

Université de Montréal

Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la dysfonction primaire du greffon suite
à une transplantation pulmonaire

Par

Caroline Landry

Faculté de médecine, Programme Sciences biomédicales

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

31 août 2020

© Landry Caroline, 2020

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la dysfonction primaire du greffon suite
à une transplantation pulmonaire

Présenté par
Caroline Landry

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mélanie Dieudé
Président-rapporteur

Emmanuelle Brochiero
Directeur de recherche

Pasquale Ferraro
Codirecteur

Guillaume Emeriaud
Membre du jury

Résumé

Introduction : La dysfonction primaire du greffon (DPG) post-transplantation pulmonaire est la principale cause de décès en phase péri-opératoire. Sa physiopathologie n'est pas encore totalement élucidée mais les lésions d'Ischémie/Reperfusion (I/R) pourraient constituer un facteur important de son développement. L'I/R et la DPG sont caractérisées par des dommages de l'endothélium vasculaire et de l'épithélium alvéolaire, un œdème pulmonaire et une réaction inflammatoire exacerbée. La résorption de l'œdème dépend du rétablissement de l'intégrité fonctionnelle alvéolaire, dont la capacité à réabsorber les ions Na^+ (via les canaux ENaC), et secondairement le liquide par les cellules alvéolaires. Nous avons émis l'hypothèse que la dysfonction épithéliale alvéolaire, causée par l'I/R, présente dans les greffons donneurs (GD), jouerait un rôle clef dans le développement de la DPG chez les receveurs. Notre but était d'identifier de biomarqueurs, associés à la dysfonction épithéliale des GD et au développement de DPG chez les receveurs.

Méthodes : L'impact d'un protocole mimant une I/R a d'abord été évalué sur des cultures primaires de cellules alvéolaires de rats. Puis, nous avons étudié l'impact de l'I/R *in vivo* grâce à des modèles de stress inflammatoire par infusion de LPS ou transplantation unilatérale chez le porc. Finalement, des biopsies de tissus de GD ont été recueillies durant les transplantations pulmonaires. Après détermination du grade de DPG chez les receveurs, nous avons étudié les facteurs et les altérations alvéolaires associés.

Résultats : Une baisse d'expression des protéines de jonctions serrées (ZO-1), des canaux ioniques ENaC et CFTR ainsi qu'une réduction de la résistance transépithéliale et de la capacité de réparation suite aux lésions ont été observées suite au protocole mimant l'I/R dans le modèle de cultures primaires de cellules alvéolaires. Un traitement avec un activateur du canal K^+ KvLQT1 (R-L3) a permis d'améliorer la vitesse de réparation, l'intégrité de la barrière épithéliale et l'expression d'ENaC et CFTR. Dans nos modèles animaux, nous avons observé une réponse pro-inflammatoire et une altération des protéines ZO-1, ENaC et CFTR. Nos données préliminaires indiquent aussi une infiltration inflammatoire et une baisse d'ENaC, CFTR et ZO-1, déjà présentes dans les GD ayant subits une I prolongée, chez les receveurs ayant ensuite développés une DPG.

Conclusion : Nos résultats soutiennent notre hypothèse du développement d'une dysfonction épithéliale alvéolaire, caractérisée par une altération de biomarqueurs de fonctionnalité et d'intégrité (ENaC, CFTR et ZO-1), en lien avec l'I/R et la DPG.

Mots clefs : Transplantation pulmonaire – Dysfonction Primaire du Greffon - Ischémie/Reperfusion - Épithélium alvéolaire –Dommages –Intégrité – Canaux ioniques – Inflammation –Modèles cellulaires et animaux –Recherche translationnelle

Abstract

Background: Primary graft dysfunction (PGD) after lung transplantation is the first cause of death in the perioperative phase. The PGD pathophysiology is not fully elucidated, but Ischemia/Reperfusion (I/R) injury might be an important factor. I/R and PGD both feature endothelial/ epithelial damage, lung edema and inflammation. Edema resorption then depends on the restoration of the alveolar functional integrity, especially the ability of alveolar epithelial cells to reabsorb Na^+ (through ENaC channels) and fluid. We hypothesized that alveolar epithelial dysfunction (related to I/R), observed within donor grafts, then plays a key role in the development of PGD in lung recipients. Our goal was to identify novel biomarkers, associated with epithelial dysfunction within donor's grafts, and then PGD development in recipients.

Methods: The impact of a protocol mimicking hypothermic ischemia and reperfusion was first tested on primary rat alveolar epithelial cell cultures. Then, the impact of I/R was studied *in vivo* using models of inflammatory stress induced by LPS infusion or after unilateral transplantation in pigs. Finally, lung biopsies from donor grafts were collected during lung transplantations. After defining PGD scores within the recipients, associated factors and alveolar alterations were finally analyzed.

Results: In primary cell cultures, the protocol mimicking hypothermic I/R induced a decrease in tight junction proteins (ZO-1), transepithelial resistance, wound repair capacity as well as ENaC and CFTR channel expression. Treatment with a KvLQT1 K^+ channel activator (R-L3) accelerated the repair rates and enhanced barrier integrity (ZO-1 staining) as well as ENaC and CFTR protein expressions. In the porcine models, an exacerbated inflammatory response was observed along with alveolar damage, lung edema and decreased ZO-1, ENaC and CFTR expressions. Our preliminary data using human samples collected during lung transplantations also indicate an inflammatory response and reduced ENaC, CFTR and ZO-1 expressions, already observed within lung grafts, submitted to longer cold ischemia duration, among lung recipients then developing a PGD.

Conclusion: Altogether these data support our hypothesis of an alveolar epithelial dysfunction, featuring an alteration of functionality and barrier integrity biomarkers (ENaC, CFTR and ZO-1), associated with I/R and DPG.

