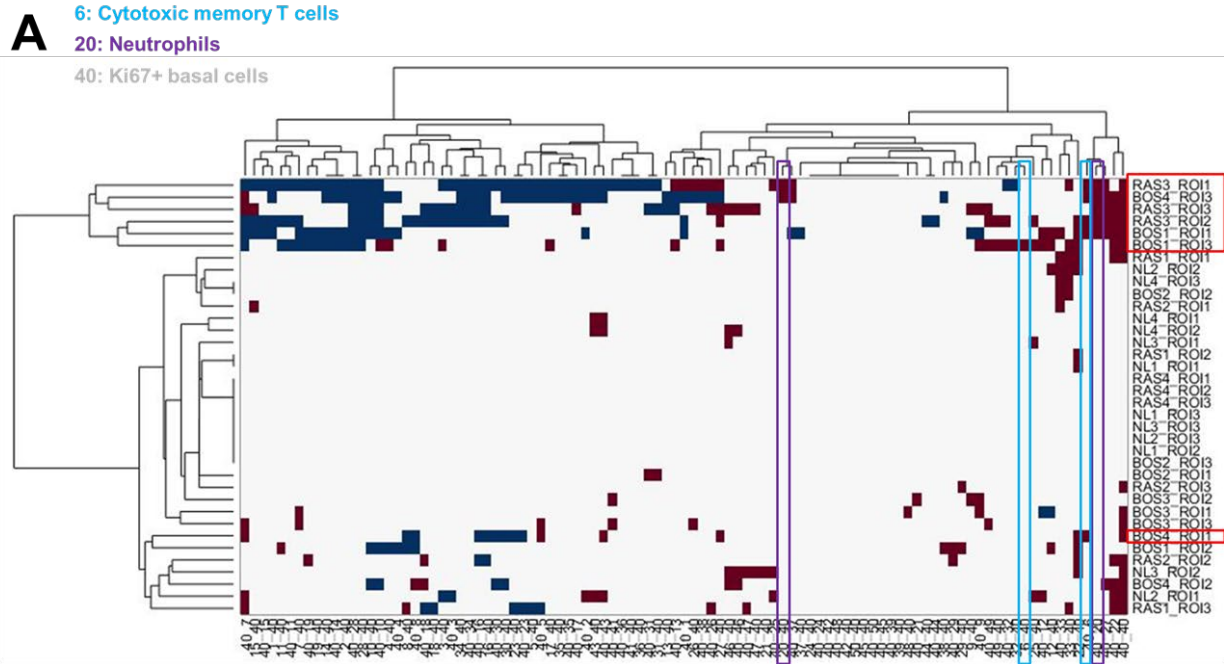
**Figure 3: quantification and visualization of 3 bronchial epithelial cell clusters. A:** frequency of club cells (cluster 25) among all epithelial cells (pankeratin+) in the 3 groups. **B:** frequency of basal cells (cluster 22) among all epithelial cells (pankeratin+) in the 3 groups. **C:** frequency of Ki67-expressing basal cells (cluster 40) among all epithelial cells (pankeratin+) in the 3 groups. Cell counts were obtained manually. **D-F:** examples of visualization of the 3 epithelial clusters of interest on a BOS, RAS and control area of interest. A post-hoc multiple comparative analysis using the Mann-Whitney test was performed after a non-parametric analysis with the Kruskal-Wallis test to compare results between three groups. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome.



**Figure 4: quantification and visualization of 3 T cell clusters. A:** frequency of memory cytotoxic T lymphocytes (cluster 6) among all CD3+ immune cells in the 3 groups. **B:** frequency of memory CD4+ T lymphocytes (cluster 7) among all CD3+ immune cells in the 3 groups. **C:** frequency of regulatory T lymphocytes (cluster 41) among all CD3+ immune cells in the 3 groups. Cell counts were obtained manually. **D-F:** examples of visualization of the 3 clusters of interest on a region of interest from one BOS, one RAS and one control. A post-hoc multiple comparative analysis using the Mann-Whitney test was performed after a non-parametric analysis with the Kruskal-Wallis test to compare results between three groups. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome.

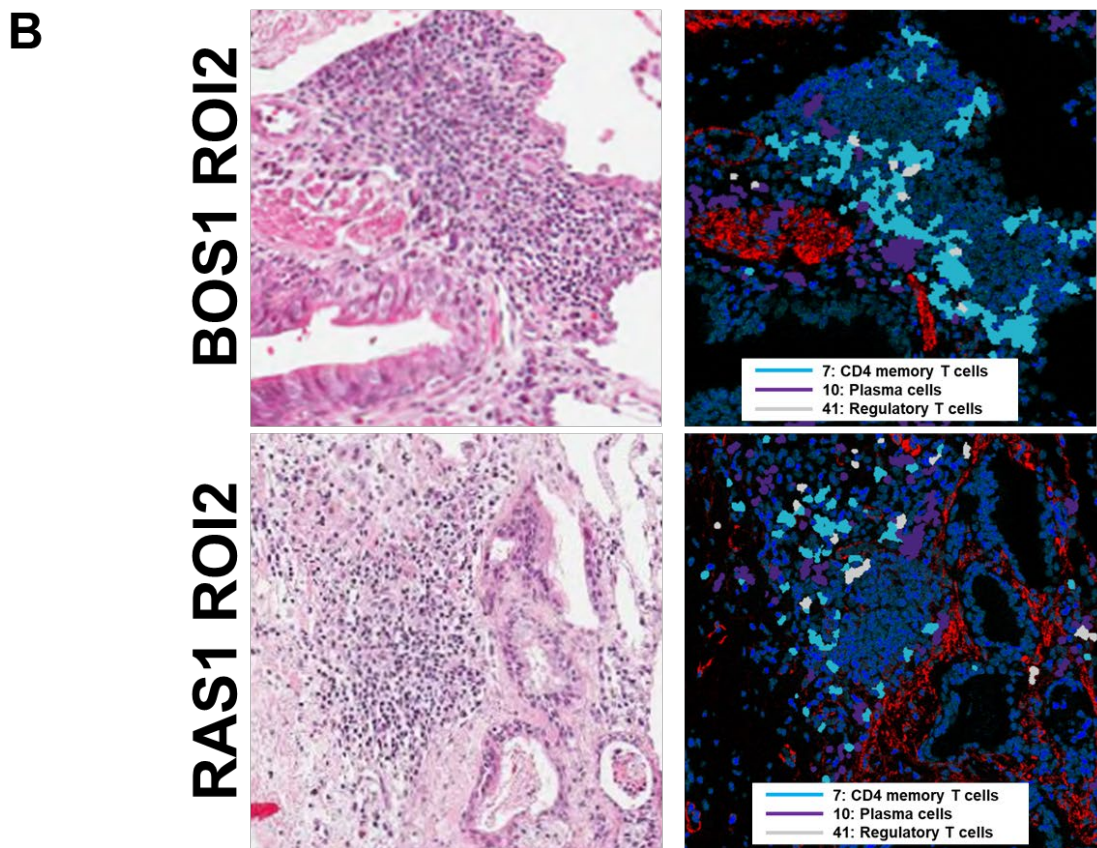
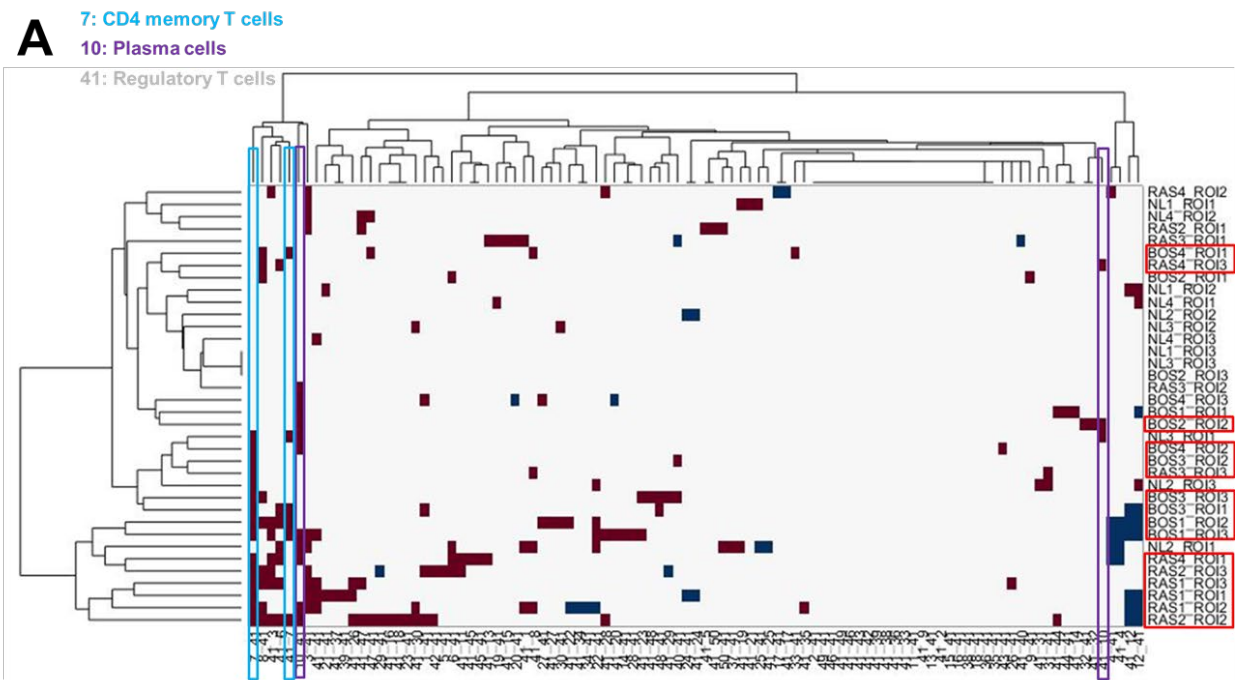


**Figure 5: quantification and visualization of the B immune cell cluster, and details of lymphocyte aggregates.** **A:** frequency of B lymphocytes (cluster 8) among all CD45+ immune cells in the 3 groups. Cell counts were obtained manually. **B-D:** examples of visualization of the 3 clusters of interest on a BOS, RAS and control area of interest. **E,F:** example of visualization of a lymphocyte aggregate on a BOS sample and a RAS (inside the red circle), with details of the immune cell populations. A post-hoc multiple comparative analysis using the Mann-Whitney test was performed after a non-parametric analysis with the Kruskal-Wallis test to compare results between the three groups. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome.

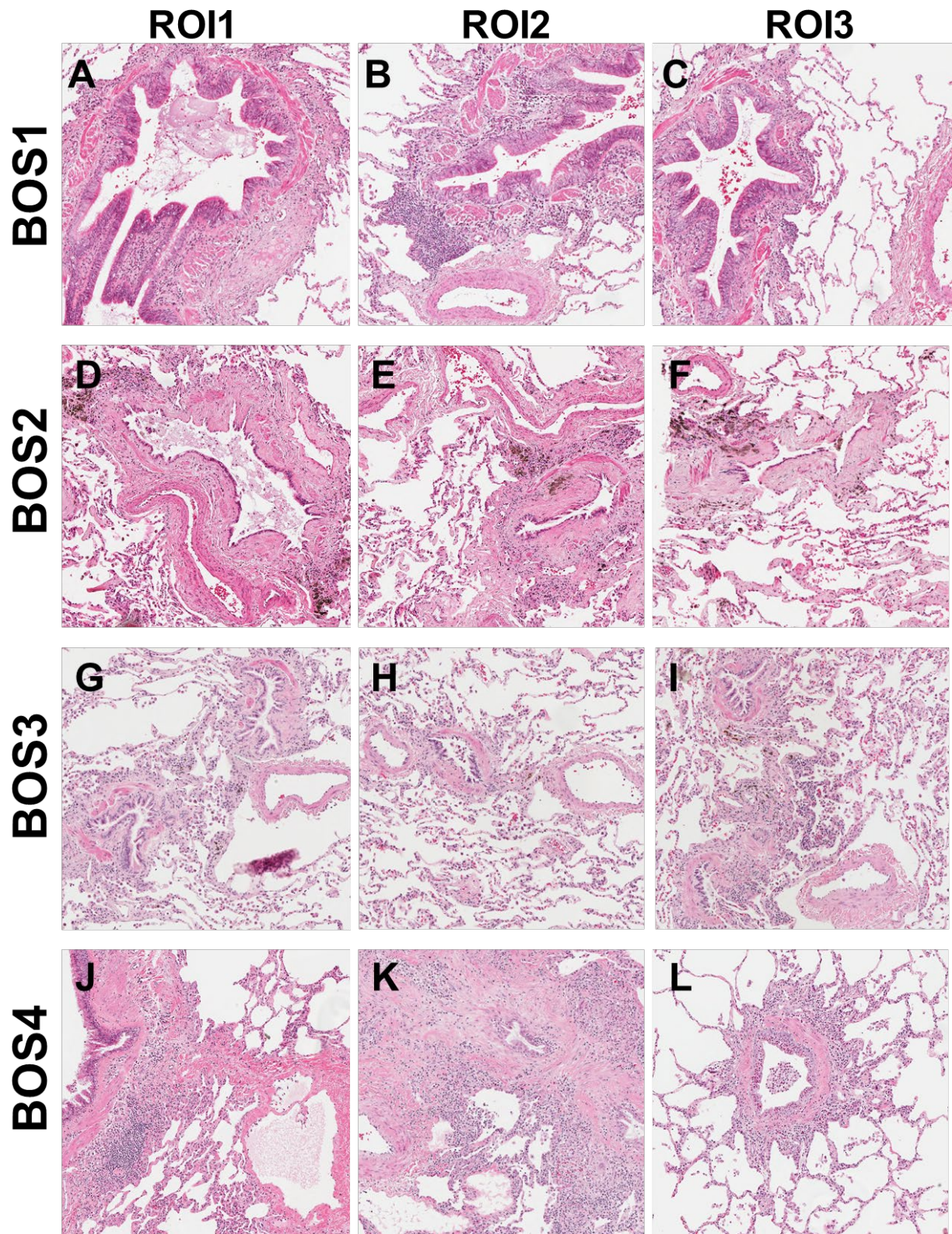


**Figure 6: Neighborhood analysis detailing the proximity of Ki67 basal cells (cluster 40) to other clusters of interest. A:** clustergram representing frequent (red) or infrequent (blue) proximities between Ki67+ basal cells and the 49 other clusters, in all the regions of interest. Examples of the proximity of Ki67+ basal cells to the cytotoxic memory T cells (cluster 6) and a cluster of polynuclear neutrophils (cluster 20) in a BOS sample (**B**), and in a RAS sample (**C**), put side by side with the same regions of interest stained in HE. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, ROI: region of interest.

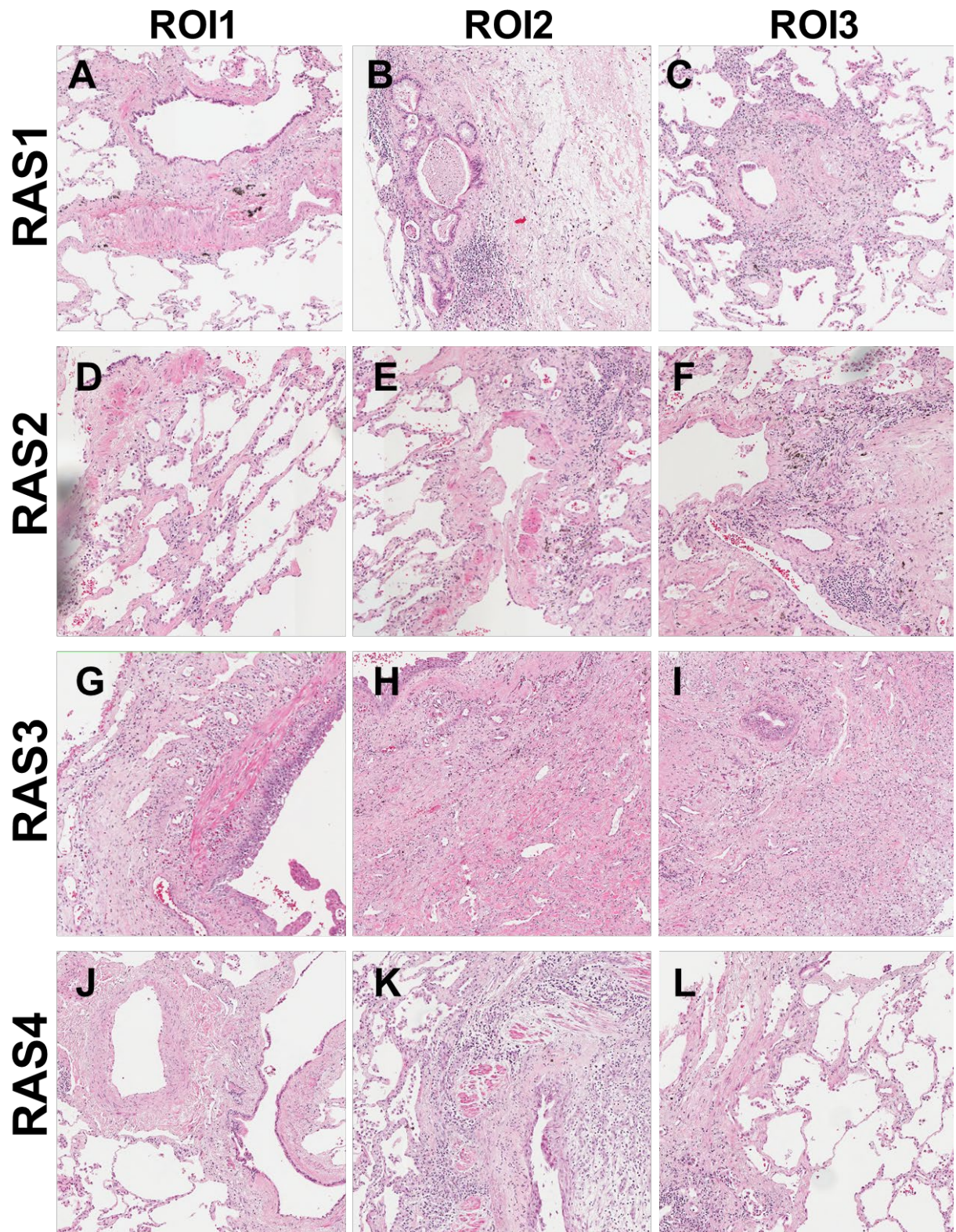




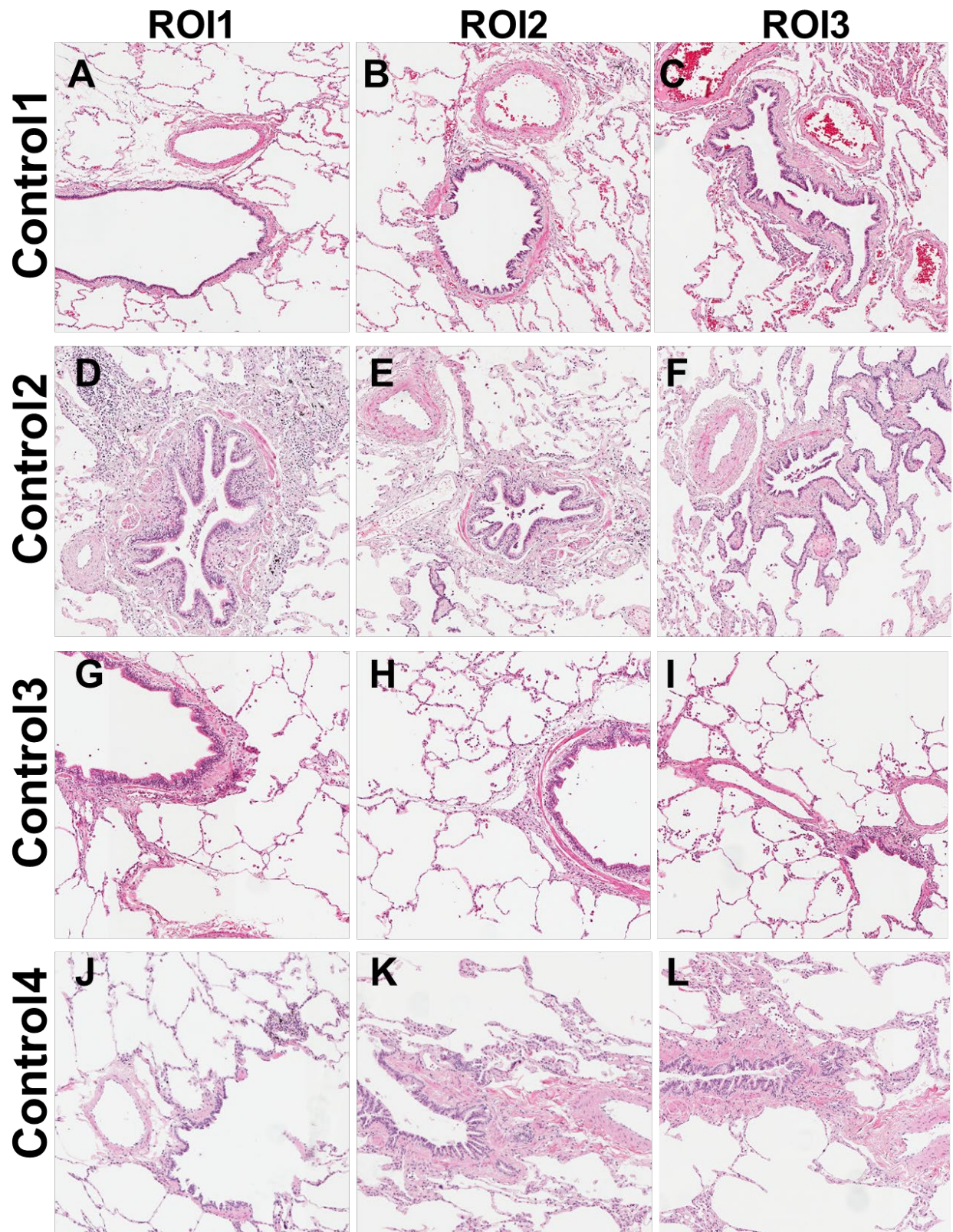
**Figure 7: Neighborhood analysis detailing the proximity of regulatory T cells (cluster 41) to other clusters of interest. A:** clustergram representing frequent (red) or infrequent (blue) proximities between regulatory T cells and the 49 other clusters, in all the regions of interest. Examples of the proximity of regulatory T cells to the CD4 memory T cells (cluster 7) and a cluster of plasma cells (cluster 10) in a BOS sample (**B**), and in a RAS sample (**C**), put side by side with the same regions of interest stained in HE. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, RAS: restrictive allograft syndrome, ROI: region of interest.



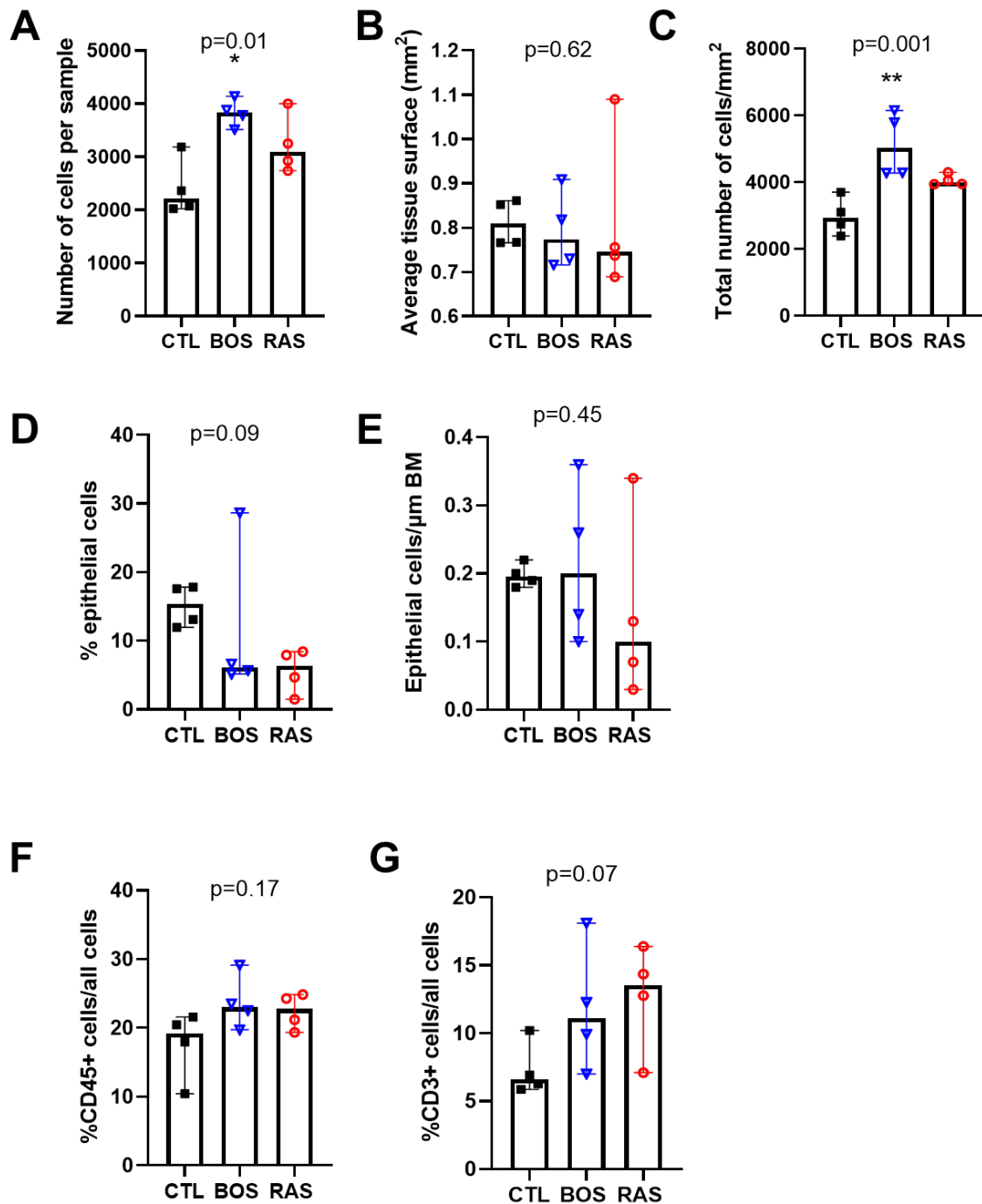
**Figure S1:** Visualization of the twelve 1x1mm size regions of interest selected from the 4 patients with Bronchiolitis obliterans syndrome.