Keywords: Lung Transplantation – Primary Graft Dysfunction - Ischemia/Reperfusion – Alveolar epithelium –Injury –Integrity – Ionic channels – Inflammation –Cellular and animal models – Translational research

Citation

« A vaincre sans péril, on triomphe sans gloire ! »

Une citation du Cid de Corneille

Table des matières

Citation.....	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des sigles et abréviations	15
Remerciements	20
PREAMBULE	21
1. INTRODUCTION.....	22
1.1. L'appareil respiratoire	22
1.1.1. Anatomie de l'appareil respiratoire	22
1.1.2. Histologie de l'appareil respiratoire.....	24
1.1.2.1. L'épithélium des voies aériennes.....	24
1.1.2.1.1. Voies aériennes supérieures nasales-trachéales-bronchiques	24
1.1.2.1.2. Voies aériennes inférieures et bronchioles	25
1.1.2.2.1.1. Les cellules alvéolaires de type I (ATI).....	26
1.1.2.2.1.2. Les ATII.....	27
1.1.3. Les fonctions de l'épithélium alvéolaire.....	28
1.1.3.1. La fonction de respiration	28
1.1.3.2. La fonction de barrière.....	28
1.1.3.3. La fonction dans la clairance liquidienne et ionique	31
1.1.3.3.1. Epithelial sodium channel (ENaC)	31
1.1.3.3.1.1. Structure du canal ENaC.....	32
1.1.3.3.1.2. Fonction du canal ENaC au niveau alvéolaire.....	32
1.1.3.3.1.3. Régulation du canal ENaC.....	33

1.1.3.3.2. La pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	35
1.1.3.3.2.1. Structure de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	35
1.1.3.3.2.2. Fonction de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	36
1.1.3.3.2.3. Régulation de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	36
1.1.3.3.3. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).....	36
1.1.3.3.3.1. Structure du canal CFTR	36
1.1.3.3.3.2. Fonction du canal CFTR.....	37
1.1.3.3.3.3. Régulation du canal CFTR.....	37
1.1.3.3.4. Canaux K ⁺	38
1.1.3.3.4.1. Structure du canal KvLQT1	39
1.1.3.3.4.2. Fonction du canal KvLQT1	40
1.1.3.3.4.3. Régulation du canal KvLQT1	41
1.1.3.4. La fonction dans l'immunité.....	41
1.1.3.5. Les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire en condition physiologique et pathologique	42
1.2.1. Données épidémiologiques	44
1.2.2. Nécessité d'un donneur d'organe.....	46
1.2.2.1. Investigations pour l'éligibilité d'un donneur.....	46
1.2.2.2. Causes de décès.....	47
1.2.2.3. Types de dons	47
1.2.3. Appariement d'un patient receveur avec un donneur d'organe	48
1.2.4. Le déroulement de la transplantation pulmonaire.....	49
1.2.4.1. Le prélèvement.....	49
1.2.4.2. La conservation	50
1.2.4.3. La greffe pulmonaire.....	50

1.3.1 Définition de la dysfonction primaire du greffon	51
1.3.2. Détermination du grade de DPG.....	51
1.3.3 DPG et survie post-transplantation	52
1.3.4. Autres impacts de la DPG.....	52
1.3.5. Associations entre DPG et SDRA.....	53
1.4.1. Définitions de l'ischémie	54
1.4.2. Définition de la reperfusion	55
1.4.3. Mécanismes enclenchés par l'I/R	55
1.4.3.1. Le stress oxydatif et apoptose	55
1.4.3.2. Le défaut de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	57
1.4.3.3. La réponse immunitaire et inflammatoire exacerbée.....	57
1.4.3.4. L'hypoxie/anoxie	58
1.4.3.5. Dommages sur l'endothélium : la cessation du flot sanguin	58
1.4.3.6. Dommages sur l'épithélium alvéolaire	59
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	61
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	62
3.1. Approbation éthique et collecte des échantillons animaux	62
3.3.1. Modèle de transplantation pulmonaire unilatérale chez le porc	63
3.3.2. Modèle d'infection-inflammation, suivi de perfusion <i>ex-vivo</i> (EVLP), chez le porc	65
3.4.1. Approbation du Comité d'éthique de la recherche (CER) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)	66
3.4.2 Bases de données	66
3.4.2.1 Transplant 7	67
3.4.2.2 Oacis	68
3.4.3 Collecte d'échantillons humains lors des transplantations pulmonaires.....	68

3.5.1. Modèle <i>in vitro</i> mimant l'ischémie froide et la reperfusion (I/R) dans des cultures primaires de cellules alvéolaire de type II de rat	70
3.5.2. Mesure de réparation de plaies après lésions mécaniques	72
3.5.3. Mesure de la résistance électrique transépithéliale (RTE).....	72
4.2.1. Modèle de transplantation.....	88
4.2.2. Modèle d'inflammation induite par infusion de LPS chez le porc	92
4.3. Étude translationnelle chez l'humain de l'altération épithéliale alvéolaire dans les greffons et des facteurs reliés à la DPG suite à une transplantation pulmonaire	100
4.3.1. Analyses de facteurs phénotypiques des receveurs et donneurs et des interventions sur le greffon pouvant affecter le développement d'une DPG	103
4.3.2 Évaluation de l'altération épithéliale alvéolaire des GD en lien avec la DPG	108
4.3.3 Interrelations entre le temps d'ischémie froide du greffon donneur, les marqueurs de fonctionnalité et le développement de la DPG	111
5.6.1. Facteurs phénotypiques et procédures réalisées chez le receveur	128
5.6.2 Facteurs phénotypiques du donneur et procédures sur le greffon.....	129
5.6.3 Relations entre nos biomarqueurs dans les GD, l'I/R et la DPG	130
6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau des transplantations au Canada (excluant le Québec) illustrant le nombre de transplantations de lobes pulmonaires chez un donneur vivant, de poumons uni ou bilatérales ainsi que de transplantations cœur-poumons, effectuées au Canada (excluant le Québec), de 2006 à 2015.	45
Tableau II : Tableau illustrant les différentes pathologies associées à des transplantations pulmonaires uni- et bi-latérales dans 260 centres de greffes de janvier 1995 à juin 2018.....	46
Tableau III: Tableau explicatif de la détermination du grade de DPG suite à une transplantation pulmonaire.....	51
Tableau IV: Tableau illustrant les différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie froide/hypoxie et la reperfusion en transplantation pulmonaire.....	55
Tableau V : Tableau illustrant les différents paramètres étudiés (données démographiques et cliniques) dans notre cohorte de patients donneurs/receveurs et la gestion des greffons donneur en relation avec l'absence (DPG-) ou la présence (DPG+) du développement d'une DPG suite à une transplantation pulmonaire.....	113

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'appareil respiratoire humain.....	22
Figure 2: Anatomie et structure histologique des voies aériennes et respiratoires.	23
Figure 3: Épithélium de la zone de conduction.....	24
Figure 4: Structure d'une alvéole dans des conditions saines.	26
Figure 5: Structure des complexes jonctionnels intercellulaires retrouvés au niveau des cellules épithéliales alvéolaires.	29
Figure 6: Régulation des échanges intercellulaires via les jonctions communicantes.....	30
Figure 7: Transports ioniques et liquidiens au niveau des cellules épithéliales de l'épithélium alvéolaire.....	32
Figure 8: Représentations schématiques de la structure du canal sodique ENaC.	33
Figure 9: Régulation de l'activité des canaux ioniques ENaC au niveau de l'épithélium alvéolaire.....	34
Figure 10 : Représentations schématiques de la structure de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase..	35
Figure 11: Représentation schématique de la structure du canal CFTR fermé et ouvert.	38
Figure 12: Arbre phylogénique des canaux K ⁺ de l'épithélium respiratoire.	39
Figure 13: Représentation schématique de la structure du canal KvLQT1.	39
Figure 14: Schématisation des processus de réparation alvéolaire et rôle des canaux K ⁺ .	41
Figure 15: Différentes étapes de la réparation de l'épithélium alvéolaire.	44
Figure 16: Graphique représentant le nombre de transplantations pulmonaires chez l'adulte effectuées par année, de 1988 à 2017.	45
Figure 17: Courbe de survie des receveurs greffés pulmonaires au CHUM au cours de la période 1997 à 2011.	52
Figure 18: Structure d'une alvéole saine et en condition pathologique retrouvée lors d'une DPG.	53
Figure 19: Formation d'espèces oxygénées réactives au cours de l'ischémie-reperfusion pulmonaire.	56
Figure 20: Design expérimental du modèle animal <i>in vivo</i>	64
Figure 21: Schématisation du design expérimental et de la collecte des données et échantillons dans le volet de recherche translationnelle chez l'humain.	67

Figure 22: Design expérimental pour analyses qualitatives d'expression de protéines d'intégrité et de fonctionnalité des ATII à partir d'échantillons de parenchymes de greffons pulmonaires et l'élaboration d'une échelle de score d'expression de ces protéines.	69
Figure 23: Design expérimental du modèle cellulaire <i>in vitro</i>.	71
Figure 24: Mesure des résistances électriques transépithéliales des cultures ATII de rat ayant subi ou non le protocole mimant une I/R.	80
Figure 25: Expression de la protéine d'intégrité ZO-1 en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.	82
Figure 26: Mesure de la vitesse de réparation de plaies après lésions mécaniques sur des cultures de cellules ATII de rats suite au protocole mimant l'I/R.	83
Figure 27: Expression des canaux sodique ENaC en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules d'ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.	85
Figure 28: Expression des canaux chlorures CFTR en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules d'ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.	86
Figure 29: Expression des canaux potassiques KvLQT1 en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules d'ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.	87
Figure 30: Impact de l'I/R sur l'épithélium alvéolaire dans un modèle animal de transplantation pulmonaire.	89
Figure 31: Impact de l'I/R sur l'expression des canaux ioniques de l'épithélium alvéolaire dans un modèle animal de transplantation pulmonaire.	90
Figure 32: Impact de l'ischémie froide sur l'épithélium alvéolaire, dans un modèle d'infection/inflammation <i>in vivo</i> chez le porc.	93
Figure 33: Effet du LPS sur le degré d'expression des canaux ioniques ENaC, CFTR et KvLQT1 de l'épithélium alvéolaire du groupe LPS en comparaison au groupe CTRL. ..	95
Figure 34: Impact de la technologie de perfusion ex-vivo du poumon (EVLP) sur l'épithélium alvéolaire dans un modèle d'infection/inflammation <i>in vivo</i> chez le porc.	97
Figure 35: Impact de la technologie de perfusion ex-vivo du poumon (EVLP) sur l'expression des canaux ioniques de l'épithélium alvéolaire dans un modèle d'infection/inflammation <i>in vivo</i> chez le porc.	98

Figure 36: Présentation de la cohorte des patients receveurs en transplantation pulmonaire.	102
Figure 37 : Incidence de développement de la DPG en fonction de l'utilisation ou non d'un appareil de support cardiopulmonaire (SCP) durant les transplantations pulmonaires.....	104
Figure 38: Présentation de la cohorte de donneurs en transplantation pulmonaire.....	105
Figure 39: L'influence du type de dons et du temps d'ischémie froide sur le développement de la DPG.....	107
Figure 40: Relation entre la pneumoréduction et le développement de la DPG.....	108
Figure 41: Intégrité de l'épithélium alvéolaire des greffons donneur (GD) et niveaux de cytokines dans les lavages bronchoalvéolaires (BAL), effectués durant les transplantations pulmonaires.....	110
Figure 42: Impact de l'ischémie froide sur le développement de la DPG dans la cohorte des GD avec pneumoréduction.....	111
Figure 43: L'expression des canaux ENaC dans les biopsies de parenchymes de GD et les cellules alvéolaires isolées de ces biopsies parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.....	Erreur! Signet non défini.
Figure 44: L'expression des canaux CFTR dans les biopsies de parenchymes de GD et les cellules alvéolaires isolées de ces biopsies parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.....	Erreur! Signet non défini.
Figure 45 : L'expression de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase dans les cellules alvéolaires isolées de biopsies de parenchymes de GD parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.	Erreur! Signet non défini.
Figure 46: L'expression des canaux KvLQT1 dans les biopsies de parenchymes de GD et les cellules alvéolaires isolées de ces biopsies parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.....	Erreur! Signet non défini.