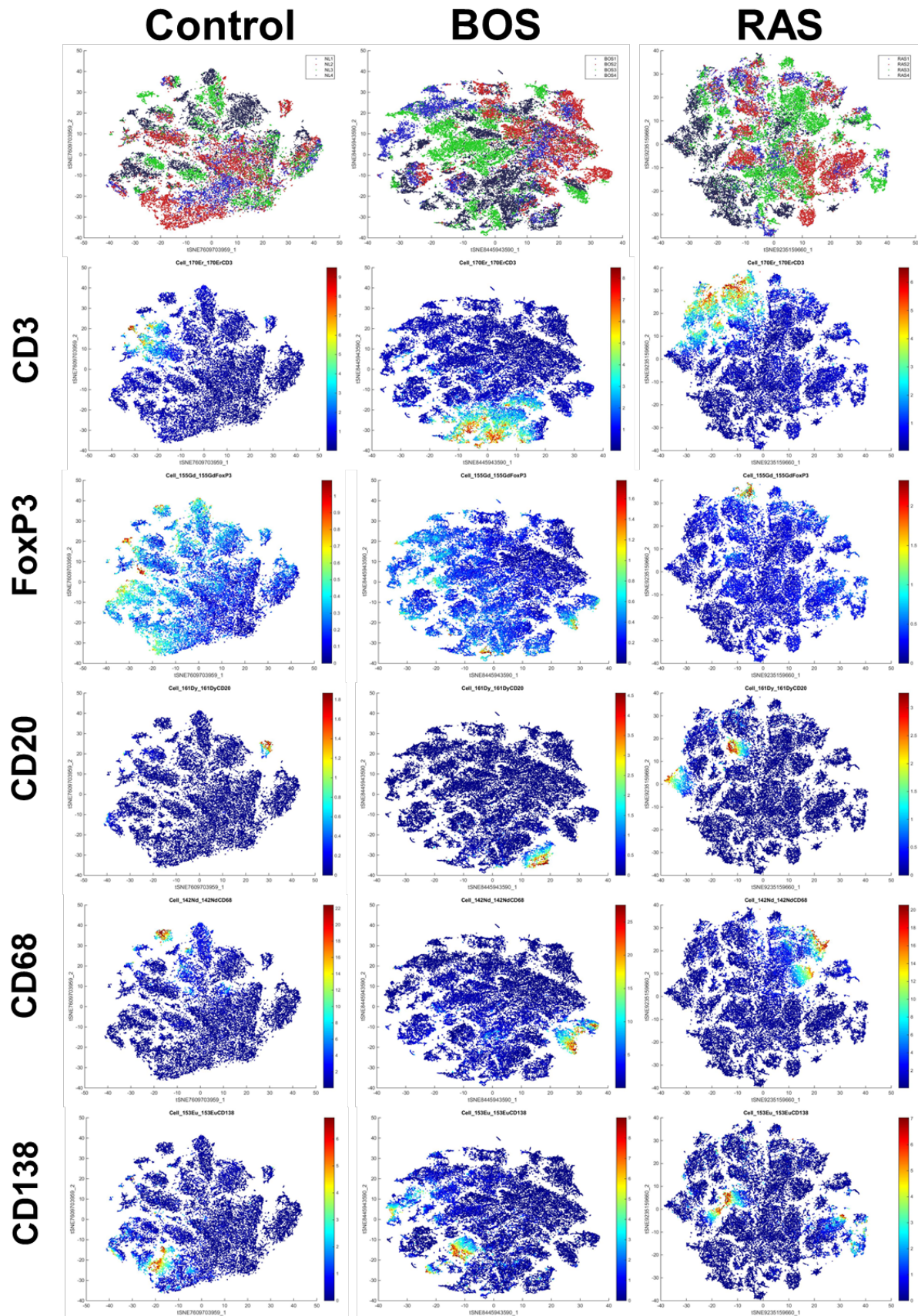
**Figure S2:** Visualization of the twelve 1x1mm size regions of interest selected from the 4 patients with Restrictive allograft syndrome.



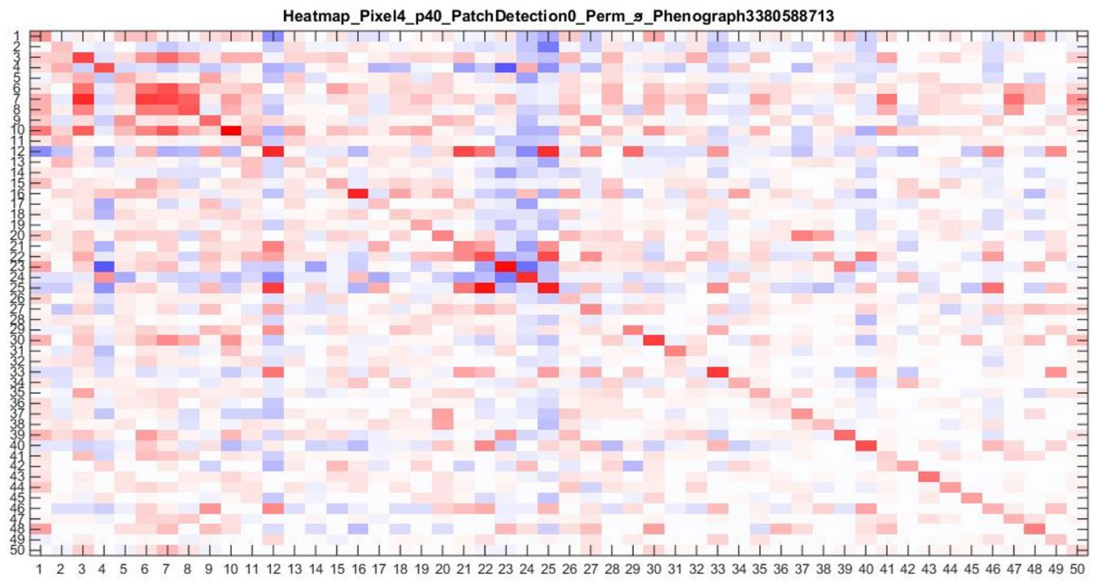
**Figure S3:** Visualization of the twelve 1x1mm size regions of interest selected from the 4 patients used as controls (2 collected during lobectomy, 2 collected from donor lungs at the end of the cold ischemic time).



**Figure S4: Comparison between all the samples from the 3 groups of patients. A:** the average total number of cells per sample was significantly higher in BOS samples ( $p=0.01$ ). **B:** the average tissue surface did not differ between the 3 groups ( $p=0.62$ ). **C:** the average number of cells per mm<sup>2</sup> was significantly higher in BOS ( $p=0.001$ ) compared to RAS and controls ( $p=0.001$ ). **D:** we observed a trend toward a higher frequency of epithelial cells in controls compared to CLAD samples. No difference was observed after adjusting to tissue surface (**E**). **F:** The frequency of CD45+ immune cells was not different between the 3 groups ( $p=0.17$ ). **G:** We observed a trend toward a higher frequency of CD3+ immune cells in CLAD samples compared to controls. A post-hoc multiple comparative analysis using the Mann-Whitney test was performed after a non-parametric analysis with the Kruskal-Wallis test to compare results between three groups.



**Figure S5:** Representation of the expression of a selection of immune markers within the tSNE maps for BOS, RAS and controls.



**Figure S6:** Heatmap showing neighboring cell interactions between all cell clusters across all the regions of interest: red for significantly neighbored, blue for significantly avoided.





# **Microparticules membranaires et bronchiolite oblitérante**



## **Article 3 : Transition épithélio-mésenchymateuse et microparticules membranaires : implications potentielles dans la bronchiolite oblitérante après transplantation pulmonaire.**

### **Contexte**

Une altération de la capacité de réparation de l'épithélium bronchique à la suite des agressions inflammatoires répétées post-TP pourrait jouer un rôle majeur dans le développement de la BOS. La répétition des lésions épithéliales bronchiques pourrait être responsable d'un dérèglement de la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), à l'origine d'un phénomène de cicatrisation excessif et une cause possible du recrutement des fibroblastes observé pendant la BOS. Des taux élevés de TGF- $\beta$ 1 ont été détectés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) 24 heures après la TP chez des patients ayant développé plus tard une BOS.(118) Le TGF- $\beta$ 1 favorise la production de MMP-9 et le dépôt de collagène-1 et de fibronectine.(194) Bortwick et al.(82) ont montré que le traitement de cellules épithéliales bronchiques avec du TGF- $\beta$ 1 favorisait l'émergence d'un phénotype mésenchymateux.

La dérégulation de la TEM pourrait être induite par des microparticules (MP) produites à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique cellulaire et ensuite libérées dans des fluides et tissus biologiques, à la suite d'une stimulation cellulaire physiologique ou pathologique.(126,195) Les MPs sont porteuses de la composition caractéristique de leur cellule parentale, comme les ARN, les miARN, les protéines ou le cytoplasme, et peuvent donc être impliquées dans la communication intercellulaire.(139,196) Dans les poumons, les MPs sont présentes dans la circulation sanguine pulmonaire et les voies respiratoires, principalement dans les expectorations et le LBA. Dans le contexte de la transplantation d'organes solides, des travaux ont montré que la concentration de MPs circulantes dans le sang était augmentée en situation de rejet aigu d'une greffe cardiaque, de rejet aigu humoral ou cellulaire à la suite d'une transplantation d'îlots pancréatiques ou de rejet aigu de greffe hépatique.(134,135,197)

Nous avons émis l'hypothèse que les MPs pourraient contribuer au dérèglement de la TEM et jouer un rôle dans l'apparition de la BOS après une TP. Nos objectifs étaient les suivants :

1. Confirmer la présence de la TEM dans les lésions de BOS à l'aide d'une analyse en immunohistochimie (IHC) à partir de biopsies de poumons explantés chez des patients retransplantés pour BOS sévère ;
2. Caractériser et phénotyper les MPs circulantes chez les patients transplantés pulmonaires, avec ou sans BOS, afin d'évaluer leur intérêt comme biomarqueurs ;
3. Évaluer le rôle potentiel des MPs dérivées de leucocytes dans le développement de la TEM dans les cellules épithéliales bronchiques humaines *in vitro*.

### **Matériel et méthodes**

Dans cette étude, une première analyse en immunohistochimie (IHC) a été réalisée sur des biopsies pulmonaires issues de poumons explantés de patients greffés pulmonaires suivis à Strasbourg, ayant bénéficié d'une deuxième TP pour le traitement d'une bronchiolite oblitérante. Ces biopsies étaient congelées et conservées dans le service d'anatomopathologie des hôpitaux universitaires de Strasbourg. Afin de rechercher des signes de transition épithélio-mésenchymateuse, nous avons sélectionné des anticorps ciblant des protéines épithéliales (E-cadhérine et Bêta-caténine), et des protéines exprimées par les cellules mésenchymateuses (Vimentine et alpha-SMA).

Nous avons également réalisé une étude de mesure et d'immunophénotypage des microparticules circulantes, chez 10 patients ayant bénéficié d'une première TP à Strasbourg (5 avec BOS et 5 sans BOS), sélectionnés de manière aléatoire. Le dosage et l'immunophénotypage concernait les MPs circulantes, issues des prélèvements sanguins réalisés dans le cadre du suivi systématique de ces patients.

Enfin, nous avons réalisé une étude de culture cellulaire d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B, soumises à différents types de stimuli, dont des cytokines pro-inflammatoires et des MPs membranaires produites par des monocytes humains THP-1, stimulées à l'aide de lipopolysaccharide (LPS) de *Pseudomonas*

*aeoruginosa*. L'objectif était d'étudier la survenue des manifestations de TEM sur les cellules BEAS-2B. Nous avons recherché l'apparition d'éventuelles modifications morphologiques, une modification de l'expression de protéines de surface (E-cadhérine et Vimentine) en Western blot, et une altération des capacités fonctionnelles de cellules BEAS-2B.

## **Résultats**

- **Analyse en IHC des protéines membranaires de la TEM**

Nous avons utilisé des biopsies pulmonaires collectées chez neuf patients greffés pulmonaires au CHU de Strasbourg entre 1995 et 2012, atteints d'une BOS terminale ayant nécessité la réalisation d'une deuxième TP, et deux biopsies témoins, collectées sur des lobes de poumon de donneur, sans anomalie notable, retirés au cours de la transplantation pour adaptation de la taille du greffon au gabarit du patient receveur (greffe lobaire).

Nous avons tout d'abord examiné les lames issues des prélèvements des patients témoins, indemnes de bronchiolite oblitérante. A l'examen des lames colorées en Hématoxyline-éosine (HE), nous avons observé des bronchioles de tailles variables, sans signes d'obstruction et la présence de quelques cellules inflammatoires disséminées dans le tissu pulmonaire, principalement au niveau péri-bronchiolaire. Le marquage avec la E-cadhérine au niveau des cellules épithéliales bronchiques montrait un signal important au niveau des parois latérales des cellules. Le marquage de la  $\beta$ -caténine était superposable à celui de la E-cadhérine. Le marquage de alpha-SMA et de la Vimentine n'était pas visible au sein de l'épithélium bronchiolaire normal.

Nous avons ensuite examiné les lames de nos patients atteints de BOS. La grande majorité des prélèvements présentaient un aspect histologique similaire, avec une atteinte des bronchioles dont la sévérité pouvaient varier chez un même patient, voire sur un même prélèvement. Nous avons observé des lésions de BO débutante : la lumière bronchiolaire était bien ouverte, ou très légèrement réduite. L'examen en HE ne retrouvait pas de modification majeure au sein de l'épithélium, qui conservait une organisation proche de celle des témoins. Le marquage de la E-cadhérine était présent au niveau de la paroi latérale de

la majorité des cellules épithéliales, mais d'une intensité moins importante comparée à celle des témoins. Le signal était plus marqué au niveau du pôle apical des cellules épithéliales. Le marquage de la  $\beta$ -caténine ne montrait quant à lui pas de changement notable comparé aux témoins. Nous avons observé l'apparition d'un signal intracytoplasmique de la Vimentine au sein de quelques cellules épithéliales, prédominant au niveau basal. La quantité de cellules épithéliales présentant ce marquage basal semblait plus importante dans les zones comportant un plus grand nombre de cellules inflammatoire.

Un nombre important de bronchioles présentaient une atteinte plus marquée, avec un phénomène de BO plus avancé : leur lumière était partiellement voire complètement obstruée par la présence de macrophages spumeux et de myofibroblastes. L'examen en HE montrait une désorganisation épithéliale importante, avec un aspect de desquamation voire de fragmentation par endroit. En raison d'un phénomène de métaplasie, l'aspect des cellules épithéliales était modifié avec une perte de leur aspect cylindrique et une majoration de la taille des noyaux. Le marquage de la E-cadhérine était nettement moins prononcé au niveau des parois latérales, voire absent, mais persistait par endroit au niveau apical. Le marquage de la  $\beta$ -caténine était également atténué mais dans une moindre mesure, et persistait au niveau des parois latérales. Le signal intracytoplasmique de la Vimentine décrit précédemment était toujours présent, au sein d'un nombre plus important de cellules épithéliales.

Enfin, nous avons observé de nombreuses cicatrices de bronchioles fibrosées, stigmates d'un phénomène de BO terminale, complètement achevé. L'épithélium était détruit, les marqueurs épithéliaux avaient complètement disparu. Il ne persistait que des myofibroblastes exprimant la Vimentine et  $\alpha$ -SMA.

- **Immunophénotypage des microparticules circulantes**

Nous avons inclus dix patients ayant bénéficié d'une première transplantation pulmonaire au CHU de Strasbourg entre 2008 et 2013 : cinq étaient atteints d'une bronchiolite oblitérante (groupe BO), cinq étaient indemnes (groupe témoin). L'analyse portait sur la

quantification et l'identification de l'origine des MPs circulantes. Tous les prélèvements ont été réalisés au cours de l'année 2014.

Afin de déterminer l'origine cellulaire des MPs, nous avons sélectionné plusieurs marqueurs d'intérêt : CD217 pour les lymphocytes T régulateurs, CD105 pour les cellules endothéliales activées, CD66 pour les polynucléaires neutrophiles et E-cadhérine comme marqueur épithélial. La concentration totale de MPs sériques (définie par le marquage d'Annexine 5) était inférieure dans le groupe BO ( $5.46 \pm 1.2$  nM PhtdSer versus  $8.34 \pm 1.6$  nM PhtdSer dans le groupe contrôle) ( $p=0.2$ ). La concentration des MPs porteuses de E-cadhérine chez les patients du groupe BO était inférieure ( $0.02 \pm 0.02$  nM PhtdSer) à celle des patients du groupe contrôle ( $0.12 \pm 0.02$ ) de manière significative ( $p = 0.007$ ). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux groupes concernant les autres marqueurs sectionnés.

- **Etude du modèle cellulaire**

Pour cette étude, nous avons mis en culture une lignée de cellules épithéliales humaines BEAS-2B, stimulées : 1) par des MPs émises par des monocytes humains THP-1 (avec – MP<sub>LPS</sub> – ou sans – MP<sub>CTL</sub> - stimulation par du LPS de *P. aeruginosa*), ou 2) par du TGF- $\beta$ 1 qui nous servait de contrôle positif pour déclencher un phénomène de TEM, avec ou sans utilisation de TNF-alpha associée ou 3) par de l'actinomycine D.

Sur le plan morphologique, nous avons observé les cellules 24h, 48h et 72h après la stimulation. Lorsque les cellules BEAS-2B étaient stimulées par l'association TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) + TNF-alpha (20ng/ml) ou par des MP<sub>LPS</sub>, elles perdaient leur aspect d'origine, adoptant une forme plus allongée, une perte de lien intercellulaire, sans perte d'adhésion à la boîte de culture, compatibles avec un phénotype mésenchymateux. La stimulation par TNF-alpha ou TGF- $\beta$ 1 seuls et par les MP<sub>CTL</sub> n'entraînait aucune modification morphologique. La stimulation par actinomycine D entraînait quant à elle une destruction cellulaire.

A l'aide d'une étude en Western Blot, nous nous sommes intéressés à l'expression de E-cadhérine, Vimentine et ikB après une stimulation pendant 72h par les MP<sub>LPS</sub>, MP<sub>CTL</sub> ou

TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) + TNF-alpha (20ng/ml). La stimulation cytokinique entraînait une baisse significative de l'expression de la E-cadhérine et de  $\kappa$ B, et une augmentation significative de l'expression de Vimentine, comparé à des cellules non stimulées. La stimulation par des MP<sub>LPS</sub> était à l'origine de résultats similaires, mais significatifs seulement pour la baisse de la E-cadhérine. Enfin, la stimulation par les MP<sub>CTL</sub> n'entraînait aucune modification.

Nous avons évalué la modification des capacités de migration des cellules BEAS-2B après les mêmes types de stimulation, à l'aide d'un scratch test. Nous avons observé une augmentation de la mobilité dans les cellules BEAS-2B stimulées avec le MP<sub>LPS</sub> dérivé de monocytes après 72 h par rapport aux cellules non stimulées.

## **Conclusion**

La BO est un phénomène de fibro-prolifération responsable d'une obstruction progressive de la lumière des bronchioles. Dans notre étude en IHC, la BO entraînait un aspect desquamatif, en « coup d'ongle » de l'épithélium, à type de métaplasie pouvant aller jusqu'à une destruction complète, un remplacement par des myofibroblastes associés à une diminution progressive du signal des marqueurs épithéliaux. Nous avons constaté au niveau des bronchioles atteintes par la BO qu'un signal de la Vimentine apparaissait au niveau intracytoplasmique plus important dans les zones où les bronchioles étaient en contact avec de nombreuses cellules inflammatoires. Cela confirme le rôle de l'inflammation dans les mécanismes de la TEM impliqués dans le développement de la BO. Enfin, dans les zones de BO terminale avec obstruction complète de la bronchiole, les myofibroblastes présents exprimaient fortement la Vimentine. Au total, nous pouvons qualifier la TEM au cours de la BO de phénomène séquentiel mais dont la chronologie reste difficile à déterminer avec précision, influencé par l'inflammation locale, avec une importante hétérogénéité inter- et intra-individu notamment dans l'ancienneté et la sévérité des lésions de BO.

Nous avons ensuite mesuré la concentration et caractérisé l'origine des MPs circulantes chez dix patients transplantés pulmonaires, dont cinq atteints d'une BO. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative entre nos patients témoins et ceux avec BO quant à la concentration totale de MPs, ni sur celle des MPs produites par les



LT, les cellules endothéliales et les PNN, peut-être secondaire au manque de puissance de notre étude. Nous avons observé une diminution significative de la concentration de MPs porteuses de E-cadhérine chez les patients atteints de BO. Cette constatation va dans le sens de notre hypothèse en faveur d'une diminution de l'expression des protéines épithéliales au cours de la BO, avec un rôle potentiel joué par les MPs. Après ces résultats préliminaires, une étude de plus grande ampleur avec des effectifs plus importants est nécessaire pour confirmer cette observation et affiner nos résultats. Nous pourrions alors envisager d'utiliser les MPs comme biomarqueurs précoces annonciateurs de la BO, accessibles par voie périphérique dans le cadre du suivi de nos patients.

*In vitro*, les MPs dérivées de monocytes et produites avec du LPS étaient associées à une diminution significative de l'expression de la E-cadhérine ainsi qu'à des modifications morphologiques et fonctionnelles significatives des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B . Les MPs pourraient jouer un rôle dans l'apparition de l'EMT dans l'épithélium bronchique après une TP.

Les MPs leucocytaires pourraient donc contribuer à la TEM des cellules épithéliales bronchiques dans un environnement inflammatoire caractéristique des épisodes infectieux et de rejet survenant après une transplantation pulmonaire. Il s'agit là d'un travail préliminaire et d'autres études devront être réalisées afin de confirmer l'ensemble de ces résultats.

Ce travail a été publié dans la revue *Transplant immunology*.(122)



# Epithelial-mesenchymal transition and membrane microparticles: potential implications for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation

Benjamin Renaud-Picard<sup>1,2,3</sup>, Kevin Vallière<sup>2</sup>, Justine Toussaint<sup>2</sup>, Guillaume Kreutter<sup>2</sup>, Ali El-Habhab<sup>2</sup>, Mohamad Kassem<sup>2</sup>, Fatiha El-Ghazouani<sup>2</sup>, Anne Olland<sup>2,3,4</sup>, Sandrine Hirschi<sup>1</sup>, Michele Porzio<sup>1</sup>, Marie-Pierrette Chenard<sup>5</sup>, Florence Toti<sup>2</sup>, Laurence Kessler<sup>2,3</sup>, and Romain Kessler<sup>1,2,3</sup>

## Authors' affiliations:

1 : Department of Respiratory Medicine and Strasbourg Lung Transplant Program, University Hospital of Strasbourg, France

2 : INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, University of Strasbourg, France

3 : Faculty of Medicine, Federation of Translational Medicine (FMTS), Strasbourg, France

4 : Department of Thoracic Surgery and Strasbourg Lung Transplant Program, University Hospital of Strasbourg, France

5 : Department of Pathology, University Hospital of Strasbourg, France

**Corresponding author:** Dr Benjamin RENAUD-PICARD: [benjamin.renaudpicard@chru-strasbourg.fr](mailto:benjamin.renaudpicard@chru-strasbourg.fr)

Postal address : Department of Pneumology – Nouvel Hôpital Civil – 1 place de l'hôpital – 67091 STRASBOURG - FRANCE

# ABBREVIATIONS

Ann-5: annexin-5

ARDS: acute respiratory distress syndrome

$\alpha$ -SMA : alpha smooth muscle actin

AU: arbitrary units

BALF: broncho-alveolar lavage fluid

BOS: bronchiolitis obliterans syndrome

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

CDK: cycline-dependent kinase

CLAD: chronic lung allograft dysfunction

ECM: extracellular matrix

EMT: epithelial to mesenchymal transition

FBS: fetal bovine serum

FEV1: forced expiratory volume second

HE: hematoxylin eosin

IL-8: interleukin 8

INF $\gamma$ : interferon gamma

LPS: lipopolysaccharide

LTx: lung transplantation

mABS : monoclonal antibodies

MMP-9: matrix metalloproteinase-9

MP : microparticle

MP<sub>CTL</sub>: THP-1 monocyte-derived microparticle control

MP<sub>LPS</sub> : THP-1 monocyte-derived microparticles stimulated with LPS of *P.Aeruginosa*

MUC 1: mucin 1

OB: obliterative bronchiolitis

PHT: pulmonary hypertension

PhtdSer: phosphatidylserin

PNN: polynuclear neutrophils

Sag: self-antigens

TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor beta 1

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

## ABSTRACT

Long term survival post lung transplantation (LTx) is limited by the occurrence of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). One mechanism involved is the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Membrane microparticles (MPs) are known to be involved in some respiratory diseases and in other organs allograft rejection episodes. We hypothesized that leukocyte-derived MPs likely contribute to EMT. To emphasize this physiological concept, our objectives were to: (1) confirm the presence of EMT on explanted lungs from patients who underwent a second LTx for BOS; 2) characterize circulating MPs in transplanted patients, with or without BOS; (3) evaluate *in vitro* the effect of monocyte-derived MPs in EMT of human bronchial epithelial cells. Our IHC analysis on explanted graft lungs revealed significant pathological signs of EMT with an inhomogeneous destruction of the bronchial epithelium, with decreased expression of the epithelial protein E-cadherin and increased expression of the mesenchymal protein Vimentin. The immunophenotyping of MPs demonstrated that the concentration of MPs carrying E-cadherin was lower in patients affected by BOS ( $p=0.007$ ). *In vitro*, monocyte-derived MPs produced with LPS were associated with decreased E-cadherin expression ( $p < 0.05$ ) along with significant morphological and functional cell modifications. MPs may play a role in EMT onset in bronchial epithelium following LTx.