Liste des sigles et abréviations

Ac : Anticorps

ADP: Adénosine diphosphate

Ag : Antigène

AMM : Aide médicale à mourir

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AP : Artère pulmonaire

AQP : Aquaporine

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASL : Airway surface liquid

ATI : Cellule épithéliale alvéolaire de Type I

ATII : Cellule épithéliale alvéolaire de Type II

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

BAL : Lavage bronchoalvéolaire

BOS : Bronchiolite *obliterans*

BSA : Albumine de sérum bovin

C : Celsius

CCPA : Conseil canadien de la protection des animaux

CEC : Circulation extracorporelle

CER : Comité d'éthique de la recherche

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CHUM : Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CIPA : Comité institutionnel de protection des animaux

Cl⁻ : Ion chlore

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPO : Centre de prélèvement d'organe

CRCHUM : Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CTRL : Contrôle

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDC : Don par décès cardiocirculatoire
DDN : Don par décès neurologique
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPG : Dysfonction primaire du greffon
ECMO : Extracorporeal membrane oxygenation
EGF : Epithelial Growth Factor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ENaC : Epithelial sodium channel
EtOH : Éthanol
É-U : États-Unis
EVLV : Perfusion *ex-vivo* du poumon
F : French
FBS : Sérum de veau fœtal
Fig. : Figure
FiO₂ : Fraction inspirée d'oxygène
FK : Fibrose kystique
FOXO1 : Forkhead Box M1
FP : Fibrose pulmonaire
FPI : Fibrose pulmonaire idiopathique
GD : Greffon donneur
GTP : Guanine Tri Phosphate
H : Heure
H₂O : Eau
HC : Hémorragie cérébrale
HCO₃⁻ : Ion bicarbonate
HE : Hématoxyline et éosine
HES : Hematoxylin and eosin staining
HLA : Human leukocyte antigen
HAS : Hémorragie sub-arachnoïdienne
HSC : Highly selective channel
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

I : Ischémie froide
IFN- γ : Interféron- γ
Iir : Secondaire
Ir : Primaire
I/R : Ischémie/reperfusion
IGF : Insulin-like growth factor
IgG : Immunoglobuline Gamma
ICC : Immunocytochimie
IF : Immunofluorescence
IHC : Immunohistochimie
IL : Interleukine
ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation
I.v. : Intraveineuse
K⁺ : Potassium
KGF : Keratinocyte Growth Factor
l : litre
LPD : Low potassium Dextran 40
LPS : Lipopolysaccharide
MA : Massachusetts
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
 μm : Micromètre
MEM : Minimal essential medium
Min : Minute
mmHg : Millimètre de mercure
MPI : Maladie pulmonaire interstitielle
Na⁺ : Sodium
NaCl : Chlorure de sodium
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
Na⁺/K⁺ ATPase: Pompe sodium/potassium adénosine triphosphate
NBD : Nucleotide Binding domain
NF-kB : Nuclear-factor kappa B

NO : Monoxyde d'azote
NSC : Non selective channel
O₂ : Oxygène
p35 : Boîte de pétri de 35 mm
p100 : Boîte de pétri de 100mm
PA : Pennsylvanie
PBS : Tampon phosphate salin
P/F: Pression artérielle partielle d'oxygène/fraction inspirée d'oxygène
pFA : Paraformaldéhyde
PG : poumon gauche
pH : Potentiel d'hydrogène
pO₂ : Pression partielle d'oxygène
PRAc : Panel de réactivité aux anticorps calculé
pTLC : Predictive total lung capacity
PTPm : Pore de transition de perméabilité membranaire
QC : Québec
QTX : Numéro identification unique du donneur
R : Reperfusion
RA : Rupture d'anévrisme
R-L3 : (3-R)-1,3-dihydro-5-(2-Fluorophenyl)-1,3-dihydro-3-(1H-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one
ROS : Espèce réactive de l'oxygène
RPM : Révolutions par minute
RT : Température pièce
RTE : Résistance électrique transépithéliale
SCP : Support cardiopulmonaire
SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SEM : Erreur type de la moyenne
SGGS : Sodium-glucose-gentamycine-septra
SIRS : Systemic inflammatory response syndrom
SP : Protéine de surfactant

SP-A : Protéine de surfactant A
STM : Segment transmembranaire
T : Temps
TGF : Transforming Growth Factor
TLC_{CT} : Total lung capacity CT Scan
TMFV : Traitements de maintien des fonctions vitales
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
Tx : Transplantation
UA : Unité arbitraire
UI : Unité internationale
U.K. : Royaume Uni
VD : Ventricule droit
W/D : Wet-to-dry
WGA : Wheat germ agglutinin
ZO-1 : Zona occludens 1

Remerciements

En tout premier lieu, j'aimerais remercier Drs Mélanie Dieudé et Guillaume Emeriaud d'avoir bien voulu accepter d'être les membres de mon jury de maîtrise.

Ensuite, j'aimerais remercier Dre Emmanuelle Brochiero de m'avoir accueillie dans son laboratoire et permise de vivre cette belle aventure où les milieux de la recherche et de la clinique ont cheminé ensemble. J'aimerais également remercier Dr Pasquale Ferraro, co-directeur de maîtrise : il a suffi que je lui mentionne cette idée que j'avais de faire une maîtrise et, en un tour de main, il a fait en sorte que cette pensée devienne réalité.

Des remerciements tous spéciaux sont dédiés au Dr Damien Adam pour ses conseils judicieux, son aide précieuse et sa très grande disponibilité.