## Key words

Lung transplantation, bronchiolitis obliterans, microparticles, biomarker

## 1 INTRODUCTION

Lung transplantation (LTx) is a treatment option for patients with terminal chronic respiratory failure. Improvements in surgical skills and progress in post-transplant management have led to a significantly better prognosis over the last decade<sup>1</sup>. However, long-term survival remains limited with a median survival of about 6 to 8 years, mostly conditioned by chronic lung allograft dysfunction (CLAD). The most common CLAD phenotype is called bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), characterized by small airway fibrosis with obstructive physiology and obliterative bronchiolitis (OB) pathology<sup>2</sup>. This inflammatory state eventually results in multiple foci of partial or complete bronchiolar obliterations, due to granulation polyps and extracellular matrix (ECM) deposition<sup>3,4</sup>.

Impaired bronchial epithelium repair following repeated injuries could play a major role in BOS development<sup>5</sup>. One possible source of fibroblasts recruitment could consist of epithelial-mesenchymal transition (EMT)<sup>6</sup>, which takes place upon tissue fibrosis and wound healing<sup>7</sup>. After LTx, repeated epithelial injuries could be responsible for EMT dysregulation. In BOS patients, bronchial epithelial cells lose their epithelial properties and gain mesenchymal cells' morphology and phenotype, as characterized by cell migration and invasion, along with expression of ECM proteins like collagens and fibronectin<sup>8,9</sup>. Several signaling pathways that may induce EMT are common findings following LTx, e.g., transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$  pathway, especially TGF- $\beta$ 1. High TGF- $\beta$ 1 levels have been detected in bronchio-alveolar lavage fluid (BALF) at 24 hours post-transplantation in patients who later developed BOS<sup>10</sup>. *Bortwick et al.*<sup>11</sup> demonstrated that treating bronchial epithelial cells with TGF- $\beta$ 1 reduced the expression of epithelial transmembrane proteins (E-cadherin) and increased that of mesenchymal proteins (vimentin and fibronectin), representing a shift towards a mesenchymal phenotype. In addition, TGF- $\beta$ 1 promoted MMP-9 production and likewise favored collagen-1 and fibronectin deposition<sup>12</sup>.

EMT dysregulation could be induced by cell-derived microparticles (MPs)<sup>13</sup>, namely cell fragments formed through the blebbing of cell plasma membrane and then released in biological fluids or tissues, following physiological or pathological cell stimulation<sup>14</sup>. These

MPs can be distinguished from exosomes or apoptotic bodies by both their size (50-1000 nm) and way of production. MPs production is correlated to apoptosis and stress activity<sup>15</sup>, and a bi-anionic phospholipid, phosphatidylserin (PhtdSer), is exposed on MPs' external surface<sup>16</sup>. With composition characteristic of their parental cell, such as RNAs, miRNAs, proteins, or cytoplasm, these MPs are involved in both cell-cell communication and information carrying<sup>17,18</sup>. In the lungs, MPs are present in the pulmonary blood circulation<sup>19</sup> and airways, primarily retrieved in the past from sputum<sup>20</sup> and BALF<sup>21</sup>. Previous studies showed that MPs can play a role in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension<sup>19</sup>, cystic fibrosis<sup>20</sup> and lung interstitial diseases<sup>21</sup>.

So far, MPs have been mostly investigated in the setting of organ and tissue transplantations<sup>22</sup>. Concentration of circulating MPs was revealed increased in rejection cases, *e.g.*, in the event of acute cardiac graft rejection<sup>23</sup>, humoral or cellular rejection following pancreatic islet transplantation<sup>24</sup>, or acute liver rejection<sup>25</sup>.

Our study sought to confirm the impact of EMT on BOS development. Considering the previous findings about MPs and allograft rejection in other organ models<sup>22-25</sup>, we hypothesized that MPs could contribute to EMT and play a role in BOS onset. Our objectives were:

- To confirm EMT to be present in OB lesions using immunohistochemistry (IHC) analysis in explanted lungs from patients re-transplanted for severe BOS;
- To characterize and phenotype circulating MPs in transplanted patients, with or without BOS, in order to determine the possibility to use them as biomarkers;
- To evaluate the potential role of leukocyte-derived MPs on EMT in human bronchial epithelial cells *in vitro*.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Patients**

Blood and tissue samples were obtained from patients at the Strasbourg University Hospital, participating to the multicenter COLT study (Cohort in Lung Transplantation, NCT00980967), after the study protocol had been approved by the ethical committee (Comité de Protection des Personnes Ouest 1-Tours, 2009-A00036–51).

### **2.2 Histological and IHC analysis of explanted lungs with OB**

To confirm the presence of EMT in BOS, we performed a pathological evaluation of bronchial epithelium associated with an IHC analysis on explanted lungs.

Lung biopsy samples were taken from explanted lungs of 9 patients who had to undergo re-transplantation for severe BOS, with paraffin-embedded tissue blocks available. Four-micrometer-thick sections were prepared and stained with hematoxylin eosin (HE). Immunohistochemical staining was performed with ready-to-use antibodies and an automated IHC/ISH slide staining system (VENTANA medical systems, Tucson, AZ 85755 USA). We used the following epithelial or mesenchymal membrane antibodies: beta-catenin (clone 14, BD transduction, dilution at 1/200); E-cadherin (clone EP700Y, MM France, dilution at 1/200); vimentin (Clone V9, Dako, dilution at 1/400); alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (clone 1A4, Dako, 1/500 dilution).

### **2.3 Immunophenotyping of circulating microparticles**

To investigate the potential interest of MPs as biomarkers to detect BOS, we collected peripheral blood samples from lung transplant patients. Our goal was to confirm that it was possible to process circulating MPs, quantify them and to perform an immunophenotyping to determine their cellular origin.

We randomly selected 10 lung transplanted patients from our cohort, five with BOS and five without BOS. Microparticles were isolated from citrated fresh blood samples by double



ultracentrifugation: the first one (13,000g, 5 min), to remove apoptotic bodies and cellular debris and the second one (13,000g, 1h, 4°C), to wash and concentrate them. Microparticles were then immediately stored at -80°C for further analysis. This procedure was previously validated as mainly yielding MPs while excluding larger apoptotic bodies<sup>26</sup>. The MPs capture system uses the high affinity of annexin-5 (ann-5) for PhtdSer (Kd 10-10 M) and also streptavidine's affinity for biotin (Kd 10-14 M). Microparticles were captured at the bottom of wells covered with covalently immobilized streptavidin (Roche, France) and passed by incubation of a human albumin solution (5g/l) in PBS buffer. The biotinylated ann-5 (600 ng/ml) was fixed after 1 hour of incubation at 37°C, followed by three washes using PBS. Samples containing MPs were deposited (100 µl/well) and incubated for 30 minutes at 37°C. The quantification of captured MPs was performed using a functional prothrombinase assay where concentrations of purified clotting factors (Factor Xa, Factor Va, and prothrombin) and calcium were determined in an effort to ensure PhtdSer was the rate-limiting parameter of thrombin generation from prothrombin<sup>26,27</sup>. Thrombin generation is dependent on PhtdSer content, which proves to be proportional to the quantity of immobilized MPs. Results have been expressed as nanomolar PhtdSer equivalent (nM PhtsSer Eq) by reference to a standard curve constructed with liposomes of known PhtdSer concentrations<sup>27</sup>. MPs were then isolated using monoclonal antibodies (mAbs) (mAb against CD217, CD105, CD66b, and E-cadherin) for lymphocytes, endothelial cells, neutrophils, and epithelial cells, respectively. We selected CD217 and CD66b to highlight some type of leukocyte-derived MPs. *Bakouboula et al*<sup>19</sup> showed that MPs bearing CD105 were increased in pulmonary arterial blood compared with venous blood in patients with PAH, confirming their pulmonary origin. E-cadherin is an epithelial protein, which is involved in EMT.

Concerning the capture using mAbs, background values obtained with irrelevant immunoglobulins G (IgGs) of corresponding isotypes were subtracted from those measured with specific mAbs.

## 2.4 Cell cultures

In order to investigate the potential role of leukocytes-derived MPs on bronchial epithelial cells, we used an *in vitro* model with BEAS-2B cells (ATCC, Manassas, VA), a cell line derived from normal human bronchial epithelium, in order to treat them with MPs and cytokines.

BEAS-2B cells were grown in functionalized culture boxes for adherent cells in RPMI 1640 (biowhittaker, Walkerville, MD, USA) containing 2mM glutamine, 4.5g/L glucose, non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin (10.000U penicillin/mL and 10.000U streptomycin/mL), gentamycin, and 10% fetal bovine serum (FBS). The optimal seeding rate was determined at 25 000 cells/cm<sup>2</sup>, and a 90% confluence was reached within 3 days.

To produce leukocyte-derived MPs, we used human monocytes THP-1 (ATCC, Manassas, VA), grown in culture medium RPMI 1640 containing 2.5g/L glucose and 2mM glutamine, supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 0.2% β-mercaptoethanol (20μL/mL), and 10% FBS. These cells were added with a concentration of 200 000 cells/mL.

## 2.5 Production and determination of monocyte-derived microparticles

We stimulated THP-1 monocytes for 24 hours (h) with *P. Aeruginosa* LPS in order to imitate the kind of infectious stress happening after a LTx, at a concentration of 10μg/ml so as to produce THP-1-derived MPs (MP<sub>LPS</sub>). The MPs emitted in the supernatant were collected by doing two successive ultracentrifugations (13000g for 5 minutes and 13000g for 1h, 4°C). They were then stored in a culture media without FBS, under sterile conditions, at 4° C for a maximum of 5 weeks. MPs derived from non-stimulated THP-1 monocytes were isolated in the same manner as controls (MP<sub>CTL</sub>). The MP concentration was measured by prothrombinase assay, as described above.

## 2.6 Treatment of BEAS-2B cells

The treatments of BEAS-2B cells were initiated at 20-30% confluence during 24 h, 48 h, or 72 h. The agents used were as follows: MP<sub>LPS</sub> (30nM), MP<sub>CTL</sub> (30nM), TGF- $\beta$ 1 (10ng/mL), TNF- $\alpha$  (20ng/mL), TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ , or actinomycin D (0.5 $\mu$ g/mL). Stimulation with TGF- $\beta$ 1 was used as positive control to induce EMT. In reference to previous study data<sup>9</sup>, we determined the optimum concentrations and durations of stimulation by either TGF- $\beta$ 1 or combined TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ . Given these different stimulation conditions, we assessed morphological changes, EMT specific membrane protein expression, and functional abilities. For each test, a population of un-stimulated cells was observed as negative control.

## **2.7 Membrane protein expression analysis using Western blot**

EMT is responsible for a transformation of epithelial cells into mesenchymal cells, including a major modification of membrane proteins expression. To investigate these changes, we performed Western Blot analysis on some proteins involved in EMT.

Following stimulation, BEAS-2B cells were washed twice in PBS and proteins were extracted in a specific lysis buffer, in the presence of protease inhibitors (Complete ® Roche) and N-ethylmaleimide 20. Proteins (20 $\mu$ g deposited for each experimental condition) were separated by size with a 10% polyacrylamide gel electrophoresis at 100V for 2 h and then transferred to nitrocellulose membranes (Amersham) at 100V for 2 h. Non-specific link sites were saturated using an ambient-temperature blocking solution. The membranes were then incubated with primary mAbs specifically directed against E-cadherin (1/1000; Abcam), an epithelial protein and vimentin (1/1000; Abcam), a mesenchymal protein. After several washes with PBS-Tween buffer, the membranes were incubated with the corresponding secondary antibody for 1h at room temperature and then washed prior to detection by means of enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare). Density analysis was performed using ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare). In addition, we assessed the level of inflammation upon stimulation with cytokines and MPs by measuring the expression of  $\kappa$ B protein. Western Blot was done in total protein. For each stimulation

condition, the results corresponded to the ratio between the target protein and maintenance protein ( $\beta$ -tubulin).

## 2.8 Scratch test

After EMT, cells develop mesenchymal characteristics and are not attached to the basal membrane anymore, which is responsible for an increased mobility. In order to investigate functional changes in BEAS-2B cells and in their ability to fill a gap in a confluent cell layer, we performed wound healing assay.

The BEAS-2B cells were inoculated to  $2.10^5$  cells/cm<sup>2</sup> under standard culture conditions. After 24 h, with the help of a rigid non-swivel scraper, uniform breaches were performed through the cell layer. The cells were then washed with culture medium RPMI 1640 and incubated in the same culture media, depending on the different stimulation conditions (MP<sub>CTL</sub>, MP<sub>LPS</sub> or TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ 1), within a final volume of 1mL. Pictures were taken every 24h over 72h, with the total surface of the breach measured using the ImageJ software. The percentage of gap filling was then calculated by reporting the gap size at different times in relation to the size at T0, for each stimulation condition.

## 2.9 Statistical analysis

The set of manipulation sequences was duplicated at least three times ( $n \geq 3$ ). The data have been expressed as mean  $\pm$  standard error (SEM). The Student's t-test was employed for quantitative tests. The ANOVA test with repeated measures was applied for statistical comparison between groups with paired values. Difference was considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The software for statistical analysis used was GraphPad Prism 5.0. In the graphic representations, a star means (\*)  $p < 0.05$ , two stars (\*\*) mean  $p < 0.01$ , and three stars (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

### **Supplemental method 1: Interaction between MPs and BEAS-2B cells**

In this study, we wanted to investigate the abilities of our MPs to be incorporated into BEAS-2B cells membrane. MPs were labeled using the PKH26 lipid probe (Kit SIGMA-ALDRICH), centrifuged (14000g, 1 h, 4° C) in 1mL of DPSS, and then incubated in the dark for 5 minutes at room temperature. The reaction was stopped by adding 1mL of FBS and 500µL of DPSS. MPs were centrifuged (14000g, 45 min, twice), suspended in RPMI, and incubated (37° C, 5% CO<sub>2</sub>) at a concentration of 10nM Phtdser with BEAS-2B cells for 6 h, 24 h or 48 h. Following stimulation, the cells were observed by fluorescence microscopy. The fluorescence intensity was evaluated using flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson). The cells ratio labeled by PKH26 was the percentage of cells with incorporated MPs, calculated on 10000 events.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Immunohistochemistry analysis in explanted lung tissue from BOS patients**

The aim of this study was to confirm the presence of EMT in BOS. We included nine patients who underwent a second LTx for treatment of severe BOS. The main patient characteristics have been summarized in *Table 1*. The mean time between first LTx and BOS diagnosis was  $3.5 \pm 0.8$  years, and the mean time between BOS diagnosis and second LTx was  $2.1 \pm 0.9$  years. As BOS-free control lung tissue, we employed samples from donor lung lobes, removed during the transplantation procedure for size matching.

In the controls, the bronchial epithelium appeared to be normal as expected and the bronchial epithelial cells staining for E-cadherin and  $\beta$ -catenin were proven strong, especially on apical and lateral membranes (*Figures 1A and 1B*). There was no staining for either vimentin or  $\alpha$ -SMA on the bronchial epithelium (*Figure 1C*).

When considering BOS patients, the extent and severity of bronchiolar lesions were variable. We observed “early” OB lesions where the HE examination revealed epithelial cell hyperplasia with squamous metaplasia and increase of height and cell crowding (*Figure 2A*).

E-cadherin and  $\beta$ -catenin staining intensities were less pronounced except at the cell apical pole (*Figure 2B*). In the most inflammatory areas, vimentin staining demonstrated significant changes along with basal intra-cytoplasmic signals in epithelial cells (*Figure 2C*).

We also observed bronchioles with more pronounced OB lesions. Epithelium showed substantial loss of organization, with some scaling or even fragmentation, loss of cylindrical appearance, and increased nucleus sizes, whereas both E-cadherin and  $\beta$ -catenin stainings were significantly decreased (*Figures 3A and 3B*). The previously described intra-cytoplasmic vimentin signaling was present within a larger number of epithelial cells and in myofibroblasts (*Figure 3C*).

In addition, we observed completely obstructed bronchioles as stigmas of terminal OB (*Figure 4A*). The epithelium of the bronchioles affected by OB displayed a desquamative aspect, suggestive of metaplasia, with a loss of cell support on the basal membrane, along with the vanishing of the cells' cubic appearance and "basal-apical" polarity. The epithelial stainings had completely disappeared (*Figure 4B*). Mostly myofibroblasts expressing vimentin and  $\alpha$ -SMA were still present (*Figure 4C*).

### **3.2. Quantification and immunophenotyping of circulating microparticles**

In this study, we wanted to characterize circulating MPs in LTx patients. We included 10 patients with a prior lung transplantation in our center between 2008 and 2013, five with severe BOS (BO Group) and five with stable lung function as controls. Our analysis focused on quantifying and identifying the origin of circulating MPs from blood samples. Patient characteristics have been summarized in *Table 2*. All the samples were collected in 2014. The total MPs concentration measured in the BO group was  $5.46 \pm 1.2$ nM PhtdSer compared to  $8.34 \pm 1.6$  nM PhtdSer in the control group (ns). The concentration of MPs carrying E-cadherin in the BO group was significantly lower ( $0.02 \pm 0.02$ nM PhtdSer) compared to the control group ( $0.12 \pm 0.02$ nM PhtdSer) ( $p = 0.007$ ). The concentration of other specific MPs proved to be similar between both groups (*Table 3*).

### 3.3 BEAS-2B cell cultures and *in vitro* analysis

With this *in vitro* study, we wanted to assess the effect of monocytes-derived MPs on a human bronchial epithelial cell line and to induce EMT features in these cells after stimulation.

#### 3.3.1 Morphological changes in BEAS-2B cells after stimulation

We observed the growth of BEAS-2B cells at 24 h, 48 h, and 72 h using reverse microscopy (10x magnification). When BEAS-2B cells were incubated with actinomycin D (0.5µg/mL), they lost adhesion to each other, with increased cell fragments observed in supernatants (*figure 5A*). Stimulation by TGF-β1 (10 ng/ml) or TNF-α (20 ng/ml) alone did not induce any morphological changes after 72 h (*figure 5B*). Combining the two cytokines induced a change in the spindle-shaped aspect of BEAS-2B cells and in the boundaries between them, without loss of adhesion (*figure 5C*). Stimulation by MP<sub>LPS</sub> was quite similar and induced significant morphological changes, with BEAS-2B cells appearing more stretched and displaying less identifiable cell edges without loss of adherence, looking more like stromal cells (*figure 5D*). Stimulation by MP<sub>CTL</sub> did not induce any morphological changes (*figure 5E*).

In this study, the cell stimulation with MP<sub>LPS</sub> or TGF-β1+TNF-α seemed to induce morphological EMT features.

#### 3.3.2 Membrane proteins expression

We measured E-cadherin expression in order to characterize the epithelial phenotype of BEAS-2B cells, and vimentin expression in order to define the transition to a mesenchymal phenotype. The effects of monocyte-derived MPs (MP<sub>LPS</sub> and MP<sub>CTL</sub>) at 30nM and those of TGF-β1 (10ng/mL) and of TNF-α (20ng/mL) were evaluated after 72h of stimulation. The cytokinic stimulation was employed as positive control.

We observed a significant decrease in E-cadherin expression (n = 4) after 72h of stimulation with MP<sub>LPS</sub> (30 nM) ( $1.00 \pm 0.0001$  vs  $0.50 \pm 0.04$ ,  $p = 0.0002$ ) and after 72h of stimulation

with TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ , whereas MP<sub>CTL</sub> showed no significant changes ( $1.00 \pm 0.0001$  vs  $1.13 \pm 0.47$ ,  $p = 0.79$ ) (*Figure 6A*).

The vimentin expression level ( $n = 3$ ) increased after 72h of stimulation with MP<sub>LPS</sub> (30nM) ( $1.00 \pm 0.007$  vs  $1.433 \pm 0.17$ ,  $p = 0.06$ ) and after 72h of stimulation with TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  (*Figure 6A*). Stimulation by MP<sub>CTL</sub> was not associated with any significant changes ( $1.00 \pm 0.007$  vs  $1.13 \pm 0.47$ ,  $p = 0.67$ ).

The total I $\kappa$ B protein expression ( $n = 4$ ) decreased following 72h of stimulation by MP<sub>LPS</sub> (30nM) ( $1.00 \pm 0.002$  vs.  $0.7 \pm 0.18$ , ( $p = 0.13$ ) whereas it remained stable following stimulation by MP<sub>CTL</sub> ( $1.00 \pm 0.002$  vs  $1.02 \pm 0.15$ ,  $p = 0.9$ ) (*Figure 6B*).

In conclusion, after 72h of stimulation with monocyte-derived MP<sub>LPS</sub>, we observed a significant decreased expression of the epithelial protein and an increase of the mesenchymal protein expression.

### 3.3.3 Evaluation of BEAS-2B cells' functional capabilities

To investigate BEAS-2B cells' ability to fill a breach on a confluent cell layer, scratch tests were performed. Non-stimulated BEAS-2B cells covered 40% of the gap after 72h. They were, however, able to cover 70% of the gap after 72h of stimulation by THP-1 MP<sub>LPS</sub> (30 nM). This breach was filled by approximately 55% after stimulation with TNF- $\alpha$  (20ng/mL) and TGF- $\beta$ 1 (10ng/mL). Stimulation by THP-1 MP<sub>CTL</sub> (30 nM) only allowed the gap to be filled by about 20% (ANOVA test with repeated measures,  $p = 0.06$ ) (*Figures 7A and 7B*).

We observed an increase of mobility in BEAS-2B cells stimulated with monocytes-derived MP<sub>LPS</sub> after 72h compared to non-stimulated cells.

### **Supplemental results 1: MPs integration by BEAS-B cells**

The BEAS-2B cells were incubated with MP<sub>LPS</sub> marked with PKH26 lipid probe. The proportion of BEAS-2B cells that absorbed monocyte-derived MP<sub>LPS</sub> or MP<sub>CTL</sub> increased over time. Six hours after stimulation, 30% MPs were integrated into cell membranes ( $31.23\% \pm$  for MP<sub>CTL</sub> and  $29.37\% \pm$  for MP<sub>LPS</sub>, ns). The integration process increased 24 h after the



stimulation (77.75% for MP<sub>CTL</sub> and 75.84% for MP<sub>LPS</sub>, ns). After 48h, more than 85% MPs were integrated, without any significant progression observed between 24 h and 48 h (*Supplemental figures 1A and 1B*).

## **4 DISCUSSION**

### **4.1 Evolution of EMT stigma on BOS patients' bronchial epithelium**

We observed an association between OB and a balance between destruction of the epithelium and replacement by myofibroblasts obstructing the bronchioles' lumen. We confirmed the presence of EMT in bronchial epithelium affected by OB. We hypothesize that EMT on OB could be a sequential phenomenon with a chronology that is difficult to determine precisely. In the same patient, we found OB lesions of variable severity, often associated with undamaged bronchioles, depending of the locally occurring inflammation process. Using a minor-mismatched orthotopic mouse lung transplantation model, *Martinu et al*<sup>28</sup> observed that OB exhibits a spectrum of severity from mild to severe, with a patchy aspect, sparing large areas of the lung. Our findings are in line with these results.

The IHC analysis confirmed EMT features to be closely related to ongoing OB injuries. E-cadherin and  $\beta$ -catenin staining were shown drastically decreased, while even disappearing in the bronchiolar areas most affected by OB. In these areas, intense intracytoplasmic vimentin signaling was demonstrated to occur near the epithelial cells' basal part, typically where inflammatory cells were abundant, reinforcing the hypothetical major role of inflammation in ongoing EMT on OB.

### **4.2 Study of circulating MPs in patients with and without BOS**

The concentration of MPs carrying E-cadherin was significantly lower in patients affected by BOS, compared to our control group. One explanation for this result could be that the quantity of MPs produced by epithelial cells decreased in BOS patients. Another reason could be that the epithelial cells responsible for their release already started to

transform into mesenchymal cells, inducing a decrease of E-cadherin+ MPs concentration. This finding could be an argument in favor of our hypothesis, namely the decreased expression of epithelial proteins during BOS induced by EMT, likewise involving the proteins carried by MPs. We did not observe any significant difference between our controls and those affected by BOS as for the MPs produced by other selected cell categories. This may be accounted for by the lack of statistical power due to small patient sample for this part of our research. Another limit of this study is that the measure was made at a single time point, and at least one year after CLAD onset. It would be interesting to do the same analyses in patients within the first year after LTx, before CLAD onset or even symptoms, in order to show the interest of MPs as early biomarkers for CLAD diagnosis. These results are preliminary and must thus be confirmed by a study with a larger patient sample, including the analysis of several mesenchymal makers (Vimentin, MMP-9, fibronectin). It would also be interesting to measure *in vitro* the concentration of MPs carrying E-cadherin in the culture media from BEAS-2B cells treated with or without EMT stimulation. Our findings are in line with those from *Gunasekaran et al*<sup>29</sup> who compared circulating exosomes from LTx patients with BOS to stable LTx patients. They observed that lung-associated self-antigens (Sag), MHC class II molecules, transcription factors class II MHC trans-activator, NF-κB, MyD88 were only presents in exosomes from BOS patients, which would play a role in alloantigen- and Sag-specific immunity leading to CLAD.

In the light of these results, we confirmed that it was possible to quantify MPs from peripheral blood samples in LTx patients and to perform an immunophenotyping on them. We strongly believe that MPs could represent novel non-invasive biomarkers enabling the diagnosis of BOS, maybe before symptoms onset.

#### 4.3 Analysis *in vitro* of EMT features in BEAS-2B cells

In our cell model, monocyte stimulation with *P. Aeruginosa* LPS was intended to reproduce the infectious conditions that possibly occur following lung transplantation in order to generate MPs carrying pro-inflammatory signals. We confirmed that MPs rapidly

incorporated into BEAS-2B cell membranes using PKH26 lipid probe (*supplemental results*). MPs can act like bio-effectors under certain cellular stress situations. *Cerri and coll.*<sup>30</sup> demonstrated that monocyte/macrophage-derived MPs were able to upregulate the production of inflammatory cytokines (IL-8, MCP-1, and ICAM-1) by bronchial and alveolar epithelial cells. Monocytes derived microparticles can also induce apoptotic effects on endothelial cells<sup>31</sup>. Platelet- and monocyte-derived MPs induce emission of pro-inflammatory cytokines from endothelial cells (IL-6 and MCP-1) and monocytes (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-8), increasing inflammation following cellular stress, such as observed in sepsis. The role of pro-inflammatory MPs in CLAD and maybe EMT onset is a relevant issue.