À toutes les personnes rencontrées au laboratoire : Anik « Cariña », Méloushki, Laura, Stéphanie, j'ai grandement apprécié votre accueil, votre bonne humeur et vos précieux conseils. Vous êtes uniques!

Finalement, j'aimerais exprimer toute ma gratitude aux personnes de mon entourage et mes proches pour votre compréhension, votre patience et vos encouragements.

Je tiens également à remercier la Fondation pour la recherche en chirurgie thoracique de Montréal pour son soutien tout au long de mes études à la maîtrise.

PREAMBULE

La transplantation pulmonaire est l'ultime alternative thérapeutique pour les patients présentant des maladies pulmonaires en phase terminale. Certains d'entre eux développeront une dysfonction primaire du greffon (DPG). La DPG est la première cause de mortalité en période péri-opératoire suivant une transplantation pulmonaire. Elle est associée à une diminution du taux de survie et à une plus grande incidence de rejet chronique (1).

L'ischémie/reperfusion (I/R) joue un rôle majeur dans le développement de la DPG. L'I/R et la DPG présentent des dommages endothéliaux vasculaires et épithéliaux alvéolaires, une réaction inflammatoire exacerbée et un œdème pulmonaire de lésion. La résorption de cet œdème implique la restauration de la capacité des cellules épithéliales alvéolaires d'absorber des ions Na^+ via les canaux sodiques ENaC, et du liquide de l'œdème.

En se basant sur la littérature (2), nous avons émis l'hypothèse que la dysfonction épithéliale alvéolaire résultant de l'I/R, tant au niveau de l'atteinte de l'intégrité que de la fonctionnalité de l'épithélium présente dans les greffons donneurs (GD), jouerait un rôle primordial dans le développement de la DPG par la suite, chez les receveurs.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier un modèle cellulaire de culture primaire de cellules alvéolaires chez le rat mimant l'I/R, un modèle animal, soit le porc, pour l'étude du stress inflammatoire et de transplantation pulmonaire et un volet translationnel chez l'humain en transplantation pulmonaire. Dans les 3 cas, nous avons étudié l'expression des protéines associées à l'intégrité de l'épithélium alvéolaire, la protéine d'échafaudage des jonctions serrées ZO-1 et à l'expression des canaux ioniques associés à la fonctionnalité des cellules épithéliales alvéolaires, soit le canal sodique ENaC, de chlore CFTR et potassique KvLQT1.

Cette étude est dirigée essentiellement sur le développement de la DPG en transplantation pulmonaire.

1. INTRODUCTION

1.1. L'appareil respiratoire

1.1.1. Anatomie de l'appareil respiratoire

Le système respiratoire permet l'oxygénation des organes et tissus et l'évacuation du dioxyde de carbone (CO₂). Il est constitué de 2 principales sections : le système respiratoire supérieur et inférieur (Fig. 1).