EMT occurrence within bronchial epithelial cells is responsible for a complete change in the cells' phenotype<sup>6-9, 11</sup>. Our Western blot results and our other observations *in vitro* seem to be in line with these data. All our observations were essentially made after 72-hour stimulation and could thus be the consequence of early-stage mesenchymal cell proliferation, one cause of the bronchiolar obstruction observed in BOS.

Epithelial cells' stimulation by MP<sub>LPS</sub> also increased BEAS-2B migration capacities which filled more scratch space than with the other types of stimulation. This observation points towards a loss of adhesion to the basal membrane with increased mobility, namely specific features typical of mesenchymal cells.

Monocyte-derived MP<sub>LPS</sub> induced mesenchymal morphological and functional characteristics within the BEAS-B cells, whereas MP<sub>CTL</sub> did not induce any significant change. The nature and the impact of MPs appears, therefore, directly linked to the stimulation type, as well as the parental cell responsible of its emission.

Total I $\kappa$ B markers were likewise studied. Nf- $\kappa$ B is a transcription marker involved in pro-inflammatory pathway. An inflammatory environment may contribute to EMT dysregulation in OB. Therefore, we wanted to determine whether monocytes-derived MPs could participate in the maintenance of this pro-inflammatory state in addition to promoting EMT. We observed a decrease in I $\kappa$ B marker expression following MP<sub>LPS</sub> stimulation in favor of a release of Nf- $\kappa$ B and therefore a maintenance of the pro-inflammatory state. These results are in favor of an

involvement of BEAS-2B cells' pro-inflammatory pathway following stimulation by MP<sub>LPS</sub>. In a next study, it will be interesting to evaluate other proteins involved in this pathway like MyD88.

Leukocyte-derived MPs induced after an infectious stress could act like an inflammatory trigger on both the onset and dysregulation of EMT in OB. However, the activation and differentiation of macrophages is known to release several pro-inflammatory cytokines but not TGF- $\beta$ 1. Even if the stimulation of our BEAS-2B cells by TNF- $\alpha$  only didn't induce any changes in favor of EMT, our results could imply that EMT could be induced by pro-inflammatory cytokines only, not only TGF- $\beta$ 1. To clarify this, a complementary exploration of the monocytes-derived MPs would be interesting to see if they carry significant amount of TGF- $\beta$ 1.

Our results noticeably add supplementary evidence to a growing literature in favor of EMT's major impact in BOS development. We propose the pathophysiological concept that monocytes-derived MPs could act as intercellular effectors and play a crucial role in cell signaling and in EMT onset. However, MPs' exact role in this biological process remains to be further elucidated in future studies. It should be interesting to complement our findings by further investigating the expression of other epithelial proteins (CCSP, MUC-1,  $\beta$ -catenin) and mesenchymal proteins (fibronectin, MMP-9).

Our work displays several limitations we wish to highlight. The IHC study and MPs' immunophenotyping were conducted on small numbers of randomly-selected patients and our results must be considered as preliminary. Our data obtained thus need to be confirmed by larger studies involving more patients. In our IHC study on explanted graft lungs, we only performed a description of the observed EMT features, without any quantitative analysis of the EMT markers expression. Another study limitation is that we applied cell lines instead of primary cells. There is also a lack of significance in some of our results especially our Western Blot, we must then remain careful about their interpretation. The study of our cell model could be complemented by further investigating other molecules contained within the MPs using Western blot analysis. ELISA assays are scheduled to be carried out in the near future to measure the concentrations of different molecules (IL-8, MMP9, collagen 1, TGF-

$\beta$ 1) in MPs-stimulated epithelial cell supernatants. This is aimed to look for changes in the secretory capacities of BEAS-2B. Another open issue would be to further investigate the specific role of MPs produced by the bronchial epithelial cells themselves.

We thus concluded that in our knowledge, this pilot study is the first work establishing a direct connection between MPs, EMT and BOS. Our data confirmed previous knowledge about the impact of EMT on BOS onset in LTx setting, meaning *ex vivo* on explanted lungs. We demonstrated that membrane microparticles play a significant role in paracrine cellular signaling, between immune cells and bronchial epithelial cells. These interactions could therefore significantly contribute towards bronchial epithelial cells' EMT within an inflammatory environment characteristic of infectious episodes and rejection occurring post-lung transplantation.

### **Disclosure statement**

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

### **Contribution of each author**

**Benjamin Renaud-Picard:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Writing – original draft; Writing – review & editing

**Kevin Vallière:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Writing – original draft; Writing – review & editing

**Justine Toussaint:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Writing – review & editing

**Guillaume Kreutter:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Ali El-Habhab:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Mohamad Kassem:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Fatiha El-Ghazouani:** Conceptualization; Formal analysis; Technical analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Anne Olland:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Sandrine Hirschi:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Michele Porzio:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Marie-Pierrette Chenard:** Conceptualization; Formal analysis; Pathologic technical analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Florence Toti:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Laurence Kessler:** Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing

**Romain Kessler:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Validation; Visualization; Writing – review & editing

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank all the persons who contributed to the realization of this study.

## REFERENCES

1. Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Rossano JW, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. 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*. 2017 Oct;36(10):1047-1059.
2. Shah RJ, Diamond JM. Update in Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Clin Chest Med*. 2017 Dec;38(4):677-692.
3. Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC, Lynch JP 3rd. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 Jan 15;6(1):108-21.
4. Müller C, Andersson-Sjöland A, Schultz HH, Eriksson LT, Andersen CB, Iversen M, Westergren-Thorsson G. Early extracellular matrix changes are associated with later development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *BMJ Open Respir Res*. 2017 Apr 12;4(1):e000177.
5. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P, Wilson KC, Brozek J, Glanville AR; ISHLT/ATS/ERS BOS Task Force Committee; ISHLT/ATS/ERS BOS Task Force Committee. 2014. An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J*. 44(6):1479-503
6. Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, Brouard S, Eickelberg O, Magnan A. Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur Respir Rev*. 2014;1;23(131):118-30.
7. Jolly MK, Ward C, Eapen MS, Myers S, Hallgren O, Levine H, Sohal SS. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Dev Dyn*. 2018 Mar;247(3):346-358.
8. Hodge S, Holmes M, Banerjee B, Musk M, Kicic A, Waterer G, Reynolds PN, Hodge G, Chambers DC. Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. *Am J Transplant*. 2009;9: 727–733.
9. Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR, Brodli M, Johnson GE, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ. Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair. *Am J Transplant*. 2010 Mar;10(3):498-509.
10. Magnan A, Mege JL, Escallier JC, Brisse J, Capo C, Reynaud M, Thomas P, Meric B, Garbe L, Badier M, Viard L, Bongrand P, Giudicelli R, Metras D, Fuentes P, Vervloet D, Noirclerc M. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF- $\beta$  in lung-transplant recipients. Marseille and Montréal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153: 1431–1436.
11. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, Johnson GE, Gorowiec MR, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax*. 2009;(64)770–777
12. Pain M, Royer PJ, Loy J, Girardeau A, Tissot A, Lacoste P, Roux A, Reynaud-Gaubert M, Kessler R, Mussot S, Dromer C, Brugière O, Mornex JF, Guillemain R, Dahan M, Knoop C, Botturi K, Pison C, Danger R, Brouard S, Magnan A; COLT Consortium. 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*. 2017 Jun;17(6):1502-1514.
13. Gopal SK, Greening DW, Rai A, Chen M, Xu R, Shafiq A, Mathias RA, Zhu HJ, Simpson RJ. Extracellular vesicles: their role in cancer biology and epithelial-mesenchymal transition. *Biochem J*. 2017 Jan 1;474(1):21-45.
14. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol*. 2011 ;33(5):469-486.
15. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 1997;99:1546–1554
16. Vallier L, Cointe S, Lacroix R, Bonifay A, Judicone C, Dignat-George F, Kwaan HC. Microparticles and Fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost*. 2017 Mar;43(2):129-134.
17. Jia L, Fan J, Cui W, Liu S, Li N, Lau WB, Ma X, Du J, Nie S, Wei Y. Endothelial Cell-Derived Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea Hypoxia Syndrome and Coronary Artery Disease Increase Aortic Endothelial Cell Dysfunction. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(6):2562-2570.

18. Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosin M, Yala E, Zobairi F, Leclercq A, Stoian G, Mitrea IL, Prevost G, Toti F, Kessler L. Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2014;3(2):219-226.
19. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F: Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(5):536-43.
20. Porro C, Lepore S, Trotta T, Castellani S, Ratclif L, Battaglino A, Di Gioia S, Martínez MC, Conese M, Maffione AB. Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients. *Respir Res* 2010;11:94.
21. Novelli F, Neri T, Tavanti L, Armani C, Noce C, Falaschi F, Bartoli ML, Martino F, Palla A, Celi A, Paggiaro P. Procoagulant, tissue factor-bearing microparticles in bronchoalveolar lavage of interstitial lung disease patients: an observational study. *PLoS One* 2014;9(4):e95013.
22. Bakouboula B, Morel O, Faller AL, Freyssinet JM, Toti F. Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jun 1;16:2499-514.
23. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, Meyer N, Chenard MP, Freyssinet JM, Bareiss P, Mazzucotelli JP, Toti F. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27(1):38-45.
24. Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Richard MJ, Greget M, Masson D, Zobairi F, Benhamou PY, Kessler L. Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc*. 2011;43(9):3241-3245.
25. Morgul MH, Splith K, Leonhardt C, Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Andreou A, Atanasov G, Benzing C, Krenzien F, Hau HM, Felgendreff P, Klunk S, Pratschke J, Sauer IM, Schmelzle M. The value of microparticles in detecting acute rejection episodes after liver transplantation. *Biomarkers*. 2017 Apr 3:1-8.
26. H Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004 Oct;2(10):1842-51.
27. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2(10):1846-1847.
28. Martinu T, Oishi H, Juvet SC, Cypel M, Liu M, Berry GJ, Hwang DM, Keshavjee S. Spectrum of chronic lung allograft pathology in a mouse minor-mismatched orthotopic lung transplant model. *Am J Transplant*. 2019 Jan;19(1):247-258.
29. Gunasekaran M, Sharma M, Hachem R, Bremner R, Smith MA, Mohanakumar T. Circulating Exosomes with Distinct Properties during Chronic Lung Allograft Rejection. *J Immunol*. 2018 Apr 15;200(8):2535-2541.
30. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol*. 2006; 177: 1975–1980.
31. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2008 Nov;100(5):878-85.



## FIGURE AND TABLE LEGENDS

**Table 1: Data from patients who underwent second lung transplantation for terminal BOS 3.** M: male, F: female, T1: first transplantation, T2: second transplantation, U: unilateral LTx, B: bilateral LTx, L+ IL: combined lung and islets of Langerhans transplantation, L + H: combined heart and lung transplantation, BOS year: BOS diagnosis. COPD: Chronic obstructive pulmonary disease. PHT: pulmonary hypertension.

**Table 2: Data from pulmonary transplant patients whose circulating MPs were quantified and phenotyped.** M: male, F: female, Tx year: year of transplantation, Emph. Def: emphysema on alpha 1-antitrypsin deficiency, Pn K: diffuse cystic pneumonia, COPD: Chronic obstructive pulmonary disease. PHT: pulmonary hypertension. U: unilateral LTx, B: bilateral LTx, L+Li: combined lung and liver transplantation, L+ IL: combined lung and islets of Langerhans transplantation, Death: Y: yes, N: no, BOS year: BOS diagnosis.

**Table 3: Phenotyping of circulating MPs in lung transplant patients with or without BOS.** Annexin 5: amount of total circulating MPs. Nature of the cells which produced the MPs: CD 217-: T regulator lymphocytes; CD105-: activated endothelial cells; CD66b +: polynuclear neutrophils; E-cadherin: membrane protein of the epithelial phenotype carried by MPs. We observed a significant difference between BO and control groups for the MPs carrying E-cadherin (p: 0.007) (\*\*: p < 0.01).

**Figure 1: Optical microscope examination of a bronchiole cross-section from a control lung, free of bronchiolitis obliterans.** Analysis in IHC. Photo after coloration in HE (A). The E-cadherin staining (brown coloration) is essentially visible at the lateral wall of the epithelial cells (B). The vimentin staining within the epithelium corresponds to the infiltration of inflammatory cells (black arrow) (C). 40x magnification, scale bar: 100 µm.

**Figure 2: Optical microscope examination of a bronchiole cross-section with early OB lesions.** Analysis in IHC. Photo after coloration in HE: epithelial cell hyperplasia with squamous metaplasia and increase of height and cell crowding (A). The E-cadherin staining is much less intense at the lateral walls of the epithelial cells but persists at the apical pole (black arrow) (B). Vimentin staining reveals intra-cytoplasmic signaling at the basal pole of several epithelial cells (black star) (C). 40x magnification, scale bar: 100 µm.

**Figure 3: Optical microscope examination of a bronchiole cross-section with advanced OB lesions.** Analysis in IHC. Photo after coloration in HE: important alterations of the epithelium structure (A). The E-cadherin staining has completely disappeared on this fragment (B). Vimentin staining is still present at the basal pole of the few epithelial cells remaining (black arrow) and strongly expressed in the proliferating myofibroblasts (black star) (C). 20x magnification, scale bar: 100 µm.

**Figure 4: Optical microscope examination of a bronchiole cross-section with terminal OB lesions.** Analysis in IHC. Photo after coloration in HE: the epithelial cells completely disappeared, replaced by mesenchymal cells (A). The E-cadherin staining has completely disappeared (B). Vimentin staining is strongly expressed inside the proliferating myofibroblasts (black star) (C). 20x magnification, scale bar: 100 µm.

**Figure 5: Morphological changes in BEAS-2B cells after stimulation.**

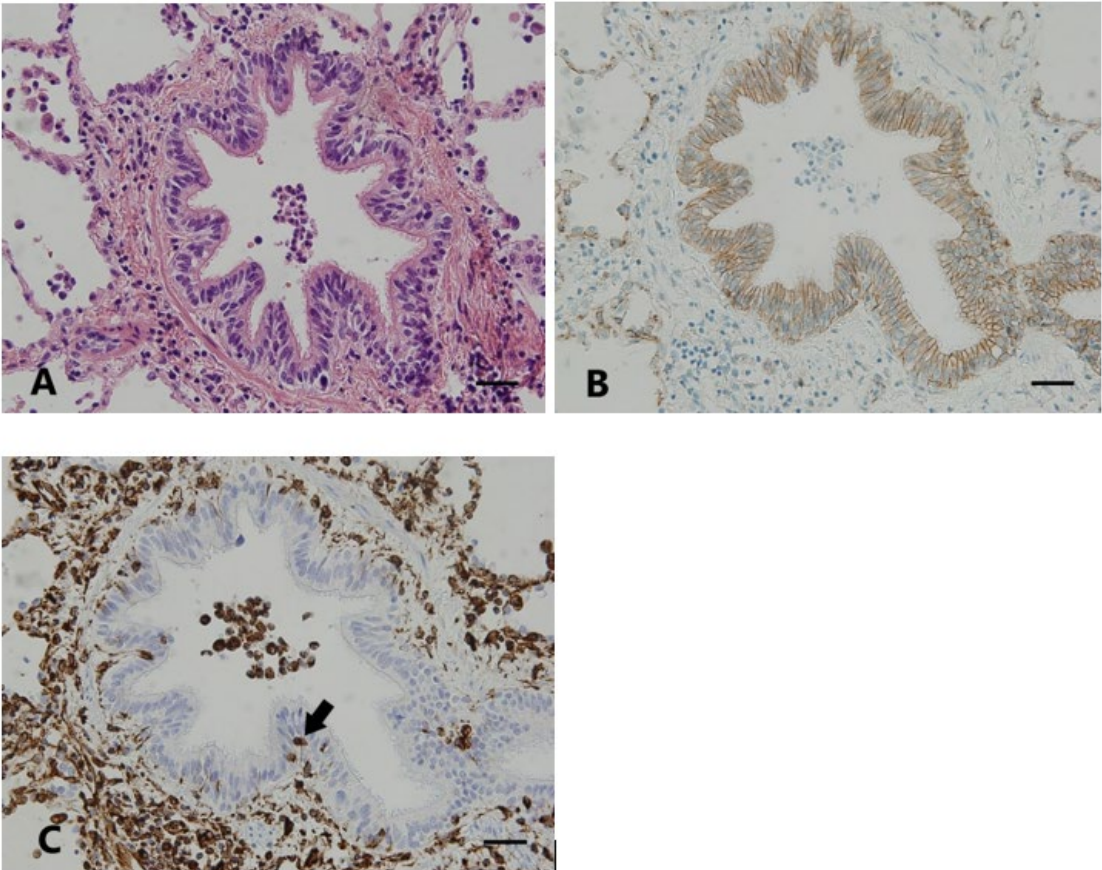
Observation of the growth of BEAS-2B cells after 72h of different type of stimulations, using reverse microscopy (10x magnification). **A:** When BEAS-2B cells were treated with actinomycin D (0.5µg/mL), they lost adhesion to each other, with increased cell fragments observed in supernatants. **B:** Stimulation with TGF-β1 (10 ng/ml) alone did not induce any morphological changes compared to unstimulated cells. **C:** Co-stimulation with TGF-β1 (10 ng/ml) and TNF-α (20 ng/ml) induced a change in the spindle-shaped aspect of BEAS-2B cells and in the boundaries between them, without loss of adhesion. **D:** Stimulation by MP<sub>LPS</sub> induced significant morphological changes, BEAS-2B cells appearing more stretched and displaying less identifiable cell edges without loss of adherence. **E:** Stimulation by MP<sub>CTL</sub> did not induce any morphological changes.

**Figure 6: Study of the BEAS-2B cells' expression of membrane proteins and ikB in Western blot.** **A:** Expression of E-cadherin (n= 4) and vimentin (n= 3) on unstimulated BEAS-2B cells (Ctrl), and after 72h stimulation by TNF-α (20ng/mL) and TGF-β1 (10ng/mL) (TNF-α + TGF-β1) as positive control: significant decrease of E-cadherin expression and significant increase of Vimentin expression after cytokine stimulation. Results after 72h stimulation by monocyte THP-1-derived control MPs (MP<sub>Ctrl</sub>, 30 nM) and MPs produced with LPS (MP<sub>LPS</sub>, 30 nM): significant decrease in E-cadherin expression and increase in vimentin expression after stimulation with MP<sub>LPS</sub>. **B:** Observation on unstimulated BEAS-2B cells (Ctrl) and after 72-hour stimulation with TNF-α (20ng/mL) and TGF-β1 (10ng/mL) (TNF-α + TGF-β1), after stimulation by monocyte-derived control MPs (MP<sub>Ctrl</sub>, 30 nM) and MPs produced with LPS (MP<sub>LPS</sub>, 30 nM). There was a non-significant decrease in ikB expression after stimulation with MP<sub>LPS</sub>. Results expressed according to the ratio with the maintenance protein (β-tubulin). (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001, ns: not significant)

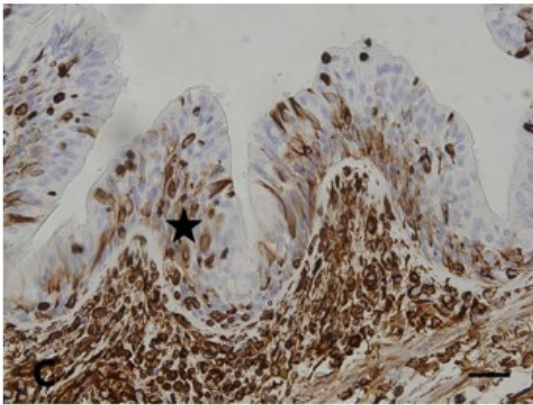
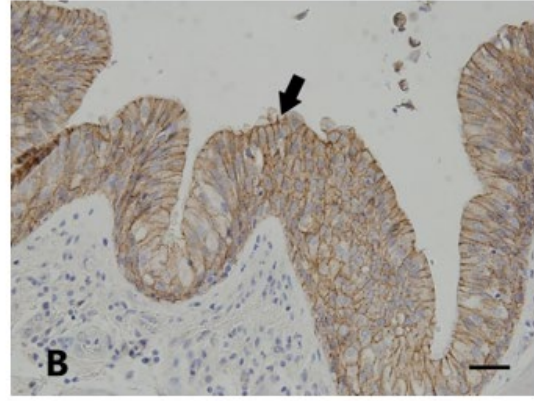
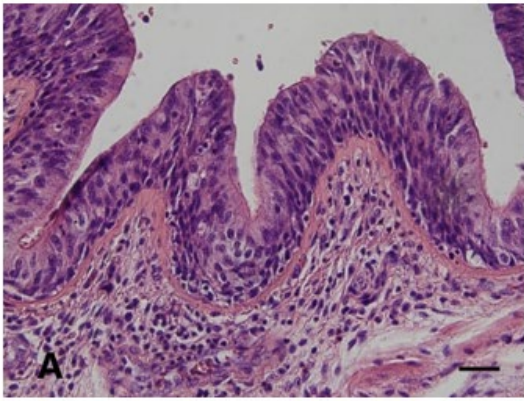
**Figure 7: Study of BEAS-2b's capacity to fill a gap by scratch test.** **A: Optical microscope observation, 4x magnification.** Observation of unstimulated control cells at 0 h (A), 24 h (B) and 48 h (C); cells stimulated with monocyte-derived control MPs (MP<sub>CTL</sub> 30nM) at 0 h (D), 24 h (E) and 48 h (F); cells stimulated with monocyte-derived MPs produced with LPS (MP<sub>LPS</sub>; 30nM) at 0 h (G), 24 h (H), and 48 h (I), and cells stimulated with TNF-α (20ng/mL) and TGF-β1 (10ng/mL) at 0 h (J), 24 h (K) and 48 h (L). **B: Graphic representation (n = 3).** The surface of the breccia was calculated using an image analysis program (ImageJ), with the values represented as a mean of the independent experiments. Unstimulated BEAS-2B bronchial epithelial cells covered 40% of the gap after 72 h. The cells were able to cover 70% of the gap after 72 h of stimulation with the THP-1 MP<sub>LPS</sub> (30nM) and 55% after stimulation with TNF-α (20ng/mL) and TGF-β1 (10ng/mL)

**Supplemental figure 1: Measurement of the integration of monocyte-derived MP<sub>CTL</sub> and MP<sub>LPS</sub> into BEAS-2B cells.** **A:** The MPs marked by the PKH26 probe are applied to the BEAS-2B cells at 10nM concentration for varying durations (6 h, 24 h, and 48 h). Integration is quantified by measuring the percentage of cells expressing the PKH26 probe. After 6 h of stimulation, about 30% of MPs were integrated (31.23% for MP<sub>CTL</sub> and 29.37% for MP<sub>LPS</sub>). After 48 h of incubation, more than 85% of MPs were integrated. There was no significance difference observed after 24 h or 48 h of stimulation. The integration of MP<sub>CTL</sub> and MP<sub>LPS</sub> was similar. **B:** Observation in optical microscopy: a) CTL: unstimulated BEAS-2b cells, (b) after 6 h incubation, (c) after 24 h incubation, (d) after 48 h incubation.

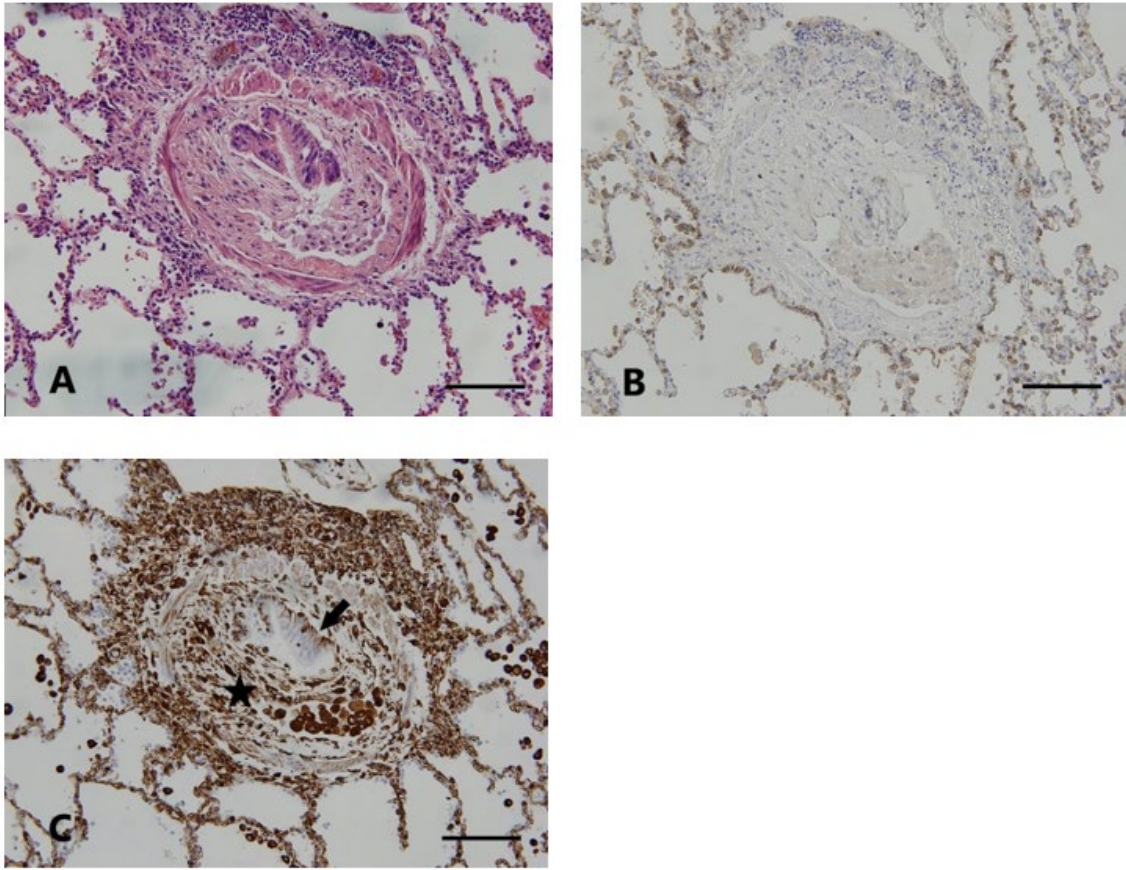
**Figures**



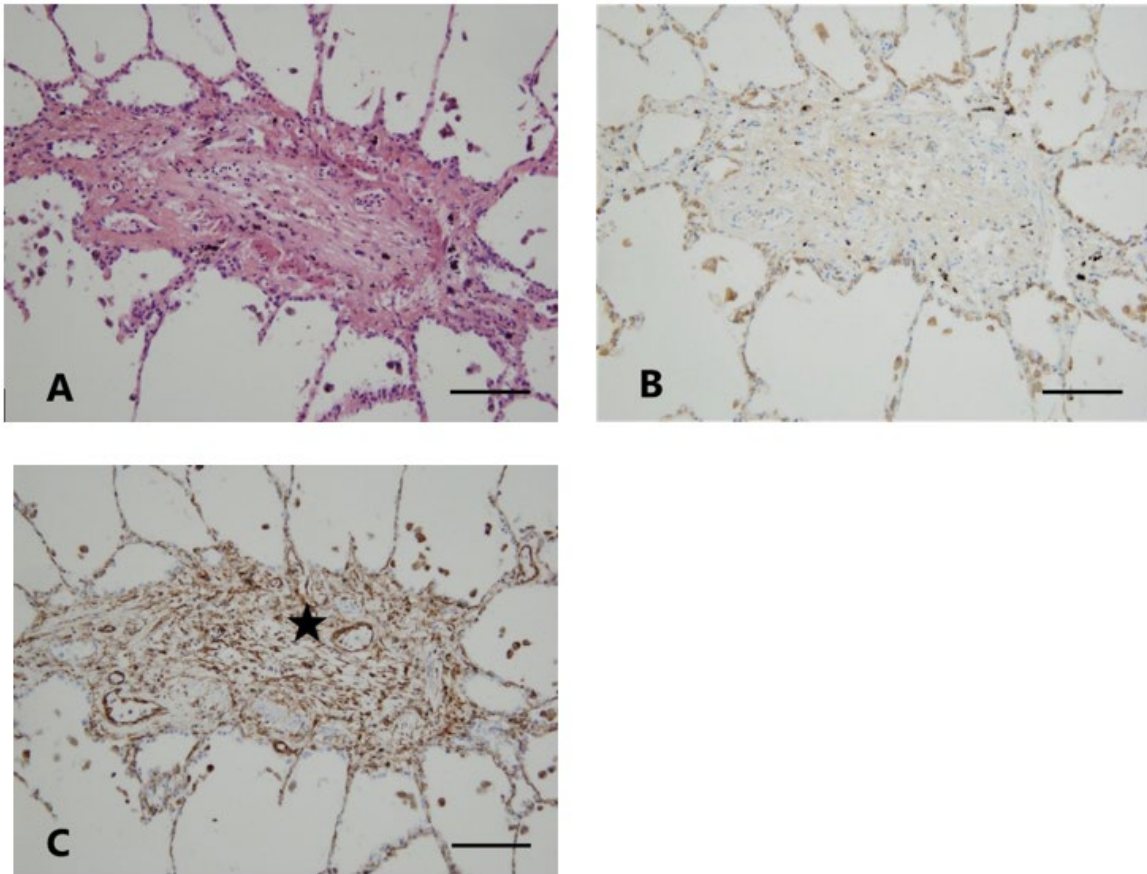
**Figure 1:** Optical microscope examination of a bronchiole cross-section from a control lung, free of bronchiolitis obliterans.



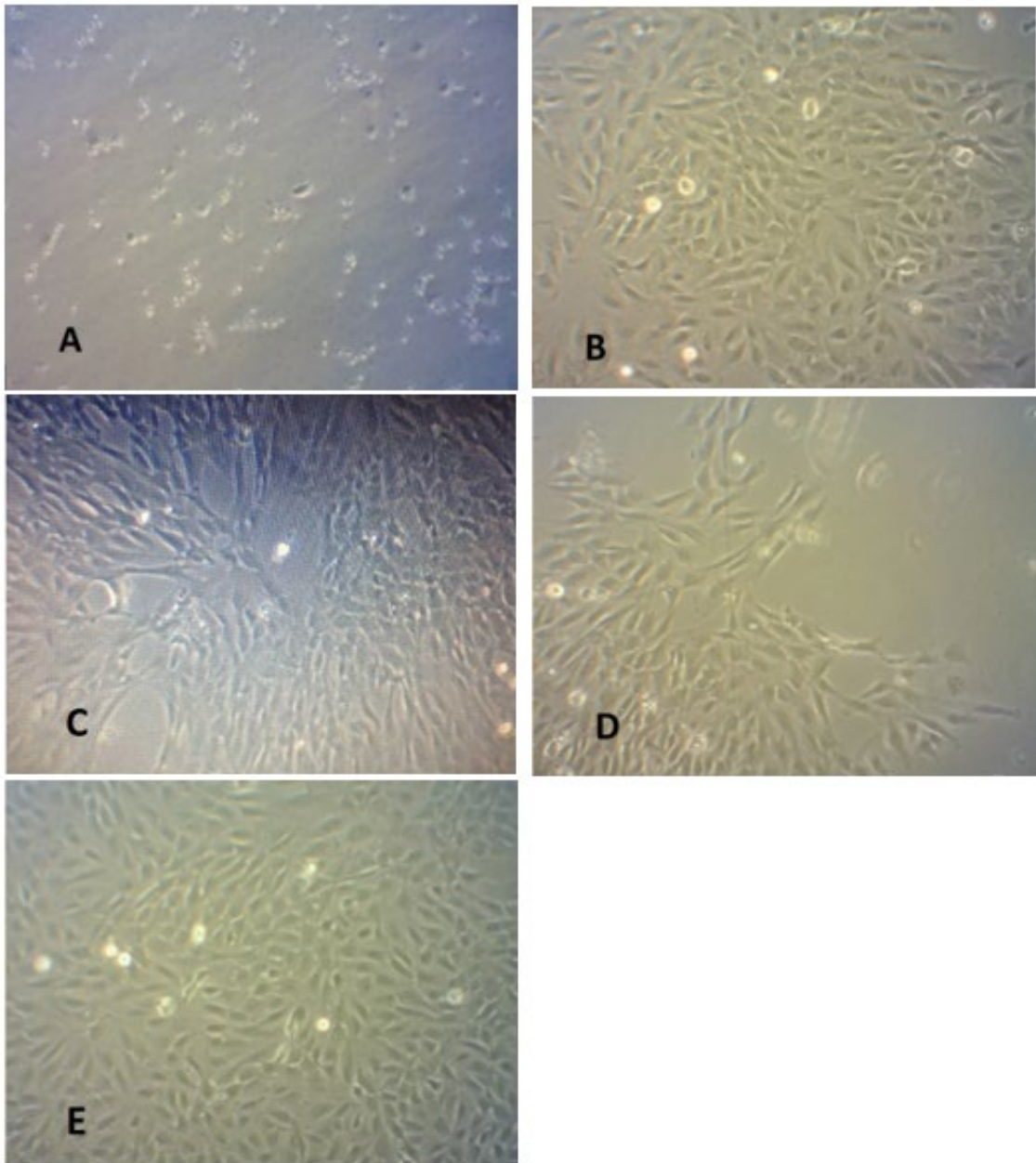
**Figure 2:** Optical microscope examination of a bronchiole cross section with early OB lesions.



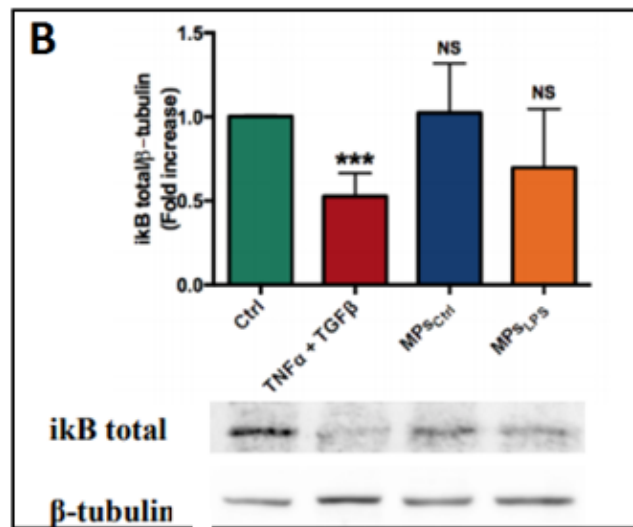
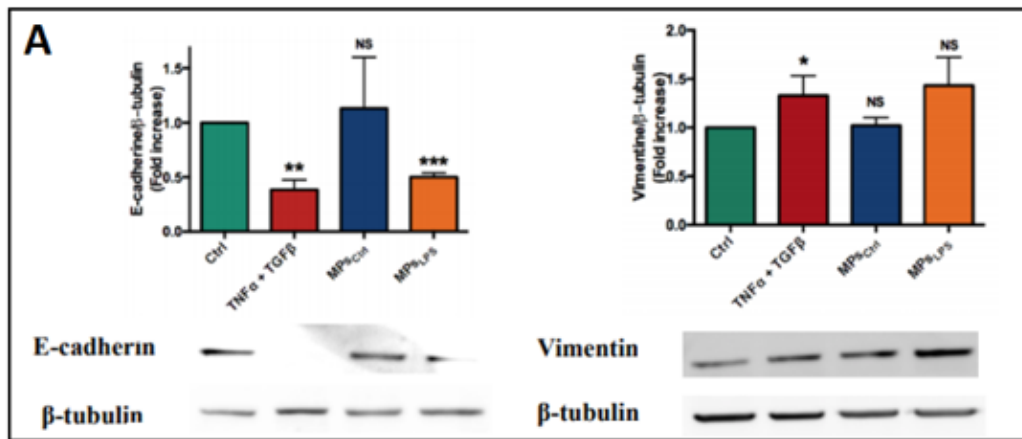
**Figure 3:** Optical microscope examination of a bronchiole cross-section with advanced OB lesions.



**Figure 4:** Optical microscope examination of a bronchiole cross-section with terminal OB lesions.

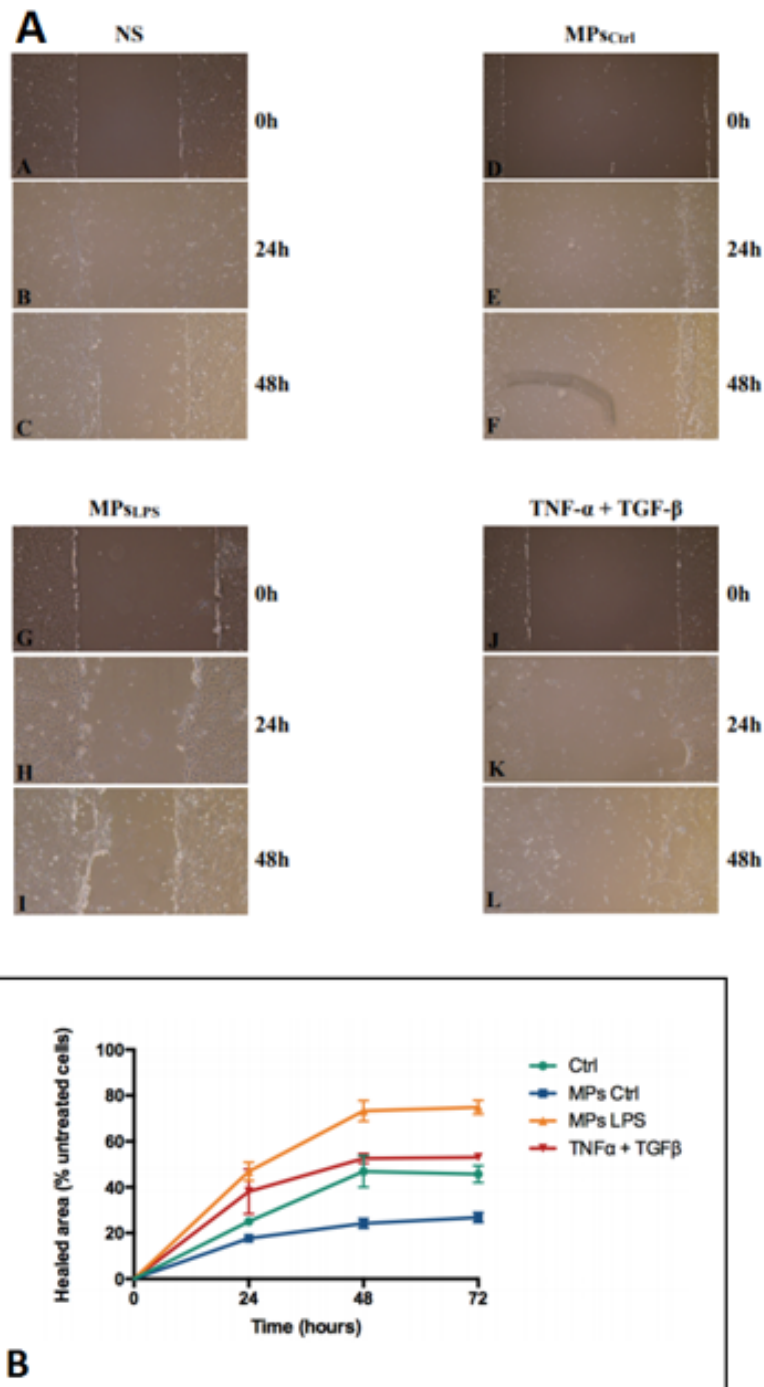


**Figure 5: Morphological changes in BEAS-2B cells after stimulation.**

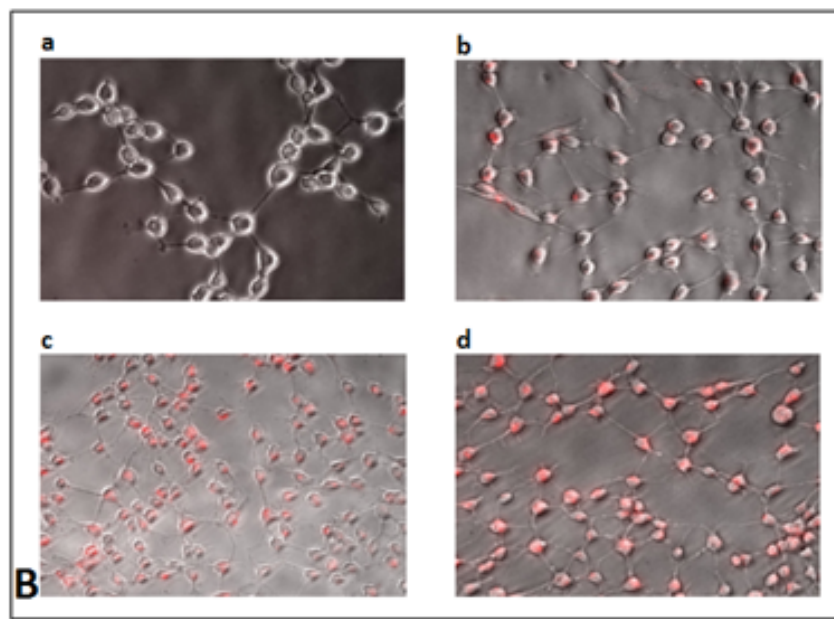
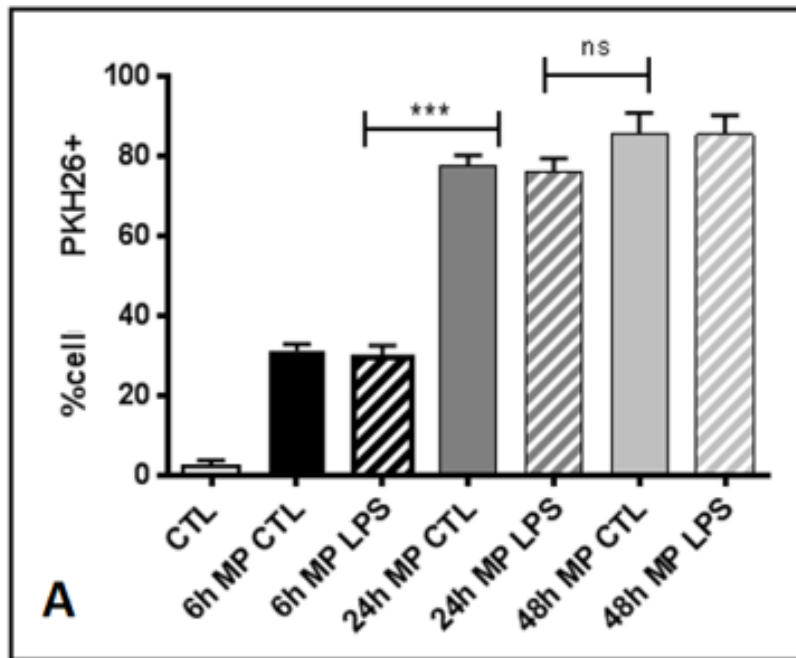


**Figure 6:** Study of the BEAS-2B cells' expression of membrane proteins and *ikB* in Western blot.





**Figure 7:** Study of BEAS-2b cells' capacity to fill a gap by scratch test. A: Optical microscope observation, 4x magnification. B: graphic representation (n = 3).



**Supplemental figure 1:** Measurement of the integration of monocyte-derived MP<sub>CTL</sub> and MP<sub>LPS</sub> into BEAS-2B cells and integration of monocyte-derived MPs into BEAS-2B cells

## Tables

|                  | Age | Gender | T1 reason       | T1 year | T1 type | BOS year | T2 year | T2 type |
|------------------|-----|--------|-----------------|---------|---------|----------|---------|---------|
| <b>Patient 1</b> | 31  | M      | Cystic fibrosis | 1995    | U       | 2004     | 2005    | U       |
| <b>Patient 2</b> | 28  | F      | Cystic fibrosis | 2007    | B       | 2008     | 2008    | B       |
| <b>Patient 3</b> | 55  | M      | Fibrosis        | 2005    | U       | 2009     | 2009    | B       |
| <b>Patient 4</b> | 58  | M      | COPD            | 2007    | B       | 2009     | 2009    | B       |
| <b>Patient 5</b> | 38  | F      | Fibrosis        | 2006    | B       | 2011     | 2012    | B       |
| <b>Patient 6</b> | 25  | M      | Cystic fibrosis | 2007    | L + IL  | 2010     | 2012    | B       |
| <b>Patient 7</b> | 38  | M      | Cystic fibrosis | 2008    | B       | 2013     | 2014    | B       |
| <b>Patient 8</b> | 59  | M      | COPD            | 2012    | B       | 2014     | 2015    | U       |
| <b>Patient 9</b> | 36  | F      | PTH             | 2005    | L + H   | 2006     | 2016    | B       |

**Table 1: Data from patients who underwent second lung transplantation for terminal BOS 3.**

|                      | Age | Gender | Tx year | Reason          | Type   | BOS year | Death |
|----------------------|-----|--------|---------|-----------------|--------|----------|-------|
| <b>Patient BO 1</b>  | 62  | M      | 2008    | Fibrosis        | U      | 2011     | Y     |
| <b>Patient BO 2</b>  | 64  | M      | 2008    | Emph. Def.      | B      | 2012     | N     |
| <b>Patient BO 3</b>  | 52  | F      | 2009    | PK              | B      | 2013     | N     |
| <b>Patient BO 4</b>  | 63  | F      | 2011    | COPD            | B      | 2012     | N     |
| <b>Patient BO 5</b>  | 64  | M      | 2011    | COPD            | B      | 2012     | N     |
| <b>Patient CTL 1</b> | 32  | M      | 2009    | Cystic fibrosis | L + Li | /        | N     |
| <b>Patient CTL 2</b> | 29  | M      | 2010    | Cystic fibrosis | B      | /        | N     |
| <b>Patient CTL 3</b> | 61  | F      | 2011    | Emph. Def.      | B      | /        | N     |
| <b>Patient CTL 4</b> | 64  | M      | 2012    | PHT             | B      | /        | N     |
| <b>Patient CTL 5</b> | 22  | F      | 2013    | Cystic fibrosis | L + IL | /        | N     |

**Table 2:** Data from pulmonary transplant patients whose circulating MPs were quantified and phenotyped.

|            | <b>Annexin 5</b> | <b>CD217-</b> | <b>CD105-</b> | <b>CD66b+</b> | <b>E-cadherin</b> |
|------------|------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|
| <b>BO</b>  | 5.46 ± 1,2       | 0.22 ± 0,05   | 0.44 ± 0,11   | 0.66 ± 0,19   | 0.02 ± 0,02       |
| <b>CTL</b> | 8.34 ± 1,6       | 0.28 ± 0,07   | 0.58 ± 0,05   | 0.50 ± 0,08   | 0.12 ± 0,02       |
| <b>p</b>   | 0.2              | 0.54          | 0.3           | 0.47          | 0.007 **          |

**Table 3: Phenotyping of circulating MPs in lung transplant patients with or without BOS.**



# Discussion

Aujourd'hui, la transplantation pulmonaire reste la principale option thérapeutique à proposer aux patients souffrant d'une insuffisance respiratoire chronique terminale. Au cours des dernières années, les principales causes pouvant amener à la réalisation d'une transplantation pulmonaire étaient la BPCO, la fibrose pulmonaire et la mucoviscidose, bien que la fréquence des patients greffés pulmonaires pour une mucoviscidose soit en très nette baisse depuis quelques années suite au développement des nouveaux traitements modulateurs de la protéine CFTR.(1,2) Le nombre de procédures annuelles de TP reste assez limité notamment en raison de la pénurie de greffons, et ne dépasse pas 400 en France. C'est pour cette raison que des critères de mise en route d'un bilan pré-greffe pulmonaire et d'inscription sur liste d'attente de greffe pulmonaire ont été développées pour chaque maladie pulmonaire, et sont régulièrement mises à jour. La bonne sélection des candidats à la greffe, ainsi que celle des donneurs sont essentielles pour optimiser la survie des receveurs après la greffe.(6)

Une bonne connaissance des complications pouvant survenir après une TP est également primordiale. Dans la première partie de ce travail, nous avons pu aborder les principales complications, notamment les différents types de rejets aigus, les infections, les complications néoplasiques et cardiovasculaires. Cependant, la principale limite de la survie à moyen et à long terme après une TP est la dysfonction chronique du greffon pulmonaire (chronic lung allograft dysfunction – CLAD).(55) De nombreux travaux ont montré que la physiopathologie du CLAD reposait essentiellement sur la répétition des agressions de nature inflammatoire auxquelles est confronté le greffon pulmonaire, en particulier, le phénomène d'ischémie-reperfusion, les épisodes de rejets aigus, les infections, le reflux gastro-œsophagien. Ce phénomène d'apparition progressive et plus ou moins rapide, est responsable d'une altération significative et irréversible des capacités fonctionnelles du greffon pulmonaire, se traduisant par une baisse du VEMS aux épreuves fonctionnelles respiratoires. L'évolution peut être variable, allant vers la stabilité, ou une dégradation plus marquée pouvant conduire jusqu'à la perte du greffon, où la seule option thérapeutique est alors la retransplantation pulmonaire, réservée un nombre très limité de patients.



Au cours des 20 dernières années, les connaissances sur le CLAD n'ont pas cessé de s'étoffer, permettant de distinguer plusieurs phénotypes selon le type d'atteinte aux épreuves fonctionnelles respiratoires (trouble ventilatoire obstructif, restrictif ou association des deux) et la présence ou non d'opacités pulmonaires persistantes sur le scanner thoracique. Le principal phénotype est le syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS), à l'origine d'une fibrose des petites voies aériennes et dont la principale entité histologique est la bronchiolite oblitérante. Le second principal phénotype est le Restrictive allograft syndrome (RAS), responsable d'une atteinte plus diffuse du greffon pulmonaire, à type de fibro-élastose pleuro-parenchymateuse.(55,58)

S'il existe des différences bien établies entre ces deux phénotypes, des travaux récents ont montré qu'il existait de nombreux chevauchements, notamment au niveau histologique, avec la présence commune de lésions de bronchiolite oblitérante. La dysfonction chronique du greffon pulmonaire, plus qu'un phénomène « tout ou rien », se rapprocherait plus d'un dégradé de lésions histologiques, où BOS et RAS en seraient les deux extrêmes.(67,70,71)

Dans ce contexte, nous avons réalisé un premier travail visant à confirmer l'existence d'un chevauchement histologique entre ces deux entités, en adaptant au greffon pulmonaire humain un score histologique semi-quantitatif, initialement développé sur un modèle de poumons greffés de souris.(71) Nos résultats ont bien confirmé l'existence d'un chevauchement entre BOS et RAS sur des paramètres histologiques ciblant l'atteinte fibreuse des petites voies aériennes, du parenchyme pulmonaire, de la plèvre et des vaisseaux. Nous avons également pu confirmer que la sévérité de cette atteinte fibreuse était corrélée à l'importance de l'inflammation présente dans le tissu pulmonaire, responsable d'une altération des capacités de l'épithélium bronchique à se régénérer, avec comme principale cible les cellules club, et la sécrétion de leur protéine CCSP.(86) Enfin, ce travail a permis de mettre en lumière le caractère très hétérogène des lésions de CLAD entre deux patients greffés ayant eu besoin d'une retransplantation pour CLAD, mais également chez un même individu.

Dans le second travail présenté dans cette thèse, nous avons souhaité évaluer la possibilité d'utiliser la technique d'Imaging mass cytometry dans l'étude du greffon pulmonaire affecté par le CLAD. Afin de continuer à améliorer nos connaissances sur la physiopathologie du CLAD, il est indispensable de développer de nouveaux outils pour permettre de caractériser les mécanismes responsables de son apparition et également de mieux distinguer les différents phénotypes. Actuellement, plusieurs techniques utilisées pour étudier le tissu pulmonaire sont basées sur la fluorescence, et sont impactées par le phénomène d'autofluorescence du tissu pulmonaire, causé par des protéines telles que le collagène. La technique d'IMC est basée sur l'utilisation d'anticorps marqués par des métaux lourds. Il est possible de marquer des biopsies de tissus avec des panels pouvant contenir jusqu'à 50 marqueurs.