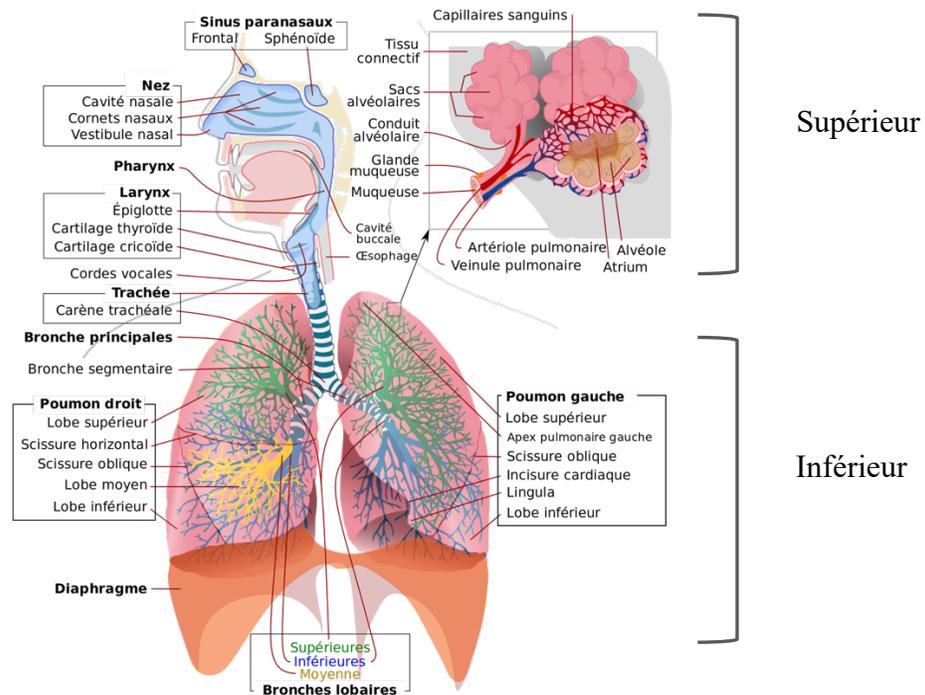


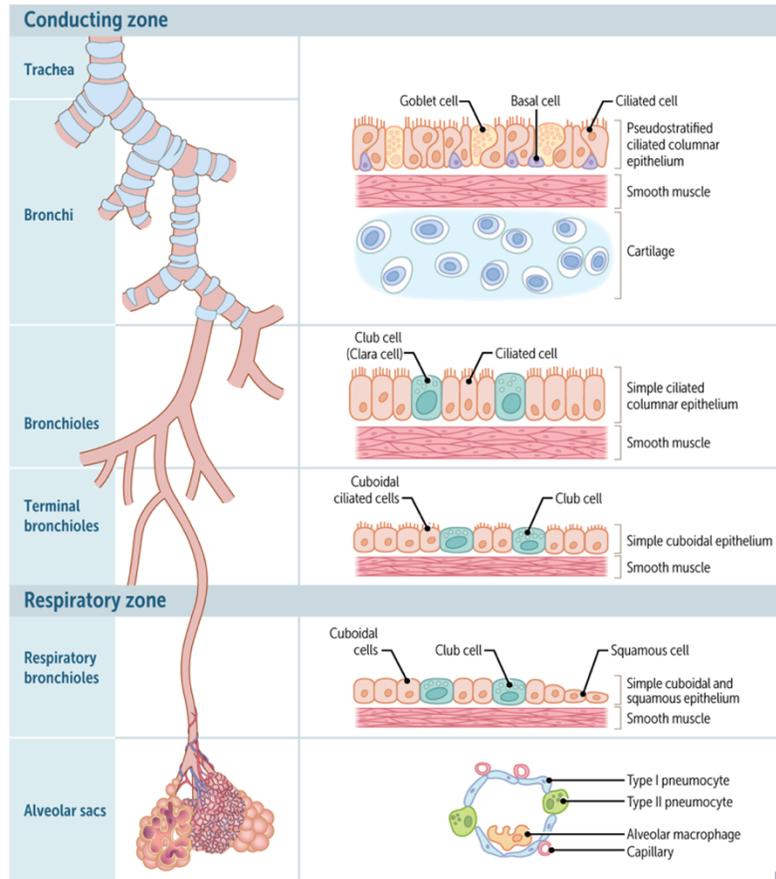
Figure 1 : Anatomie de l'appareil respiratoire humain.

Schématisation des différentes parties du système respiratoire supérieur et inférieur humain
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a2/Respiratory_system_complete_fr.svg/1920px-Respiratory_system_complete_fr.svg.png

L'air accède aux voies du système respiratoire supérieur via la bouche et les fosses nasales, permettant son humidification, sa purification et son réchauffement : c'est aussi dans cette portion de l'appareil respiratoire que sont décelées les odeurs par l'épithélium olfactif, situé dans la cavité nasale. Ensuite, l'air est acheminé vers le pharynx, incluant le naso-, oro- et

laryngopharynx, puis le larynx. C'est au niveau du larynx que se retrouvent les organes musculaires de la voix, les cordes vocales.

La zone conductrice du système respiratoire inférieur débute au niveau de la trachée pour se diviser en deux bronches principales, bronches secondaires, bronchioles et bronchioles terminales (Fig. 2).



LadyofHats traduction by Berru

Figure 2: Anatomie et structure histologique des voies aériennes et respiratoires.

Schématisation de l'évolution de la structure de l'épithélium de la zone conductrice du système respiratoire, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales, et de la zone respiratoire, des bronchioles respiratoires aux alvéoles.

<https://d1yboe6750e2cu.cloudfront.net/i/7c7d99a577b3544926ce175e71c77d388d8cb5b8>

La zone respiratoire est constituée des bronchioles respiratoires, de canaux alvéolaires, de sacs alvéolaires pour se terminer par les alvéoles : c'est à ce niveau que l'échange gazeux s'effectue (3).

1.1.2. Histologie de l'appareil respiratoire

1.1.2.1. L'épithélium des voies aériennes

1.1.2.1.1. Voies aériennes supérieures nasales-trachéales-bronchiques

La conduction de l'air débute au niveau de la cavité nasale respiratoire qui est recouverte d'un épithélium pseudostratifié prismatique cilié, d'une membrane basale et de la lamina propria (Fig. 3) (4).

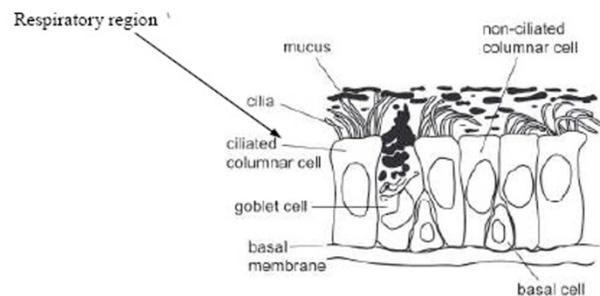


Figure 3: Épithélium de la zone de conduction.

Schématisation de la structure histologique de l'épithélium des voies aériennes nasales (Pires *et al.*, 2009)

Cet épithélium est composé principalement de cellules multiciliées, de cellules caliciformes sécrétoires (ou cellules en gobelet) et de cellules basales. L'épithélium retrouvé au niveau de la trachée et des bronches primaires est également un épithélium pseudostratifié cilié prismatique, relativement similaire à celui retrouvé au niveau nasal avec des cellules ciliées, caliciformes et basales, présentes sur une membrane basale qui juxtapose la lamina propria. Des glandes muqueuses et séreuses se retrouvent sous l'épithélium et le tout repose sur une couche cartilagineuse composée de cartilage hyalin délimité par 2 couches de périchondre. Des travaux récents ont montré l'existence d'un nouveau type cellulaire, rare, riche en canaux ioniques dont le rôle reste à déterminer : les ionocytes (5).

Les cellules basales représentent 30% de l'épithélium des voies nasales et aériennes. Elles permettent l'ancrage de cet épithélium à la lame basale, et sont considérées comme cellules souches/progénitrices, permettant ainsi le renouvellement naturel du tissu épithélial et/ou sa

réparation suite à des dommages. Les cellules ciliées (type cellulaire majoritaire, environ 60%) sont de forme allongée et cylindrique avec présence de plusieurs centaines de cils à leur pôle apical. Elles possèdent des microvilli, prolongement de la membrane cytoplasmique, en positions basale et latérale, et sont reliées entre elles par des jonctions serrées en leur pôle apical et par des desmosomes sur les faces latérales et basale. La présence de microvilli au pôle apical des cellules ciliées permet le transport transépithélial (voie transcellulaire) de liquide et d'ions, via des canaux ioniques et transporteurs (6). Les cellules ciliées, par le battement synchrone de leurs cils, participent au mouvement de la couche mucociliaire, une couche de liquide périciliaire surmontée de mucus (sécrété par les glandes muqueuses ainsi que les cellules caliciformes (10% des cellules épithéliales) (Fig. 2) (7). La couche mucociliaire joue principalement un rôle de défense contre les pathogènes et les particules présentes dans les voies aériennes (8). En effet, le mucus présent dans la couche mucociliaire capte les particules et les pathogènes aspirés dans l'appareil respiratoire. Les cils des cellules ciliées baignent dans la portion liquide de la couche mucociliaire (liquide périciliaire) et, par leur battement apparenté à un effet dit « de tapis roulant », assurent le déplacement de cette couche vers le haut des voies aériennes. Il sera ensuite évacué par expectoration ou via le tube digestif (6). Ce phénomène constitue la première de défense contre les agressions extérieures.