Avec ce travail, nous avons pu confirmer la possibilité d'utiliser l'IMC avec un protocole adapté sur des biopsies congelées de tissu de greffon pulmonaire. A l'aide d'un panel de 35 marqueurs, ciblant notamment des protéines épithéliales et certaines sous populations immunitaires présentes dans le tissu pulmonaire et impliquées dans les phénomènes de rejet, nous avons pu obtenir des images de haute qualité, avec un très bon niveau de spécificité pour la quasi-totalité des marqueurs.

Par ailleurs, cette technique nous a également permis de mener une analyse en « single cell » et de définir de façon semi-automatique 50 clusters de cellules immunitaires et non immunitaires, selon leur niveau d'expression de chacun des 35 marqueurs. Nous avons été ainsi en mesure d'identifier plusieurs sous-populations cellulaires précises. Nous avons pu détailler des sous-populations de cellules épithéliales, dont les cellules club, dont la fréquence était significativement moins importante dans les échantillons de poumon avec BOS et RAS, comparés au contrôle. Nous avons également pu identifier deux sous-populations de cellules basales, dont une exprimant fortement Ki67, et dont la fréquence était plus importante dans les échantillons de poumons avec CLAD, en particulier RAS. Ce résultat est particulièrement intéressant car il a confirmé le rôle central des cellules basales, cellules progénitrices dans l'épithélium bronchique, dans la physiopathologie du CLAD. Cela va dans le sens de données antérieures qui montrait que la dysfonction de l'épithélium

bronchique, qui est au centre du développement du CLAD, pourrait être secondaire à un effet de sénescence accélérée de certaines cellules épithéliales, médié par des cellules inflammatoires.(190,191) Nous avons d'ailleurs pu observer à l'aide d'une étude de voisinage, que ces cellules basales étaient fréquemment à proximité de certaines sous-populations de cellules inflammatoires dans les échantillons pulmonaires avec CLAD.

Notre étude nous a également permis d'identifier des sous-populations de cellules immunitaires et de caractériser leurs relations de proximité.

Les résultats de ce premier travail portant sur l'utilisation de l'IMC sur des échantillons de greffon pulmonaire se sont avérés très encourageants et devraient amener à la réalisation d'autres études visant à les confirmer et à explorer d'autres hypothèses.

L'une des principales difficultés rencontrées dans la prise en charge du CLAD chez les patients transplantés pulmonaires, est le caractère tardif de son diagnostic. En effet, celui-ci repose essentiellement sur la baisse de la fonction respiratoire aux EFR, marqueur peu spécifique, et généralement signe d'une atteinte déjà significative du greffon. Le caractère irréversible du CLAD ainsi que le peu d'options thérapeutiques disponibles sont un motif majeur pour mettre au point des marqueurs diagnostiques précoces.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle que pourraient jouer les MPs membranaires émises par des leucocytes, dans le développement de la transition épithélio-mésenchymateuse, un des phénomènes responsables du recrutement des fibroblastes à l'origine de l'obstruction des petites voies aériennes dans la BO.

Après avoir confirmé la présence de manifestations de TEM au sein de l'épithélium bronchique de petites voies aériennes collectées sur des explants pulmonaires de patients ayant bénéficié d'une deuxième TP pour le traitement d'une forme terminale de BOS, nous avons souhaité évaluer l'intérêt en tant que biomarqueurs et le rôle en tant que bioeffecteurs des MPs dans le développement de la BOS.

Dans une étude préliminaire portant sur 5 patients greffés pulmonaires atteints par une BOS et 5 patients greffés pulmonaires indemnes, nous avons mesuré et réalisé un immunophénotypage des MPs collectées à partir de prélèvements sanguins. Nous avons pu

observer que la concentration de MPs présentant E-cadhérine, protéine épithéliale, à leur surface était significativement plus élevée chez les patients indemnes de BOS. Même si nous devons rester prudents quant à l'interprétation des résultats de cette analyse préliminaire, ils semblent confirmer l'intérêt potentiel des MPs en tant que biomarqueurs accessibles de manière peu invasive (simple prélèvement sanguin) pour le diagnostic de BOS.

Enfin, dans une étude *in vitro*, nous avons cherché à évaluer l'effet des MPs produites par des monocytes humains sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines, et la survenue éventuelle d'une TEM, en fonction des conditions à l'origine de leur émission. Nous avons pu confirmer que la production des MPs dans un contexte inflammatoire spécifique (stimulation par du LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, l'une des principales bactéries impliquées dans les épisodes infectieux post-TP), et leur application sur les cellules épithéliales bronchiques entraînaient des modifications morphologiques, fonctionnelles et d'expression de protéines évocatrices d'un phénotype mésenchymateux. Ces résultats semblaient donc confirmer l'apparition d'un phénomène de TEM après stimulation par les MPs.

Les MPs émises dans des conditions inflammatoires, et en particulier infectieuses, pourraient donc jouer un rôle en tant que bioeffecteurs dans l'initiation du phénomène de BOS. Ces résultats seront bien sûr à confirmer par d'autres travaux.

L'inflammation joue un rôle central dans la physiopathologie du CLAD, en participant notamment à la dérégulation de la TEM. Plusieurs études ayant porté sur le système activateur du plasminogène (uPA/uPAR) ont montré comment celui-ci était impliqué dans le développement de lésions de fibrose de la plèvre et du parenchyme pulmonaire.(115,116) Nous pouvons donc nous questionner sur son rôle potentiel dans l'émergence d'un phénotype de CLAD plus spécifiquement qu'un autre chez les patients greffés, avec une atteinte fibrosante pleuro-parenchymateuse plus ou moins marquée, peut-être influencée par le degré d'hypoxie tissulaire. Cette question devrait faire l'objet de travaux supplémentaires.

# Conclusion et perspectives

L'une des principales limites actuelles dans le diagnostic et la prise en charge précoce du CLAD chez les patients transplantés pulmonaires est le manque de spécificité des données cliniques, radiologiques et histologiques actuellement disponibles. Il semble donc indispensable de continuer à optimiser les outils déjà existants et de développer des nouveaux marqueurs pouvant nous permettre de poser un diagnostic plus précoce du CLAD. L'une des difficultés rencontrées est l'hétérogénéité dans l'analyse histologique pour le diagnostic du CLAD. Dans ce contexte, de nouvelles recommandations internationales ont été proposées récemment avec mise au point d'un modèle d'analyse des biopsies pulmonaires.(32) Son objectif est de faciliter les études multicentriques grâce à un protocole uniforme et à des corrélations avec de nouvelles modalités de diagnostic. Après validation dans le cadre d'études à grande échelle, un modèle optimisé pourrait être inclus dans la pratique clinique de routine afin d'améliorer l'évaluation du greffon et la prise de décision médicale. C'est dans ce sens que nous avons réalisé notre étude avec mise au point d'un score semi-quantitatif d'analyse des lésions histologiques spécifiques du CLAD, afin d'aider à homogénéiser son diagnostic à travers les centres de TP dans le monde. Il semble nécessaire de poursuivre les études allant dans ce sens.

Avec l'utilisation de l'IMC, nous avons pu obtenir une quantité importante de données de bonne qualité, à haut niveau de détails avec l'utilisation des données en « single cell » afin d'identifier des clusters de cellules spécifiques aux différents phénotypes de CLAD. L'étude de Ung et al (178) avait permis d'identifier des sous-populations de cellules immunitaires uniquement présentes dans les biopsies de foie greffé affecté par du rejet. Les perspectives avec cette technique semblent extrêmement vastes. Tout d'abord, il serait intéressant de poursuivre l'analyse de biopsies pulmonaires obtenues à partir d'explants à l'aide d'autres panels de marqueurs, notamment visant à étudier plus en détail les populations immunitaires impliquées, par exemple les lymphocytes T régulateurs dont le rôle central dans les phénomènes de rejet est à détailler. Une autre utilisation intéressante serait avec des biopsies transbronchiques, afin d'identifier plus en détail des éléments en faveur d'un rejet aigu cellulaire ou humoral. En effet, actuellement, le diagnostic de rejet aigu

repose en grande partie sur les preuves histologiques vues sur les biopsies transbronchiques, obtenues « à l'aveugle », sous contrôle scopique, avec une spécificité moyenne, notamment en raison de l'importante variabilité inter-opérateur lors de la fibroscopie, et entre les anatomopathologistes pour l'analyse des prélèvements.(31) L'IMC pourrait permettre de réaliser une analyse plus fine que celle ne reposant que sur la lecture histologique, et l'utilisation de techniques telles que l'immunofluorescence, ou l'immunohistochimie. Cela pourrait d'ailleurs se faire avec des prélèvements en « micropuces », avec plusieurs dizaines de microbiopsies provenant de patients différents, sur une seule lame, afin de limiter les coûts, et de faciliter l'accès à cette technique.

Nos résultats portant sur les microparticules membranaires en tant que biomarqueurs et bioeffecteurs étaient encourageants, bien que préliminaires. Suite à ces données, une étude a été initiée au sein du service de pneumologie des Hôpitaux universitaires de Strasbourg, en collaboration avec l'unité INSERM UMR1260. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence, doser et caractériser les microparticules au cours de la greffe pulmonaire afin de permettre la mise au point d'un outil de diagnostic précoce de la BOS à travers une étude transversale du dosage et de caractérisation des MPs chez des patients greffés pulmonaires présentant ou non une BO, et une étude longitudinale du dosage et de caractérisation des MPs totales alvéolaires (collectées dans le LBA) et circulantes (collectées dans le sang) chez des patients greffés pulmonaires sur 3 ans. Une sélection de marqueurs ciblant les cellules effectrices impliquées dans le développement de la BOS a été proposée pour le phénotypage des MPs collectées (**tableau 4**).

Le recrutement et la collection des prélèvements est actuellement terminée. Au total, 59 patients transplantés pulmonaires suivis à Strasbourg ont été inclus. Les analyses des différents prélèvements collectés devraient débuter au début de l'année 2024. Après cette étude, nous envisageons la possibilité de réaliser un projet similaire, en nous intéressant cette fois-ci aux différents phénotypes de CLAD, notamment BOS et RAS.

| <b>Effecteurs Cellulaires</b>             | <b>Récepteurs ciblés</b>          |
|---|-----------------------------------|
| Epithéliales (pneumocytes)                | RAGE                              |
| Epithéliales bronchiques                  | CCSP, MUC-5AC, p40                |
| <b><u>Lymphocytes</u></b>                 | CD11a ou LFA1                     |
| Polynucléaires Basophiles                 | CCR1 ou CCR2 ou CCR3              |
| <b><u>Polynucléaires Eosinophiles</u></b> | CCR1                              |
| <b><u>Polynucléaire Neutrophiles</u></b>  | CXCR1 ou CXCR2 ou CXCR4 ou CD 66b |
| <b><u>Monocytes / Macrophages</u></b>     | CD11b                             |
| Mastocytes                                | CXCR1 ou CXCR3 ou CXCR4           |

**Tableau 4** : Effecteurs cellulaires et leurs marqueurs pour le phénotypage des MPs sélectionnées pour l'étude en cours au sein de l'UMR 1260 – Université de Strasbourg.

D'autres méthodes pour obtenir un diagnostic précoce du CLAD sont actuellement à l'étude au sein de différentes équipes de recherche. Nous pouvons notamment citer l'utilisation du miRNA (198) et du cell-free DNA (199) dérivé du donneur, pour lesquels des données préliminaires étaient encourageantes.

Des travaux ont montré que des niveaux élevés de la forme soluble de uPAR dans le sérum de patients affectés par la COVID-19 étaient associés au degré de sévérité clinique, ainsi qu'à un plus faible pronostic.(115,200,201) Cela pourrait en faire un possible biomarqueur d'intérêt à explorer pour le diagnostic précoce du CLAD.

Enfin, plusieurs travaux de recherche clinique sont en cours pour essayer de développer de nouveaux traitements contre le CLAD.

Une étude vise à évaluer l'intérêt du Nintédanib, un anti-fibrosant, utilisé pour traiter la fibrose pulmonaire idiopathique. Il s'agit d'un inhibiteur de tyrosine kinase, qui bloque le site qui se lie à l'ATP (Adénosine Triphosphate) dans le domaine kinase du récepteur de VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGF, PDGF (à l'origine de la dissolution des jonctions adhérentes, localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine). Cette molécule est capable d'inhiber l'activation des cascades de signalisation induite par le récepteur de FGF et le récepteur de PDGF jouant un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation des fibroblastes.(202–205) L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité du Nintédanib chez



des patients atteints d'une dysfonction chronique du greffon pulmonaire type BOS, et sa capacité à limiter la baisse de fonction respiratoire. Le recrutement des patients est actuellement en cours.

Une autre essai thérapeutique international également en cours, vise quant à lui à évaluer l'efficacité des nébulisations de Ciclosporine A liposomale chez des patients atteints d'un rejet chronique type BOS. Une première étude multicentrique de phase 3 ayant inclus 180 patients comparant des patients recevant le traitement à des patients témoins, avait montré une bonne tolérance du traitement, mais seulement une tendance à une meilleure survie sans BOS dans le groupe traité sans différence significative.(206) Ces résultats encourageants ont entraîné la mise en place du nouveau protocole actuellement en cours.



# Communications orales et affichées



## ABSTRACTS/PRESENTATIONS

1. **Renaud-Picard B**, Daigneault T, Berra G, Mekhael O, Fortunato J, Hwang D, Pal P, Juvet S, Martinu T. Airway epithelial cell apoptosis in acute cellular rejection (ACR) and chronic lung allograft dysfunction (CLAD).  
*ISHLT meeting 2023, Denver (poster)*
2. **Renaud-Picard B**, Chang Q, Moshkelgosha S, Berra G, Hwang D, Juvet S, Martinu T. Imaging mass cytometry for detailed cellular and spatial characterization of chronic lung allograft dysfunction.  
*ISHLT meeting 2022, Boston (oral communication)*
3. **Renaud-Picard B**, Daigneault T, Hwang D, Berra G, Pal P, Martinu T. Assessment of airway epithelial damage related to B-grade airway-centered acute rejection  
*ISHLT meeting 2021 (oral communication)*
4. **Renaud-Picard B**, Berra G, Hwang D, Miyamoto E, Berry G, Pal P, Juvet S, Keshavjee S, Martinu T. Spectrum of chronic lung allograft pathology in human lung transplantation.  
*ISHLT meeting, 2021 (oral communication)*
5. **Renaud-Picard B**, Chang Q, Ornatsky O, Moshkelgosha S, Hwang D, Juvet S, Martinu T. Imaging mass cytometry to assess the pathology of chronic lung allograft dysfunction.  
*ISHLT meeting, 2021 (short communication)*
6. **Renaud-Picard B**, Chang Q, Moshkelgosha S, Hwang D, Juvet S, Martinu T. Imaging mass cytometry to assess the pathology of chronic lung allograft dysfunction.  
*TGHRI Research day, Toronto, 2019 (poster)*
7. **Renaud-Picard B**, Valliere K, Kreutter G, Toti F, Chenard MP, Kessler L, Kessler R. Epithelial to mesenchymal transition in chronic lung allograft dysfunction : role of leukocytes microparticles.  
*Congrès de Pneumologie de langue Française, Lyon, 2018 (oral presentation)*
8. **Renaud-Picard B**, Toussaint J, El Ghazouani F, Kreutter G, Toti F, Kessler L, Kessler R. *Epithelial-mesenchymal transition in chronic lung allograft dysfunction. Role of leucocytes microparticles.*  
*European Respiratory Society, London, 2016 (oral presentation)*
9. **Renaud-Picard B**. Membrane microparticles in lung diseases.  
*International conference on end stage lung diseases, Padova, 2016 (oral presentation)*
10. **Renaud-Picard B**, El Ghazouani F, Kreutter G, Toti F, Kessler L, Kessler R. Effect of leukocytes microparticles in epithelial-mesenchymal transition. Interest in lung transplantation.
  - a) *Congrès de la société française de transplantation, Lille, 2015 (oral presentation)*
  - b) *Congrès de Pneumologie de langue Française, Lille, 2016 (poster)*



# Publications scientifiques



## Epithelial-mesenchymal transition and membrane microparticles: Potential implications for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation



Benjamin Renaud-Picard<sup>a,b,c,\*</sup>, Kevin Vallière<sup>b</sup>, Justine Toussaint<sup>b</sup>, Guillaume Kreutter<sup>b</sup>, Ali El-Habhab<sup>b</sup>, Mohamad Kassem<sup>b</sup>, Fatiha El-Ghazouani<sup>b</sup>, Anne Olland<sup>b,c,d</sup>, Sandrine Hirschi<sup>a</sup>, Michele Porzio<sup>a</sup>, Marie-Pierrette Chenard<sup>c</sup>, Florence Toti<sup>b</sup>, Laurence Kessler<sup>b,c</sup>, Romain Kessler<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Respiratory Medicine and Strasbourg Lung Transplant Program, University Hospital of Strasbourg, France

<sup>b</sup> INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, University of Strasbourg, France

<sup>c</sup> Faculty of Medicine, Federation of Translational Medicine (FMTS), Strasbourg, France

<sup>d</sup> Department of Thoracic Surgery and Strasbourg Lung Transplant Program, University Hospital of Strasbourg, France

\* Department of Pathology, University Hospital of Strasbourg, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords

lung transplantation  
Bronchiolitis obliterans  
Microparticles  
Biomarker

### ABSTRACT

Long term survival post lung transplantation (LTx) is limited by the occurrence of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). One mechanism involved is the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Membrane microparticles (MPs) are known to be involved in some respiratory diseases and in other organs allograft rejection episodes. We hypothesized that leukocyte-derived MPs likely contribute to EMT. To emphasize this physiological concept, our objectives were to: (1) confirm the presence of EMT on explanted lungs from patients who underwent a second LTx for BOS; (2) characterize circulating MPs in transplanted patients, with or without BOS; (3) evaluate *in vitro* the effect of monocyte-derived MPs in EMT of human bronchial epithelial cells. Our IHC analysis on explanted graft lungs revealed significant pathological signs of EMT with an inhomogeneous destruction of the bronchial epithelium, with decreased expression of the epithelial protein E-cadherin and increased expression of the mesenchymal protein Vimentin. The immunophenotyping of MPs demonstrated that the concentration of MPs carrying E-cadherin was lower in patients affected by BOS ( $p = .007$ ). *In vitro*, monocyte-derived MPs produced with LPS were associated with decreased E-cadherin expression ( $p < .05$ ) along with significant morphological and functional cell modifications. MPs may play a role in EMT onset in bronchial epithelium following LTx.

### Abbreviations

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| Ann-5         | annexin-5                             |
| ARDS          | acute respiratory distress syndrome   |
| $\alpha$ -SMA | alpha smooth muscle actin             |
| AU            | arbitrary units                       |
| BALF          | broncho-alveolar lavage fluid         |
| BOS           | bronchiolitis obliterans syndrome     |
| COPD          | chronic obstructive pulmonary disease |
| CDK           | cyclin-dependent kinase               |
| CLAD          | chronic lung allograft dysfunction    |
| ECM           | extracellular matrix                  |
| EMT           | epithelial to mesenchymal transition  |
| FBS           | fetal bovine serum                    |

|                    |  |
|--------------------|--|
| FEV1               | forced expiratory volume second  |
| HE                 | hematoxylin eosin  |
| IL-8               | interleukin 8  |
| INF $\gamma$       | interferon gamma   |
| LPS                | lipopolysaccharide   |
| LTx                | lung transplantation   |
| mAbs               | monoclonal antibodies  |
| MMP-9              | matrix metalloproteinase-9   |
| MP                 | microparticle  |
| MP <sub>ctrl</sub> | THP-1 monocyte-derived microparticle control                                     |
| MP <sub>LPS</sub>  | THP-1 monocyte-derived microparticles stimulated with LPS of <i>P.Aeruginosa</i> |
| MUC 1              | mucin 1  |
| OB                 | obstructive bronchiolitis  |
| PHT                | pulmonary hypertension   |
| PhdSer             | phosphatidylserin  |

\* Corresponding author at: Department of Respiratory Medicine and Strasbourg Lung Transplant Program, University Hospital of Strasbourg, France.

E-mail address: [benjamin.renaudpicard@chru-strasbourg.fr](mailto:benjamin.renaudpicard@chru-strasbourg.fr) (B. Renaud-Picard).

<sup>1</sup> Postal address: Department of Pneumology – Nouvel Hôpital Civil – 1 place de l'Hôpital – 67,091 STRASBOURG - FRANCE

<https://doi.org/10.1016/j.trim.2020.101273>

Received 6 September 2019; Received in revised form 20 February 2020; Accepted 20 February 2020

Available online 22 February 2020

0966-3274/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.





ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

## Microparticules membranaires et maladies respiratoires



*Membranous microparticles and respiratory disease*

B. Renaud-Picard<sup>a,\*</sup>, J. Toussaint<sup>b</sup>, A. Leclercq<sup>a,b</sup>,  
J. Reeb<sup>b</sup>, L. Kessler<sup>b</sup>, F. Toti<sup>b</sup>, R. Kessler<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Service de pneumologie, nouvel hôpital Civil, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> EA 7293, fédération de médecine translationnelle, université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Reçu le 21 avril 2016 ; accepté le 5 mai 2017

Disponible sur Internet le 11 novembre 2017

### MOTS CLÉS

Bio-effecteurs ;  
Biomarqueurs ;  
Cellules ;  
Microparticules

**Résumé** Les microparticules (MP) sont des fragments de membrane plasmiques émis par les cellules après stimulation physiologique ou lors d'un stress comme l'inflammation ou les infections. Leur production est corrélée au taux d'apoptose cellulaire. Toutes les cellules peuvent produire des MP, mais elles sont principalement émises par les plaquettes, les cellules endothéliales et les leucocytes. Elles sont porteuses de nombreuses molécules bio-actives, caractéristiques de la cellule parentale qui leur confèrent des capacités de biomarqueurs et de bio-effecteurs. Les MP sont présentes dans la circulation sanguine, mais aussi les tissus et divers fluides biologiques. Le taux de MP circulantes peut varier au cours de multiples pathologies. Elles ont été le sujet de nombreuses études dans le domaine des maladies cardiovasculaires et de l'oncologie. Au niveau pulmonaire, elles sont présentes dans le sang et dans le compartiment aérien. Elles semblent jouer un rôle dans l'homéostasie pulmonaire à l'état physiologique mais également dans l'expression de diverses pathologies. Dans cette revue de la littérature, nous nous sommes intéressés aux variations quantitatives et qualitatives des MP ainsi qu'à leur impact potentiel au cours des pathologies des voies aériennes telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, la fibrose pulmonaire et l'hypertension pulmonaire.

© 2017 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : benjaminrenaud@free.fr (B. Renaud-Picard).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.10.005>

0761-8425/© 2017 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

# Acute Rejection in the Modern Lung Transplant Era

Benjamin Renaud-Picard, MD<sup>1,\*</sup> Angela Koutsokera, MD, PhD<sup>2,\*</sup> Michael Cabanero, MD<sup>3</sup>  
Tereza Martinu, MD, MHS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Respiriology and Toronto Lung Transplant Program, University of Toronto and University Health Network, Toronto, Canada

<sup>2</sup>Division of Pulmonology, Lung Transplant Program, Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

<sup>3</sup>Department of Pathology, Toronto General Hospital, University Health Network, Toronto, Canada

Address for correspondence: Tereza Martinu, MD, MHS, Division of Respiriology and Toronto Lung Transplant Program, University of Toronto and University Health Network, 585 University Avenue, PMB 11-128, Toronto, ON M5G 2N2, Canada (e-mail: tereza.martinu@uhn.ca).

Semin Respir Crit Care Med 2021;42:411–427.

## Abstract

Acute cellular rejection (ACR) remains a common complication after lung transplantation. Mortality directly related to ACR is low and most patients respond to first-line immunosuppressive treatment. However, a subset of patients may develop refractory or recurrent ACR leading to an accelerated lung function decline and ultimately chronic lung allograft dysfunction. Infectious complications associated with the intensification of immunosuppression can also negatively impact long-term survival. In this review, we summarize the most recent evidence on the mechanisms, risk factors, diagnosis, treatment, and prognosis of ACR. We specifically focus on novel, promising biomarkers which are under investigation for their potential to improve the diagnostic performance of transbronchial biopsies. Finally, for each topic, we highlight current gaps in knowledge and areas for future research.

## Keywords

- ▶ lung transplantation
- ▶ acute rejection
- ▶ cellular rejection
- ▶ transplant immunology

The main obstacle to organ transplantation remains rejection, caused by recipient immune cells that recognize and damage donor tissues. Rejection is primarily classified based on timing: hyperacute rejection occurs immediately on organ implantation and is caused by preexisting donor-specific antibodies. Acute rejection evolves over the course of days to months and is mediated by adaptive immune cells that learn to recognize donor antigens. Acute rejection can be driven primarily by T-cells, called acute cellular rejection (ACR), or by antibodies, called antibody-mediated rejection (AMR). The recurrent injuries sustained by the allograft as a result of acute rejection or other external stimuli lead to chronic rejection over the long run, characterized classically by irreversible fibrosis, and referred to as chronic lung allograft dysfunction (CLAD) in the case of lung transplantation (LTx). This section will focus on ACR while AMR and CLAD are covered in other sections.

\* These authors contributed equally.

## Epidemiology

Most LTx recipients will experience ACR at some point after transplantation. However, the rates of ACR described in the literature vary significantly depending on the definition applied and also on the monitoring approaches used by different LTx centers. Most of the time, ACR is defined as the identification of perivascular lymphocytic inflammation on transbronchial biopsies; however, some studies report on ACR treatment episodes, many of which may be empiric. According to 2015 to 2018 data of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) Registry, 26.6% recipients have received treatment for ACR in the first year after transplant,<sup>1</sup> whereas biopsy-proven ACR in the first posttransplant year was identified in 53.5% LTx recipients in a recent multicenter observational study.<sup>2</sup> The risk of ACR appears to be highest within the first 3 to 6 months posttransplant and decreases thereafter.<sup>3–7</sup>

Issue Theme Lung Transplantation: Controversies and Evolving Concepts; Guest Editors: John A. Belperio, MD, and Scott M. Palmer, MD

© 2021. Thieme. All rights reserved. Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 10001, USA

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0041-1729542>. ISSN 1069-3424.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

# Transplantation pulmonaire pour mucoviscidose et autres bronchectasies



*Lung transplantation for cystic fibrosis and bronchiectasis*

B. Renaud-Picard<sup>a,\*</sup>, A. Tissot<sup>b,c</sup>, P.R. Burgel<sup>d,e</sup>,  
D. Grenet<sup>f</sup>, S. de Miranda<sup>f</sup>, B. Coiffard<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Service de pneumologie, groupe de transplantation pulmonaire, hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>b</sup> CHU Nantes, service de pneumologie, institut du Thorax, Nantes, France

<sup>c</sup> Nantes université, Inserm, center for research in transplantation and translational immunology, UMR 1064, 44000 Nantes, France

<sup>d</sup> Université Paris Cité, Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France

<sup>e</sup> Pulmonary department, national cystic fibrosis reference centre, Cochin hospital, Assistance publique–Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>f</sup> Service de pneumologie, hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>g</sup> Service de pneumologie, équipe de transplantation pulmonaire, centre hospitalo-universitaire Nord, Assistance publique–Hôpitaux de Marseille, Aix-Marseille université, Marseille, France

Disponible sur Internet le 6 janvier 2023

## Introduction

La mucoviscidose était l'une des principales indications de transplantation pulmonaire (TxP) jusqu'à très récemment. La proportion de patients transplantés pour cette indication tendait à diminuer ces 20 dernières années, du fait de l'augmentation du nombre de TxP pour les autres indications [15,2 % du total des transplantations pulmonaires adultes de 1995 à juin 2018 et jusqu'à 65,4 % des transplantations pulmonaires pédiatriques des 11–17 ans sur la période de 2002 à juin 2018 déclarées dans le registre de l'*International*

*Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)*] [1]. Cette baisse du nombre de TxP pour mucoviscidose a également été constatée en France où cette indication représentait environ 20 % du nombre de greffes totales jusqu'en 2019, contre seulement 12 % en 2020 selon le rapport annuel de l'agence de biomédecine (82 greffes pulmonaires pour mucoviscidose en 2019, versus 35 en 2020) [2].

La médiane de survie post-TxP pour mucoviscidose est de 9,9 ans selon le registre de l'ISHLT [1], et de 10,8 ans selon le registre Français de la mucoviscidose en 2020 [3], la plus longue parmi l'ensemble des indications. La TxP a permis une amélioration du pronostic de la mucoviscidose au cours des 20 dernières années [4]. Si l'atteinte respiratoire est au premier plan, les patients atteints de mucoviscidose sont aussi sujets à d'autres complications notamment infectieuses, digestives ou hépatiques, qui

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : benjamin.renaudpicard@chru-strasbourg.fr (B. Renaud-Picard).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.12.011>

0761-8425/© 2022 Publié par Elsevier Masson SAS au nom de SPLF.



ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

## Transplantation pulmonaire en France : actualisation des indications et contre-indications en 2022



*Updated indications and contraindications in 2022 for lung transplantation in France*

J. Le Pavec<sup>a,b,c,\*</sup>, C. Pison<sup>d,e,f</sup>, S. Hirschi<sup>g</sup>, V. Bunel<sup>h</sup>,  
P. Mordant<sup>i</sup>, O. Brugière<sup>j</sup>, M. Le Guen<sup>k,l,m</sup>,  
A. Olland<sup>n,o</sup>, B. Coiffard<sup>p</sup>, B. Renaud-Picard<sup>g,o</sup>,  
A. Tissot<sup>q,r</sup>, G. Brioude<sup>s</sup>, R. Borie<sup>t</sup>, B. Crestani<sup>t</sup>,  
G. Deslée<sup>u</sup>, S. Stelianides<sup>v</sup>, H. Mal<sup>h</sup>, A. Schuller<sup>g</sup>,  
L. Falque<sup>d</sup>, G. Lorillon<sup>w</sup>, A. Tazi<sup>w</sup>, P.R. Burgel<sup>x</sup>,  
D. Grenet<sup>j</sup>, S. De Miranda<sup>j</sup>, A. Bergeron<sup>y,z</sup>,  
D. Launay<sup>aa,ab,ac,ad</sup>, V. Cottin<sup>ae</sup>, H. Nunes<sup>af,ag</sup>,  
D. Valeyre<sup>af,ah</sup>, Y. Uzunhan<sup>af,ag</sup>, G. Prévot<sup>ai</sup>,  
O. Sitbon<sup>aj,b,c</sup>, D. Montani<sup>aj,b,c</sup>, L. Savale<sup>aj,b,c</sup>,  
M. Humbert<sup>aj,b,c</sup>, E. Fadel<sup>aj,b,c</sup>, O. Mercier<sup>ak,b,c</sup>,  
J.F. Mornex<sup>al,am</sup>, G. Dauriat<sup>a</sup>, M. Reynaud-Gaubert<sup>p</sup>

<sup>a</sup> Service de pneumologie et transplantation pulmonaire, Groupe hospitalier Marie-Lannelongue-Saint Joseph, Le Plessis-Robinson, France

<sup>b</sup> Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France

<sup>c</sup> UMR\_S 999, Université Paris-Sud, Inserm, Groupe hospitalier Marie-Lannelongue-Saint Joseph, Le Plessis-Robinson, France

<sup>d</sup> Service Hospitalier Universitaire Pneumologie Physiologie, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

<sup>e</sup> Inserm1055, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Grenoble, France

\* Auteur correspondant. Service de Pneumologie et Transplantation Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris-Saint Joseph, 133 avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France.

Adresse e-mail : lepavec@gmail.com (J. Le Pavec).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.10.005>

0761-8425/© 2022 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

# Risk assessment of chronic lung allograft dysfunction phenotypes: Validation and proposed refinement of the 2019 International Society for Heart and Lung Transplantation classification system



Liran Levy, MD,<sup>a,b</sup> Ella Huszti, PhD,<sup>c</sup> Benjamin Renaud-Picard, MD,<sup>a</sup> Gregory Berra, MD,<sup>a</sup> Mitsuaki Kawashima, PhD,<sup>a</sup> Akihiro Takahagi, MD,<sup>a</sup> Eyal Fuchs, MD,<sup>a</sup> Rasheed Ghany, MSc,<sup>a</sup> Sajad Moshkelgosha, PhD,<sup>a</sup> Shaf Keshavjee, MD,<sup>a</sup> Lianne G. Singer, MD,<sup>a</sup> Jussi Tikkanen, PhD,<sup>a,1</sup> and Tereza Martinu, MD<sup>a,1</sup>

From the <sup>a</sup>Toronto Lung Transplant Program, University Health Network, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; <sup>b</sup>Institute of Pulmonary Medicine, Sheba Medical Center, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; and the <sup>c</sup>Biostatistics Research Unit, University Health Network, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

## KEYWORDS:

lung transplant;  
chronic lung allograft  
dysfunction  
phenotypes;  
restrictive allograft  
syndrome;  
bronchiolitis obliterans  
syndrome;  
mixed phenotype

**BACKGROUND:** Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is a heterogeneous condition. Characterization of CLAD phenotypes is essential to enhance the understanding of pathogenesis and guide new therapies. The study objective was to validate the new International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) CLAD classification system and further explore patients who do not fall into the defined CLAD sub-categories.

**METHODS:** We performed a single-center, retrospective cohort study of adult, first, bilateral lung transplants performed from 2010 to 2015. Patients with CLAD were classified on the basis of the 2019 ISHLT consensus document. CLAD phenotypes and other potential predictors of survival after CLAD onset were assessed using Kaplan–Meier and Cox proportional hazards models.

**RESULTS:** Among the 174 subjects with CLAD, 104 (59.8%) had bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), 16 (9.2%) restrictive allograft syndrome (RAS), 9 (5.2%) mixed, and 19 (10.9%) undefined phenotype. A total of 26 patients (14.9%) did not match any of these 4 categories and remained unclassified. Allograft survival post-CLAD onset was longer for patients with BOS (median, 500 days) than patients with RAS (median, 372 days) or mixed (median, 328 days). The 45 patients (26.8%) with undefined/unclassified phenotype were combined and recategorized on the basis of the presence or absence of characteristic RAS-like opacities on chest imaging; those with RAS-like opacities had significantly worse allograft survival than patients with BOS (hazard ratio, 2.14; 95% confidence interval, 1.17–3.93;  $p = 0.014$ ) and similar survival to RAS or mixed phenotype.

See Related Editorial, page 771

<sup>1</sup>These authors have contributed equally to this work.

Reprint requests: Liran Levy, MD, Toronto General Hospital, 585 University Ave, PMB 11-129, Toronto, Ontario M5G 2N2, Canada.  
Telephone: +1 416 340 4996. Fax: +1 416 340 3609.  
E-mail addresses: [levyliran361@gmail.com](mailto:levyliran361@gmail.com), [liran.levy@uhn.ca](mailto:liran.levy@uhn.ca)

ORIGINAL CLINICAL SCIENCE

# Phenotyping CLAD after single lung transplant: Limits and prognostic assessment of the 2019 ISHLT classification system



Gregory Berra MD,<sup>a</sup> Ella Huszti, PhD,<sup>b</sup> Liran Levy MD,<sup>a</sup>  
Mitsuaki Kawashima, MD, PhD,<sup>a</sup> Eyal Fuchs, MD,<sup>a</sup>  
Benjamin Renaud-Picard, MD,<sup>a</sup> Peter Riddell, MD,<sup>a</sup> Olivia Dias, MD,<sup>a</sup>  
Srinivas Rajagopala, MD,<sup>a</sup> Ambilly Ulahannan, BSc,<sup>a</sup>  
Rasheed Ghany, BSc, MSc,<sup>a</sup> Lianne Gail Singer, MD,<sup>a</sup>  
Jussi Tikkanen, MD, PhD,<sup>a</sup> and Tereza Martinu, MD, MHS<sup>a</sup>

From the <sup>a</sup>Toronto Lung Transplant Program, Toronto General Hospital Research Institute, Toronto, Ontario, Canada; and the <sup>b</sup>Biostatistics Research Unit, University Health Network, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

## KEYWORDS:

lung transplantation;  
chronic rejection;  
chronic lung allograft  
dysfunction;  
phenotype;  
unilateral;  
single lung transplant

**BACKGROUND:** Phenotyping chronic lung allograft dysfunction (CLAD) in single lung transplant (SLTX) is challenging, due to the native lung contribution to pulmonary function test (PFT). We aimed to assess the applicability and prognostic performance of International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) classification in SLTX.

**METHODS:** In this retrospective study of adult, first, SLTX performed 2009–2017, patients with persistent drop in FEV1 $\geq$ 20% were assessed by 2 independent adjudicators to determine CLAD status and phenotype. Interobserver agreement (IOA) was calculated (Cohen's Kappa) for CLAD, phenotype and presence of RAS (restrictive allograft syndrome)-like opacities (RLO). Association of CLAD phenotypes with time to death or retransplant (ReTx), adjusted for age at SLTX, sex, CMV mismatch and native lung condition, were assessed using Cox proportional hazards models.

**RESULTS:** Of 172 SLTX recipients, 92 experienced a persistent drop in FEV1 $>$ 20%. Following adjudication, 67 were diagnosed with CLAD. We noted a moderate IOA for CLAD diagnosis (Kappa 0.69) and poor IOA for phenotype adjudication (Kappa 0.52). The final phenotype adjudication was 31 bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) (46.3%), 13 RAS (19.4%), 2 mixed (3%), 2 Undefined (3%), and 19 remained Unclassified (28.3%). Using these adjudicated phenotypes, RAS was significantly associated with a higher risk of death/ReTx compared to other groups (HR 2.98, 95%CI [1.39–6.4]). The adjudication of RLO had the best IOA (Kappa 0.73). The presence of RLO was a strong predictor of death or ReTx (HR 2.37, 95%CI [1.2–4.5]), regardless of the final phenotype.

**CONCLUSIONS:** PFT interpretation is challenging in SLTX. A classification essentially relying on imaging, which harbored good IOA, obtained better prognostic performance than a classification using published physiological cut-offs.

J Heart Lung Transplant 2022;41:599–607

© Published by Elsevier Inc. on behalf of International Society for Heart and Lung Transplantation.

**Abbreviations:** CLAD, chronic lung allograft dysfunction; BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; RAS, restrictive allograft syndrome; SLTX, single lung transplantation; BLTX, bilateral lung transplantation; PFT, pulmonary function tests; RLO, RAS-like opacities; ReTx, retransplantation

Reprint requests: Tereza Martinu, MD MHS, Toronto General Hospital, University Health Network, 585 University Ave, PMB 11 128, Toronto, ON, Canada, M5G 2N2. Telephone: 416 340 4800. Fax: 416 340 3609.  
E-mail address: [tereza.martinu@uhn.ca](mailto:tereza.martinu@uhn.ca)

1053-2498/\$ - see front matter © Published by Elsevier Inc. on behalf of International Society for Heart and Lung Transplantation.  
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.01.015>

# Pulmonary epithelial markers in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction



Liran Levy, MD,<sup>a,b,†</sup> Sajad Moshkelgosha, PhD,<sup>a,†</sup> Ella Huszti, PhD,<sup>c,d</sup>  
Sarah Hunter, BSc, BScN,<sup>a</sup> Benjamin Renaud-Picard, MD,<sup>a</sup> Gregory Berra, MD,<sup>a</sup>  
Mitsuaki Kawashima, MD, PhD,<sup>a</sup> Juan Fernandez-Castillo, MD,<sup>a</sup>  
Eyal Fuchs, MD,<sup>a</sup> Milagros Dianti, MD,<sup>a</sup> Rasheed Ghany, PhD,<sup>a</sup>  
Shaf Keshavjee, MD, MSc,<sup>a,d</sup> Lianne G. Singer, MD,<sup>a,d</sup>  
Jussi Tikkanen, MD, PhD,<sup>a</sup> and Tereza Martinu, MD, MHS<sup>a,d</sup>

From the <sup>a</sup>Toronto Lung Transplant Program, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada; <sup>b</sup>Institute of Pulmonary Medicine, Sheba Medical Center, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, Tel Aviv, Israel; <sup>c</sup>Biostatistics Research Unit, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada; and the <sup>d</sup>University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

## KEYWORDS:

lung transplant;  
chronic lung allograft  
dysfunction  
phenotypes;  
restrictive allograft  
syndrome;  
mixed phenotype;  
bronchiolitis obliterans  
syndrome;  
epithelial cell death

**BACKGROUND:** Airway epithelial injury is thought to be a key event in the pathogenesis of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). We investigated whether markers of epithelial activity and injury in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) correlate with CLAD diagnosis and major CLAD phenotypes: bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) vs restrictive allograft syndrome (RAS)-related phenotypes (including RAS, mixed phenotype, and all other patients with RAS-like opacities).

**METHODS:** CLAD status and phenotypes were retrospectively determined in a cohort of all consecutive adult, first, bilateral lung transplants performed 2010-2015, with available BAL samples. All patients with RAS-related phenotypes were included and 1:1 matched with BOS patients based on the time from transplant to CLAD-onset. Subjects who were CLAD-free for a minimum of 3 years post-transplant were 1:1 matched to CLAD patients and included as controls. Proteins that maintain the barrier function of the airway epithelial mucosa (club cell secretory protein, surfactant protein D and epithelial mucins: MUC1, MUC5AC, MUC5B, MUC16), as well as epithelial cell death markers (M30&M65 representing epithelial cell apoptosis and overall death, respectively), were measured in BAL obtained within 6 months post CLAD onset using a double sandwich ELISA or a multiplex bead assay. Protein levels were compared using Mann Whitney U test. Association between protein levels and graft survival was assessed using Cox proportional hazards models, adjusted for CMV serology mismatch status and CLAD phenotype.

**RESULTS:** Fifty-four CLAD (27 BOS, 11 RAS, 7 mixed, 9 others with RAS-like opacities) patients and 23 CLAD-free controls were included. Median BAL levels were significantly higher in patients with CLAD compared to CLAD-free controls for M30 (124.5 vs 88.7 U/L), MUC1 (6.8 vs 3.2 pg/mL), and MUC16 (121.0 vs 30.1 pg/mL). When comparing CLAD phenotypes, M30 was significantly higher in patients with RAS-related phenotypes than BOS (160.9 vs 114.6 U/L). In multivariable models, higher M30 and MUC5B levels were associated with decreased allograft survival after CLAD onset independent of phenotype ( $p < 0.05$  for all).

<sup>†</sup>Both authors contributed equally to this manuscript.

Reprint requests: Tereza Martinu, MD, Toronto General Hospital, 585 University Avenue, PMB 11-128, Toronto, Ontario, Canada, M5G 2N2. Telephone: +416 340-3277.

E-mail address: [tereza.martinu@uhn.ca](mailto:tereza.martinu@uhn.ca)





# Références bibliographiques

1. 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 - PubMed [Internet]. [cited 2023 Jul 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31548030/>
2. Agence de la biomédecine n.d. <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-cardio-pulmonaire-et-pulmonaire-0>(accessed February 17, 2022).
3. Le Pavec J, Pison C, Hirschi S, Bunel V, Mordant P, Brugière O, et al. 2022 Update of indications and contraindications for lung transplantation in France. *Respir Med Res*. 2023 Jun;83:100981.
4. Chambers DC, Perch M, Zuckermann A, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-eighth adult lung transplantation report — 2021; Focus on recipient characteristics. *J Heart Lung Transplant*. 2021 Oct;40(10):1060–72.
5. Martin C, Reynaud-Gaubert M, Hamidfar R, Durieu I, Murriss-Espin M, Danner-Boucher I, et al. Sustained effectiveness of elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor in lung transplant candidates with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2022 May;21(3):489–96.
6. Leard LE, Holm AM, Valapour M, Glanville AR, Attawar S, Aversa M, 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 Nov;40(11):1349–79.
7. Fernandez R, Safaeinili N, Kurihara C, Odell DD, Jain M, DeCamp MM, et al. Association of body mass index with lung transplantation survival in the United States following implementation of the lung allocation score. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018 Apr;155(4):1871-1879.e3.
8. Dew MA, Rosenberger EM, Myaskovsky L, DiMartini AF, DeVito Dabbs AJ, Posluszny DM, et al. Depression and Anxiety as Risk Factors for Morbidity and Mortality After Organ Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplantation*. 2015 May;100(5):988–1003.
9. Weill D, Benden C, Corris PA, Dark JH, Davis RD, Keshavjee S, 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*. 2015 Jan;34(1):1–15.
10. Omara M, Okamoto T, Arafat A, Thuita L, Blackstone EH, McCurry KR. Lung transplantation in patients who have undergone prior cardiothoracic procedures. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Dec;35(12):1462–70.
11. Bos S, Vos R, Van Raemdonck DE, Verleden GM. Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020? *Curr Opin Organ Transplant*. 2020 Jun;25(3):268–73.
12. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report-2009. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Oct;28(10):1031–49.
13. Knoop C, Dumonceaux M, Rondelet B, Estenne M. [Complications of lung transplantation]. *Rev Mal Respir*. 2010 Apr;27(4):365–82.
14. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Oct;33(10):1009–24.

15. Snell GI, Yusef RD, Weill D, Strueber M, Garrity E, Reed A, 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*. 2017 Oct;36(10):1097–103.
16. Christie JD, Van Raemdonck D, de Perrot M, Barr M, Keshavjee S, Arcasoy S, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Oct;24(10):1451–3.
17. Noninfectious pulmonary complications after lung transplantation - PubMed [Internet]. [cited 2023 Oct 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16263400/>
18. H. Mal, G. Thabut E. EM-Consulte. [cited 2023 Oct 28]. Prise en charge de la transplantation pulmonaire en réanimation. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/95329/prise-en-charge-de-la-transplantation-pulmonaire-e>
19. Lindstedt S, Niroomand A, Mittendorfer M, Hirdman G, Hyllén S, Pierre L, et al. Nothing but NETs: Cytokine adsorption correlates with lower circulating nucleosomes and is associated with decreased primary graft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2023 Oct;42(10):1358–62.
20. Niroomand A, Hirdman G, Pierre L, Ghaidan H, Kjellström S, Stenlo M, et al. Proteomic changes to immune and inflammatory processes underlie lung preservation using ex vivo cytokine adsorption. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1274444.
21. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, et al. The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1312–6.
22. Prekker ME, Nath DS, Walker AR, Johnson AC, Hertz MI, Herrington CS, et al. Validation of the proposed International Society for Heart and Lung Transplantation grading system for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Apr;25(4):371–8.
23. Van der Bij W, Speich R. Infectious complications after lung transplantation. *Eur Respir Mon*; 2003; 26: 193–207.
24. Guidelines for the prevention and management of infectious complications of solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:1—166.
25. Silverborn M, Jeppsson A, Mårtensson G, Nilsson F. New-onset cardiovascular risk factors in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Oct;24(10):1536–43.
26. Amital A, Shitrit D, Raviv Y, Bendayan D, Sahar G, Bakal I, et al. Development of malignancy following lung transplantation. *Transplantation*. 2006 Feb 27;81(4):547–51.
27. Yusef RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Oct;33(10):1009–24.
28. Chambers DC, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D, Hsich E, Khush KK, 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*. 2019 Oct;38(10):1042–55.

29. Todd JL, Neely ML, Kopetskie H, Sever ML, Kirchner J, Frankel CW, et al. Risk Factors for Acute Rejection in the First Year after Lung Transplant. A Multicenter Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Aug 15;202(4):576–85.
30. Renaud-Picard B, Koutsokera A, Cabanero M, Martinu T. Acute Rejection in the Modern Lung Transplant Era. *Semin Respir Crit Care Med*. 2021 Jun;42(3):411–27.
31. Gordon IO, Borhade S, Vigneswaran WT, Garrity ER, Husain AN. SaLUTaRy: survey of lung transplant rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Sep;31(9):972–9.
32. Calabrese F, Roden AC, Pavlisko E, Lunardi F, Neil D, Adam B, et al. Lung allograft standardized histological analysis (LASHA) template: A research consensus proposal. *J Heart Lung Transplant*. 2022 Oct;41(10):1487–500.
33. Hsiao HM, Scozzi D, Gauthier JM, Kreisel D. Mechanisms of graft rejection after lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017 Feb;22(1):29–35.
34. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi MC. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Nov 1;3(11):a015461.
35. Li XC, Jevnikar AM, eds. *Transplant Immunology*. 1st ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2015.
36. <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/21784/ch04.html>.
37. Tsang JYS, Chai JG, Lechler R. Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2704–10.
38. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Aug;13(4):438–44.
39. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*. 2004 Oct 15;173(8):4828–37.
40. Transfer of tolerance to collagen type V suppresses T-helper-cell-17 lymphocyte-mediated acute lung transplant rejection - PubMed [Internet]. [cited 2023 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20029330/>
41. Csencsits KL, Bishop DK. Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: there's more to it than MHC restriction. *Am J Transplant*. 2003 Feb;3(2):107–15.
42. Lemaître PH, Vokaer B, Charbonnier LM, Iwakura Y, Field KA, Estenne M, et al. Cyclosporine A drives a Th17- and Th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(3):611–20.
43. Bharat A, Fields RC, Steward N, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. CD4+25+ regulatory T cells limit Th1-autoimmunity by inducing IL-10 producing T cells following human lung transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Aug;6(8):1799–808.
44. Bharat A, Fields RC, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. Induction of IL-10 suppressors in lung transplant patients by CD4+25+ regulatory T cells through CTLA-4 signaling. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5631–8.

45. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL, et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest*. 2007 Nov;117(11):3498–506.
46. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2019;10:43.
47. Lobo LJ, Aris RM, Schmitz J, Neuringer IP. Donor-specific antibodies are associated with antibody-mediated rejection, acute cellular rejection, bronchiolitis obliterans syndrome, and cystic fibrosis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Jan;32(1):70–7.
48. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2532–41.
49. Safavi S, Robinson DR, Soresi S, Carby M, Smith JD. De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Dec;33(12):1273–81.
50. Zeevi A, Lunn J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Jan;32(1):98–105.
51. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J Immunol*. 1994 May 15;152(10):5135–41.
52. Baldwin WM, Kasper EK, Zachary AA, Wasowska BA, Rodriguez ER. Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):311–8.
53. Levine DJ, Glanville AR, Aboyou C, Belperio J, Benden C, Berry GJ, et al. Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Apr;35(4):397–406.
54. Cooper JD, Billingham M, Egan T, Hertz MI, Higenbottam T, Lynch J, 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*. 1993;12(5):713–6.
55. Verleden GM, Glanville AR, Lease ED, Fisher AJ, Calabrese F, Corris PA, 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*. 2019 May;38(5):493–503.
56. Verleden GM, Glanville AR, Lease ED, Fisher AJ, Calabrese F, Corris PA, 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*. 2019 May;38(5):493–503.
57. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant*. 2002 Mar;21(3):297–310.

58. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Jul;30(7):735–42.
59. Glanville AR, Verleden GM, Todd JL, Benden C, Calabrese F, Gottlieb J, et al. Chronic lung allograft dysfunction: Definition and update of restrictive allograft syndrome-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant*. 2019 May;38(5):483–92.
60. Glanville A. CLAD: does the Emperor have new clothes? - PubMed [Internet]. [cited 2023 Oct 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25394597/>
61. Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Feb;33(2):127–33.
62. Sato M. Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome after lung transplantation: why are there two distinct forms of chronic lung allograft dysfunction? *Ann Transl Med*. 2020 Mar;8(6):418.
63. Le Pavec J, Dorfmüller P, Perros F, Mercier O and Fadel E. Bronchiolite oblitérante post-transplantation pulmonaire. *La lettre du Pneumologie*, 2013, 16(3) : 86-92.
64. Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, et al. Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur Respir Rev*. 2014 Mar 1;23(131):118–30.
65. Martinu T, Howell DN, Davis RD, Steele MP, Palmer SM. Pathologic correlates of bronchiolitis obliterans syndrome in pulmonary retransplant recipients. *Chest*. 2006 Apr;129(4):1016–23.
66. Paraskeva M, McLean C, Ellis S, Bailey M, Williams T, Levvey B, et al. Acute fibrinoid organizing pneumonia after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jun 15;187(12):1360–8.
67. Verleden SE, Von Der Thüsen J, Van Herck A, Weynand B, Verbeken E, Verschakelen J, et al. Identification and characterization of chronic lung allograft dysfunction patients with mixed phenotype: A single-center study. *Clin Transplant*. 2020 Feb;34(2):e13781.
68. Byrne D, Nador RG, English JC, Yee J, Levy R, Bergeron C, et al. Chronic Lung Allograft Dysfunction: Review of CT and Pathologic Findings. *Radiol Cardiothorac Imaging*. 2021 Feb;3(1):e200314.
69. Towe C, Chester Ogborn A, Ferkol T, Sweet S, Huddleston C, White F, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome is not specific for bronchiolitis obliterans in pediatric lung transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Apr;34(4):516–21.
70. Vanstapel A, Verleden SE, Verbeken EK, Braubach P, Goos T, De Sadeleer L, et al. Beyond Bronchiolitis Obliterans: In-Depth Histopathologic Characterization of Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplantation. *J Clin Med*. 2021 Dec 25;11(1):111.
71. Martinu T, Oishi H, Juvet SC, Cypel M, Liu M, Berry GJ, et al. Spectrum of chronic lung allograft pathology in a mouse minor-mismatched orthotopic lung transplant model. *Am J Transplant*. 2019 Jan;19(1):247–58.
72. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P, Wilson KC, et al. An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J*. 2014 Dec;44(6):1479–503.

73. Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Van Raemdonck DE, et al. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *Eur Respir J*. 2011 Jan;37(1):164–72.
74. Gerhardt SG, McDyer JF, Girgis RE, Conte JV, Yang SC, Orens JB. Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jul 1;168(1):121–5.
75. Verleden GM, Dupont LJ. Azithromycin therapy for patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1465–7.
76. Stripp BR, Reynolds SD. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Apr 15;5(3):328–33.
77. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jan;42(1):1–4.
78. Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *Eur Respir J*. 1994 Sep;7(9):1690–706.
79. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:172–90.
80. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Sep 15;5(7):772–7.
81. Kelly FL, Kennedy VE, Jain R, Sindhwani NS, Finlen Copeland CA, Snyder LD, et al. Epithelial clara cell injury occurs in bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am J Transplant*. 2012 Nov;12(11):3076–84.
82. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, Johnson GE, Gorowiec MR, Ward C, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax*. 2009 Sep;64(9):770–7.
83. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *Chest*. 2016 Jul;150(1):219–25.
84. Weigt SS, DerHovanessian A, Wallace WD, Lynch JP, Belperio JA. Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013 Jun;34(3):336–51.
85. Ward C, Forrest IA, Murphy DM, Johnson GE, Robertson H, Cawston TE, et al. Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax*. 2005 Oct;60(10):865–71.
86. Kelly FL, Kennedy VE, Jain R, Sindhwani NS, Finlen Copeland CA, Snyder LD, et al. Epithelial clara cell injury occurs in bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am J Transplant*. 2012 Nov;12(11):3076–84.
87. Levy L, Moshkelgosha S, Huszti E, Hunter S, Renaud-Picard B, Berra G, et al. Pulmonary epithelial markers in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2023 Aug;42(8):1152–60.

88. Beers MF, Morrisey EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2065–73.
89. Zhang SB, Sun X, Wu Q, Wu JP, Chen HY. Impaired Capacity of Fibroblasts to Support Airway Epithelial Progenitors in Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Sep 5;129(17):2040–4.
90. Banerjee B, Ling KM, Sutanto EN, Musk M, Yerkovich ST, Hopkins PMA, et al. The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Oct;30(10):1175–85.
91. Jaramillo A, Smith CR, Maruyama T, Zhang L, Patterson GA, Mohanakumar T. Anti-HLA class I antibody binding to airway epithelial cells induces production of fibrogenic growth factors and apoptotic cell death: a possible mechanism for bronchiolitis obliterans syndrome. *Hum Immunol*. 2003 May;64(5):521–9.
92. Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC, Lynch JP. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 Jan 15;6(1):108–21.
93. Brown MS, Muller KE, Pattabiraman DR. Quantifying the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) from Bench to Bedside. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 23;14(5):1138.
94. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res*. 2011 Aug;9(8):997–1007.
95. Markiewicz A, Topa J, Nagel A, Skokowski J, Seroczynska B, Stokowy T, et al. Spectrum of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Circulating Tumour Cells from Early Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 9;11(1):59.
96. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1776–84.
97. Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs*. 2005;179(1–2):11–23.
98. Fintha A, Gasparics Á, Rosivall L, Sebe A. Therapeutic Targeting of Fibrotic Epithelial-Mesenchymal Transition-An Outstanding Challenge. *Front Pharmacol*. 2019;10:388.
99. Huang RYJ, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2012 Oct 1;125(Pt 19):4417–22.
100. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178–96.
101. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2016 Sep;365(3):495–506.
102. Sivanantham A, Pattarayan D, Rajasekar N, Kannan A, Loganathan L, Bethunaickan R, et al. Tannic acid prevents macrophage-induced pro-fibrotic response in lung epithelial cells via suppressing TLR4-mediated macrophage polarization. *Inflamm Res*. 2019 Dec;68(12):1011–24.
103. Alfano D, Franco P, Stoppelli MP. Modulation of Cellular Function by the Urokinase Receptor Signalling: A Mechanistic View. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:818616.



104. Zhang LC, Shao Y, Gao LH, Liu J, Xi YY, Xu Y, et al. TEM8 functions as a receptor for uPA and mediates uPA-stimulated EGFR phosphorylation. *Cell Commun Signal*. 2018 Sep 21;16(1):62.
105. Gyetko MR, Sud S, Sonstein J, Polak T, Sud A, Curtis JL. Antigen-driven lymphocyte recruitment to the lung is diminished in the absence of urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor, but is independent of uPA. *J Immunol*. 2001 Nov 15;167(10):5539–42.
106. Rijneveld AW, Levi M, Florquin S, Speelman P, Carmeliet P, van Der Poll T. Urokinase receptor is necessary for adequate host defense against pneumococcal pneumonia. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3507–11.
107. Tucker TA, Dean C, Komissarov AA, Koenig K, Mazar AP, Pendurthi U, et al. The urokinase receptor supports tumorigenesis of human malignant pleural mesothelioma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jun;42(6):685–96.
108. Montuori N, Ragno P. Multiple activities of a multifaceted receptor: roles of cleaved and soluble uPAR. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14(7):2494–503.
109. Magnussen SN, Hadler-Olsen E, Costea DE, Berg E, Jacobsen CC, Mortensen B, et al. Cleavage of the urokinase receptor (uPAR) on oral cancer cells: regulation by transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and potential effects on migration and invasion. *BMC Cancer*. 2017 May 19;17(1):350.
110. Nagel H, Hemmerlein B, Ruschenburg I, Hüppe K, Droese M. The value of anti-calretinin antibody in the differential diagnosis of normal and reactive mesothelia versus metastatic tumors in effusion cytology. *Pathol Res Pract*. 1998;194(11):759–64.
111. Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell*. 2003 Jul;4(1):67–79.
112. Margheri F, Papucci L, Schiavone N, D'Agostino R, Trigari S, Serrati S, et al. Differential uPAR recruitment in caveolar-lipid rafts by GM1 and GM3 gangliosides regulates endothelial progenitor cells angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2015 Jan;19(1):113–23.
113. Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol*. 2007 Jul 30;178(3):425–36.
114. Wang TY, Lo YL, Lee KY, Liu WT, Lin SM, Lin TY, et al. Nocturnal CPAP improves walking capacity in COPD patients with obstructive sleep apnoea. *Respir Res*. 2013 Jun 19;14(1):66.
115. Shmakova AA, Popov VS, Romanov IP, Khabibullin NR, Sabitova NR, Karpukhina AA, et al. Urokinase System in Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis: A Hidden Threat of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 10;24(2):1382.
116. Logan R, Jeffers A, Qin W, Owens S, Chauhan P, Komatsu S, et al. TGF- $\beta$  regulation of the uPA/uPAR axis modulates mesothelial-mesenchymal transition (MesoMT). *Sci Rep*. 2021 Oct 27;11(1):21210.
117. Hodge S, Holmes M, Banerjee B, Musk M, Kicic A, Waterer G, et al. Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. *Am J Transplant*. 2009 Apr;9(4):727–33.
118. Magnan A, Mege JL, Escallier JC, Brisse J, Capo C, Reynaud M, et al. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. Marseille and Montréal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Apr;153(4 Pt 1):1431–6.

119. Borthwick LA, Sunny SS, Oliphant V, Perry J, Brodli M, Johnson GE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* accentuates epithelial-to-mesenchymal transition in the airway. *Eur Respir J*. 2011 May;37(5):1237–47.
120. Borthwick LA, Corris PA, Mahida R, Walker A, Gardner A, Suwara M, et al. TNF $\alpha$  from classically activated macrophages accentuates epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(3):621–33.
121. Zhou JX, Fan LX, Li X, Calvet JP, Li X. TNF $\alpha$  signaling regulates cystic epithelial cell proliferation through Akt/mTOR and ERK/MAPK/Cdk2 mediated Id2 signaling. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131043.
122. Renaud-Picard B, Vallière K, Toussaint J, Kreutter G, El-Habhab A, Kassem M, et al. Epithelial-mesenchymal transition and membrane microparticles: Potential implications for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transpl Immunol*. 2020 Apr;59:101273.
123. Plantureux L, Lacroix R, Dignat-George F. Microvésicules : biomarqueurs non invasifs de l'endothélium. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2020 Jun 1;2020(523):61–76.
124. Plawinski L, Cras A, Hernández Lopez JR, de la Peña A, Van der Heyden A, Belle C, et al. Distinguishing Plasmin-Generating Microvesicles: Tiny Messengers Involved in Fibrinolysis and Proteolysis. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 13;24(2):1571.
125. Ståhl AL, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*. 2019 Jan;34(1):11–30.
126. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol*. 2011 Sep;33(5):469–86.
127. Campbell LE, Nelson J, Gibbons E, Judd AM, Bell JD. Membrane properties involved in calcium-stimulated microparticle release from the plasma membranes of S49 lymphoma cells. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:537192.
128. Cordazzo C, Petrini S, Neri T, Lombardi S, Carmazzi Y, Pedrinelli R, et al. Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Inflamm Res*. 2014 Jul;63(7):539–47.
129. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1546–54.
130. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002 May;30(5):450–9.
131. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM, Zobairi F, Leray I, Gottenberg JE, et al. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R40.
132. Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn WK, et al. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):320-330.e2.

133. Huang M, Hu YY, Dong XQ. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surg Neurol.* 2009 Nov;72(5):481–9; discussion 489.
134. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, et al. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2008 Jan;27(1):38–45.
135. Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Richard MJ, Greget M, et al. Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc.* 2011 Nov;43(9):3241–5.
136. Moreau F, Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Chastre M, et al. Rescue of a pancreatic islet graft after steroid therapy. *Transplantation.* 2012 Feb 15;93(3):e10-11.
137. Dalli J, Jones CP, Cavalcanti DM, Farsky SH, Perretti M, Rankin SM. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J.* 2012 Jan;26(1):387–96.
138. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul;25(7):1512–8.
139. Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosin M, Yala E, Zobairi F, Leclercq A, et al. Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014 Mar;13(2):219–26.
140. Gleizes C, Constantinescu A, Abbas M, Bouhadja H, Zobairi F, Kessler L, et al. Liraglutide protects Rin-m5f  $\beta$  cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction. *Transpl Int.* 2014 Jul;27(7):733–40.
141. Renaud-Picard B, Toussaint J, Leclercq A, Reeb J, Kessler L, Toti F, et al. [Membranous microparticles and respiratory disease]. *Rev Mal Respir.* 2017 Dec;34(10):1058–71.
142. Garcia Rodriguez P, Eikenboom HCJ, Tesselaar MET, Huisman MV, Nijkeuter M, Osanto S, et al. Plasma levels of microparticle-associated tissue factor activity in patients with clinically suspected pulmonary embolism. *Thromb Res.* 2010 Oct;126(4):345–9.
143. Liu H, Ding L, Zhang Y, Ni S. Circulating endothelial microparticles involved in lung function decline in a rat exposed in cigarette smoke maybe from apoptotic pulmonary capillary endothelial cells. *J Thorac Dis.* 2014 Jun;6(6):649–55.
144. Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014;9:303–14.
145. Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, Hoffman EA, Vogel-Claussen J, Hueper K, et al. Endothelial microparticles in mild chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jul 1;188(1):60–8.
146. Bastarache JA, Fremont RD, Kropski JA, Bossert FR, Ware LB. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Dec;297(6):L1035-1041.

147. Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, et al. Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Feb;31(2):173–9.
148. Tantawy AAG, Adly AAM, Ismail EAR, Habeeb NM, Farouk A. Circulating platelet and erythrocyte microparticles in young children and adolescents with sickle cell disease: Relation to cardiovascular complications. *Platelets*. 2013;24(8):605–14.
149. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Mar 1;177(5):536–43.
150. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jun 1;177(11):1268–75.
151. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, Kohler M. Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2009 Mar;33(3):574–80.
152. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, et al. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):974–83.
153. Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, et al. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2011 May;37(5):1293–5.
154. Tseng CC, Wang CC, Chang HC, Tsai TH, Chang LT, Huang KT, et al. Levels of circulating microparticles in lung cancer patients and possible prognostic value. *Dis Markers*. 2013;35(5):301–10.
155. Taraboletti G, D’Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*. 2002 Feb;160(2):673–80.
156. Tesselaar MET, Romijn FPHTM, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007 Mar;5(3):520–7.
157. van Doormaal F, Kleinjan A, Berckmans RJ, Mackman N, Manly D, Kamphuisen PW, et al. Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An exploratory prospective study. *Thromb Haemost*. 2012 Jul;108(1):160–5.
158. Porro C, Lepore S, Trotta T, Castellani S, Ratclif L, Battaglino A, et al. Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients. *Respir Res*. 2010 Jul 9;11(1):94.
159. Porro C, Di Gioia S, Trotta T, Lepore S, Panaro MA, Battaglino A, et al. Pro-inflammatory effect of cystic fibrosis sputum microparticles in the murine lung. *J Cyst Fibros*. 2013 Dec;12(6):721–8.
160. Eltom S, Dale N, Raemdonck KRG, Stevenson CS, Snelgrove RJ, Sacitharan PK, et al. Respiratory infections cause the release of extracellular vesicles: implications in exacerbation of asthma/COPD. *PLoS One*. 2014;9(6):e101087.

161. Duarte D, Taveira-Gomes T, Sokhatska O, Palmares C, Costa R, Negrão R, et al. Increased circulating platelet microparticles as a potential biomarker in asthma. *Allergy*. 2013 Aug;68(8):1073–5.
162. Novelli F, Neri T, Tavanti L, Armani C, Noce C, Falaschi F, et al. Procoagulant, tissue factor-bearing microparticles in bronchoalveolar lavage of interstitial lung disease patients: an observational study. *PLoS One*. 2014;9(4):e95013.
163. Scotton CJ, Krupiczkoj MA, Königshoff M, Mercer PF, Lee YCG, Kaminski N, et al. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2550–63.
164. Greening DW, Gopal SK, Mathias RA, Liu L, Sheng J, Zhu HJ, et al. Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr;40:60–71.
165. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1975–80.
166. Fogli S, Stefanelli F, Neri T, Bardelli C, Amoruso A, Brunelleschi S, et al. Montelukast prevents microparticle-induced inflammatory and functional alterations in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res*. 2013 Oct;76:149–56.
167. Olland A, Reeb J, Leclercq A, Renaud-Picard B, Falcoz PE, Kessler R, et al. Microparticles: A new insight into lung primary graft dysfunction? *Hum Immunol*. 2016 Nov;77(11):1101–7.
168. Doerner AM, Zuraw BL. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res*. 2009 Oct 27;10(1):100.
169. Levy L, Tigert A, Huszti E, Saito T, Mitsakakis N, Moshkelgosha S, et al. Epithelial cell death markers in bronchoalveolar lavage correlate with chronic lung allograft dysfunction subtypes and survival in lung transplant recipients—a single-center retrospective cohort study. *Transpl Int*. 2019 Sep;32(9):965–73.
170. Levy L, Huszti E, Tikkanen J, Ghany R, Klement W, Ahmed M, et al. The impact of first untreated subclinical minimal acute rejection on risk for chronic lung allograft dysfunction or death after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2020 Jan;20(1):241–9.
171. Berra G, Farkona S, Mohammed-Ali Z, Kotlyar M, Levy L, Clotet-Freixas S, et al. Association between the renin-angiotensin system and chronic lung allograft dysfunction. *Eur Respir J*. 2021 Oct;58(4):2002975.
172. Bartis D, Mise N, Mahida RY, Eickelberg O, Thickett DR. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*. 2014 Aug;69(8):760–5.
173. Davis AS, Richter A, Becker S, Moyer JE, Sandouk A, Skinner J, et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2014 Jun;62(6):405–23.
174. Chang Q, Ornatsky O, Hedley D. Staining of Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues with Metal-Labeled Antibodies for Imaging Mass Cytometry Analysis. *Curr Protoc Cytom*. 2017 Oct 2;82:12.47.1-12.47.8.

175. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Straus R, Baranov VI, Hedley DW. Biodistribution of cisplatin revealed by imaging mass cytometry identifies extensive collagen binding in tumor and normal tissues. *Sci Rep.* 2016 Nov 4;6:36641.
176. Cao Y, Chang Q, Zhang W, Ornatsky O, Hedley D, Chen EX. Skin platinum deposition in colorectal cancer patients following oxaliplatin-based therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019 Dec;84(6):1195–200.
177. Muranushi H, Shindo T, Chen-Yoshikawa TF, Yoshizawa A, Thi Ngo H, Gochi F, et al. Dual inhibition of the MEK/ERK and PI3K/AKT pathways prevents pulmonary GVHD suppressing perivenulitis and bronchiolitis. *Blood Adv.* 2023 Jan 10;7(1):106–21.
178. Ung N, Goldbeck C, Man C, Hoefflich J, Sun R, Barbetta A, et al. Adaptation of Imaging Mass Cytometry to Explore the Single Cell Alloimmune Landscape of Liver Transplant Rejection. *Front Immunol.* 2022;13:831103.
179. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, Zivanovic N, Jacobs A, Hattendorf B, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods.* 2014 Apr;11(4):417–22.
180. Koenig A, Thauinat O. Lymphoid Neogenesis and Tertiary Lymphoid Organs in Transplanted Organs. *Front Immunol.* 2016;7:646.
181. Vandermeulen E, Lammertyn E, Verleden SE, Ruttens D, Bellon H, Ricciardi M, et al. Immunological diversity in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction: a comprehensive immunohistochemical analysis. *Transpl Int.* 2017 Feb;30(2):134–43.
182. Hsiao HM, Li W, Gelman AE, Krupnick AS, Kreisel D. The Role of Lymphoid Neogenesis in Allografts. *Am J Transplant.* 2016 Apr;16(4):1079–85.
183. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol.* 2011 Jan;41(1):89–96.
184. Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant.* 2011 Mar;11(3):429–38.
185. Sato M, Hirayama S, Hwang DM, Lara-Guerra H, Wagnetz D, Waddell TK, et al. The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol.* 2009 Jun 1;182(11):7307–16.
186. Thauinat O, Graff-Dubois S, Fabien N, Duthey A, Attuil-Audenis V, Nicoletti A, et al. A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int.* 2012 Jan;81(2):207–19.
187. Todd JL, Weber JM, Kelly FL, Neely ML, Nagler A, Carmack D, et al. Early posttransplant reductions in club cell secretory protein associate with future risk for chronic allograft dysfunction in lung recipients: results from a multicenter study. *J Heart Lung Transplant.* 2023 Jun;42(6):741–9.
188. Liu Z, Liao F, Scozzi D, Furuya Y, Pugh KN, Hachem R, et al. An obligatory role for club cells in preventing obliterative bronchiolitis in lung transplants. *JCI Insight.* 2019 Apr 16;5(9):e124732, 124732.

189. Greenland JR, Wang P, Brotman JJ, Ahuja R, Chong TA, Kleinhenz ME, et al. Gene signatures common to allograft rejection are associated with lymphocytic bronchitis. *Clin Transplant*. 2019 May;33(5):e13515.
190. Naikawadi RP, Green G, Jones KD, Achar-Zadeh N, Mielezko JE, Arnould I, et al. Airway Epithelial Telomere Dysfunction Drives Remodeling Similar to Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020 Oct;63(4):490–501.
191. Alder JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tuder RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 21;112(16):5099–104.
192. Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, La JL, et al. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight*. 2016 Sep 8;1(14):e86704.
193. Khatri A, Todd JL, Kelly FL, Nagler A, Ji Z, Jain V, et al. JAK-STAT activation contributes to cytotoxic T cell-mediated basal cell death in human chronic lung allograft dysfunction. *JCI Insight*. 2023 Mar 22;8(6):e167082.
194. Pain M, Royer PJ, Loy J, Girardeau A, Tissot A, Lacoste P, 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*. 2017 Jun;17(6):1502–14.
195. Gopal SK, Greening DW, Rai A, Chen M, Xu R, Shafiq A, et al. Extracellular vesicles: their role in cancer biology and epithelial-mesenchymal transition. *Biochem J*. 2017 Jan 1;474(1):21–45.
196. Jia L, Fan J, Cui W, Liu S, Li N, Lau WB, et al. Endothelial Cell-Derived Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea Hypoxia Syndrome and Coronary Artery Disease Increase Aortic Endothelial Cell Dysfunction. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(6):2562–70.
197. Morgul MH, Splith K, Leonhardt C, Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, et al. The value of microparticles in detecting acute rejection episodes after liver transplantation. *Biomarkers*. 2018 Feb;23(1):25–32.
198. Dong M, Wang X, Li T, Jing Y, Liu Y, Zhao H. miR-27a-3p alleviates lung transplantation-induced bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) via suppressing Smad-mediated myofibroblast differentiation and TLR4-induced dendritic cells maturation. *Transpl Immunol*. 2023 Jun;78:101806.
199. Keller M, Sun J, Mutebi C, Shah P, Levine D, Aryal S, et al. Donor-derived cell-free DNA as a composite marker of acute lung allograft dysfunction in clinical care. *J Heart Lung Transplant*. 2022 Apr;41(4):458–66.
200. Napolitano F, Di Spigna G, Vargas M, Iacovazzo C, Pinchera B, Spalletti Cernia D, et al. Soluble Urokinase Receptor as a Promising Marker for Early Prediction of Outcome in COVID-19 Hospitalized Patients. *J Clin Med*. 2021 Oct 24;10(21):4914.
201. Nekrasova LA, Shmakova AA, Samokhodskaya LM, Kirillova KI, Stoyanova SS, Mershina EA, et al. The Association of PLAUR Genotype and Soluble suPAR Serum Level with COVID-19-Related Lung Damage Severity. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 19;23(24):16210.

202. Bellamri N, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Wollin L, Jouneau S, et al. Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. *Int Immunopharmacol.* 2019 Jul;72:112–23.
203. Benden C, Houghton M, Leonard S, Huber LC. Therapy options for chronic lung allograft dysfunction-bronchiolitis obliterans syndrome following first-line immunosuppressive strategies: A systematic review. *J Heart Lung Transplant.* 2017 Sep;36(9):921–33.
204. von Suesskind-Schwendi M, Boxhammer E, Hirt SW, Schreml S, Schmid C, Wollin L, et al. The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. *Exp Lung Res.* 2017;43(6–7):259–70.
205. Mauer J, Kuckhahn A, Ramsperger-Gleixner M, Ensminger SM, Distler JHW, Weyand M, et al. Nintedanib reduces alloimmune-induced chronic airway changes in murine tracheal allografts. *Transpl Immunol.* 2022 Aug;73:101608.
206. Neurohr C, Kneidinger N, Ghiani A, Monforte V, Knoop C, Jaksch P, 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.* 2022 Jan;22(1):222–9.



# Modifications de l'épithélium bronchique survenant au cours de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et rôle des microparticules leucocytaires

## Résumé

La dysfonction chronique du greffon pulmonaire (CLAD) est la principale complication limitant la survie à long-terme après une transplantation pulmonaire, avec plusieurs phénotypes décrits. La répétition des agressions inflammatoires contre l'épithélium bronchique contribue à son développement.

Au cours de ce travail, nous avons détaillé les différences et similitudes histologiques entre les différents phénotypes de CLAD, à l'aide d'un score semi-quantitatif. Nous avons également montré que la technique d'Imaging mass cytometry, spectrométrie de masse utilisant un marquage avec anticorps conjugués aux métaux lourds, permettait l'identification précise de sous-populations cellulaires dans le tissu du greffon pulmonaire. Enfin, après avoir confirmé la présence d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les bronchioles de poumons explantés avec CLAD, nous avons montré que les microparticules membranaires pourraient avoir un rôle comme biomarqueur diagnostique du CLAD et comme bioeffecteur en contribuant à la survenue de la TEM dans des cellules BEAS-2B.

**Mots clés :** transplantation pulmonaire, dysfonction chronique du greffon pulmonaire, microparticules, Imaging mass cytometry, transition épithélio-mésenchymateuse

## Abstract

Chronic lung graft dysfunction (CLAD) is the main complication limiting long-term survival after lung transplantation, with several phenotypes described. Repeated inflammatory injuries to the bronchial epithelium participate to its development.

In this work, we detailed the histological differences and similarities between the different CLAD phenotypes, using a semi-quantitative grading score. We also demonstrated that Imaging mass cytometry, a mass spectrometry technique using a heavy metal-tagged antibodies, enabled a precise identification of cellular subpopulations within the lung allograft tissue. Finally, after confirming the presence of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in bronchioles from explanted lungs with CLAD, we showed that membrane microparticles could have a role as a diagnostic biomarker of CLAD and as a bioeffector by contributing to the occurrence of EMT in BEAS-2B cells.

**Keywords:** lung transplantation, chronic lung allograft dysfunction, microparticles, Imaging mass cytometry, epithelial-mesenchymal transition