1.1.2.1.2. Voies aériennes inférieures et bronchioles

Un épithélium prismatique cuboïde est retrouvé au niveau des bronchioles (Fig. 2) (9). Il est composé de cellules basales (cellules progénitrices bronchiolaires), de cellules ciliées, des cellules Club (anciennement dénommées cellules de Clara) et quelques cellules caliciformes au niveau des épithélia des bronchioles supérieures (10). Les bronchioles respiratoires se divisent ensuite en canaux alvéolaires, en sacs alvéolaires puis alvéoles.

1.1.2.2. L'épithélium alvéolaire

1.1.2.2.1. Histologie

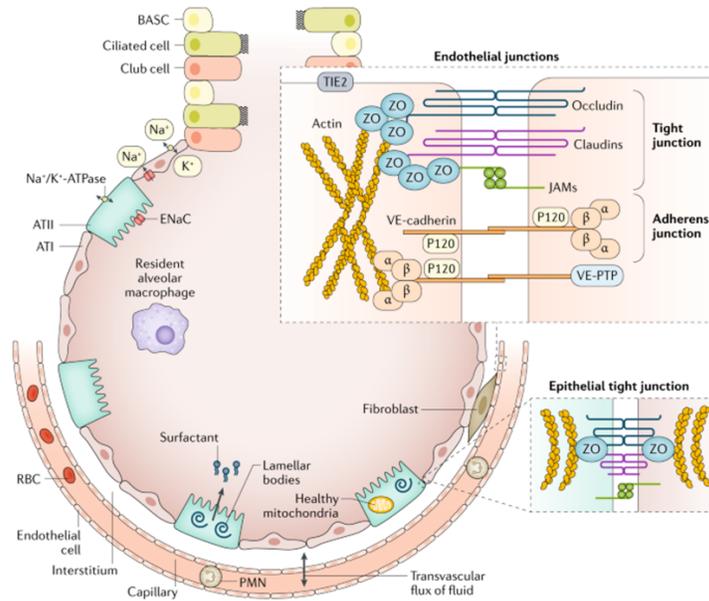


Figure 4: Structure d'une alvéole dans des conditions saines.

Schématisation des différentes cellules et composantes retrouvées au niveau alvéolaire et endothélial : les cellules alvéolaires ATI et ATII, les macrophages alvéolaires, la couche de surfactant alvéolaire, les fibroblastes, les capillaires, les cellules endothéliales et les globules rouges. Le maintien de l'intégrité épithéliale est assuré par les différentes jonctions intercellulaires et la clairance liquidienne/ionique est assurée par les canaux et pompe/transporteurs ioniques. (Matthay *et al.*, 2019)

1.1.2.2.1.1. Les cellules alvéolaires de type I (ATI)

Les ATI forment une mince paroi ($\sim 0,2\mu\text{m}$ épaisseur), elles sont moins nombreuses que les cellules alvéolaires de type II (ATII) mais elles tapissent $\sim 95\%$ de la surface des alvéoles (Fig. 4) (11). Elles sont impliquées dans l'échange gazeux au niveau de celles-ci. Chaque ATI couvre une surface d'environ $5000 \mu\text{m}^2$. Cet étalement des ATI pourrait contribuer à la faible perméabilité de l'épithélium alvéolaire, laissant peu d'espace où pourrait s'infiltrer le liquide et les protéines. Ainsi, la perméabilité de l'épithélium alvéolaire est 100 fois moindre que celle de l'endothélium pulmonaire (12).

L'interstice d'échanges gazeux est délimité par les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires et des ATI reposant sur une membrane basale commune. En plus des échanges gazeux, les ATI participent au transport ionique et liquidien alvéolaire. Elles sont reliées entre

elles par des jonctions serrées. La résistance de cette barrière, ainsi que le phénomène de réabsorption liquidienne, secondaire à la réabsorption ionique, permettent de garder la lumière des alvéoles presque exempte de liquide et de protéines après la naissance, afin d'assurer un échange gazeux efficace (11) (voir section 1.1.3.3).

1.1.2.2.1.2. Les ATII

Les cellules alvéolaires ATII sont des cellules de formes cuboïdales. Elles sont majoritaires (60% des cellules alvéolaires) mais couvrent seulement environ 4% de la surface des alvéoles et se retrouvent généralement « aux coins » ou jonctions où s'annexent les alvéoles entre elles (Fig. 4). Une présence de corps lamellaires est observée à l'intérieur de leur cytoplasme. Ces organites, constitués d'environ 80 à 90% de lipides (principalement de phospholipides) et de protéines, sécrètent une substance nommée le surfactant, par des microvilli présents au pôle apical des ATII (13). Le surfactant a, entre autres, la fonction de diminuer la surface de tension des parois alvéolaires et empêche ainsi un affaissement des alvéoles en fin d'expiration et en présence d'atélectasie (14). Le surfactant est classé selon le type de protéines qui le composent (SPs) : SP-A, -B, -C et -D. Les cellules Club synthétisent et sécrètent également des SPs, mais seules les ATII produisent et sécrètent la SP-C (14). La sécrétion de surfactant par les corps lamellaires, est accompagnée d'une sécrétion de lysozymes possédant une activité antimicrobienne (14). Il est aussi suggéré que la SP-A aurait un rôle d'inhibition du stress oxydatif (13).

L'épithélium alvéolaire est continuellement soumis à des agressions et les ATII jouent un rôle de cellules progénitrices (15). Elles se renouvellent et ont la capacité de se redifférencier en cellules ATI ou ATII. En plus de leur fonction sécrétoire (de surfactant et de molécules modulant l'immunité) et réparatrice, les ATII jouent également un rôle primordial dans l'absorption ionique et liquidienne (voir section suivante).

1.1.3. Les fonctions de l'épithélium alvéolaire

Outre sa fonction primordiale d'échange gazeux (oxygénation et décarboxylation de l'organisme), l'épithélium respiratoire a, en second lieu, une fonction de barrière protectrice contre les particules inhalées du milieu extérieur : particules de pollution, fumée, microbes. L'épithélium alvéolaire a d'autres mécanismes de défense : la clairance ionique et liquidienne ainsi qu'une fonction dans l'adaptation immunologique (13). Ces diverses fonctions sont exposées dans les sections suivantes.

1.1.3.1. La fonction de respiration

La fonction primordiale de l'épithélium alvéolaire est la respiration permise par l'oxygénation des organes et l'élimination du dioxyde de carbone accumulé dans les tissus.

1.1.3.2. La fonction de barrière

L'épithélium alvéolaire est un ensemble de cellules cohésives qui forme donc une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'organisme. L'intégrité de l'épithélium est primordiale afin de rendre l'organisme imperméable aux aérocontaminants ou aux agents pathogènes. L'intégrité de cette barrière est assurée par plusieurs types de complexes jonctionnels intercellulaires qui vont également déterminer la polarité des cellules épithéliales, en délimitant un compartiment apical et un compartiment basolatéral (Fig. 5). Tout d'abord, se trouvent les jonctions serrées qui séparent le pôle apical du pôle basolatéral et assurent l'étanchéité de l'épithélium. Les jonctions serrées, situées au pôle apical des ATI et II, forment un espace semi-perméable entre les cellules (voie paracellulaire). Elles sont composées de protéines transmembranaires, de protéines d'échafaudage et des protéines du cytosquelette. Parmi les protéines d'échafaudage, nous retrouvons les protéines de la famille *Zona occludens* telle que ZO-1. Cette protéine a un rôle essentiel dans l'assemblage des jonctions serrées en permettant la connexion des protéines transmembranaires, claudines et occludines, au cytosquelette des cellules. Des travaux du groupe Matthay *et al.* (14) ont montré qu'une altération des jonctions serrées est associée à une augmentation de la perméabilité, à une infiltration de protéines de haut poids moléculaires au niveau des alvéoles, ainsi qu'une

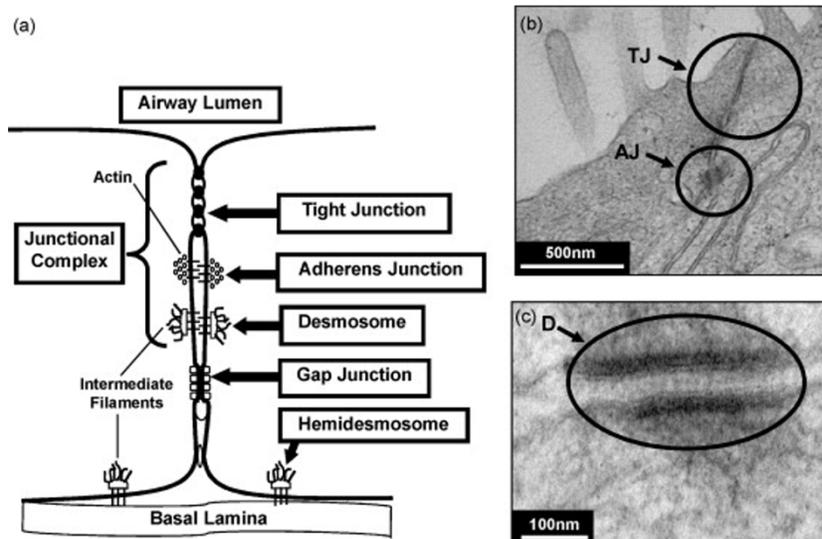


Figure 5: Structure des complexes jonctionnels intercellulaires retrouvés au niveau des cellules épithéliales alvéolaires.

(a) Schématisation des différents complexes jonctionnels intercellulaires et cellules/lame basale : jonctions d'étanchéité (jonctions serrées ou «tight junction»), jonctions d'ancrage (jonctions adhérentes ou «adherens junction»; desmosomes) et les jonctions d'échange (jonction communicantes ou «gap junction»). Photographies d'une jonction serrée et adhérente (b) et d'un desmosome (c) d'une cellule épithéliale de bronche humaine observées au microscope électronique en transmission. (Bérubé *et al.*, 2010)

infiltration d'eau et de cellules inflammatoires. Le niveau d'expression de cette protéine, et sa localisation, sont donc fréquemment évalués dans des études visant à définir l'altération de l'intégrité épithéliale dans des conditions pathologiques (14).

Ensuite, se trouvent les jonctions d'ancrage : les jonctions adhérentes et les desmosomes, garantissant la cohésion de l'épithélium. Les jonctions *Zonula adherens* sont formées des protéines β -caténine et E-cadhérine. Lorsqu'elles se mobilisent et interagissent ensemble, la protéine β -caténine agit comme un cofacteur transcriptionnel et initie la prolifération et la différenciation des ATII (13, 14). Les desmosomes confèrent aux cellules une grande résistance au stress mécanique. Ils forment des jonctions intercellulaires, mais également un ancrage intracellulaire des cellules limitrophes en créant des liens avec les filaments intermédiaires du cytosquelette de chaque cellule, rendant une jonction dite « adhésive » (16). Les desmosomes sont caractérisés par une structure centrale très dense, de moins d'1 μm de diamètre, formée des protéines desmogléine et desmocolline, qui relie les membranes cytoplasmiques de cellules adjacentes. Les protéines desmoplakine, plakophiline et plakoglobine forment « une plaque »

entre les filaments intermédiaires du cytosquelette de chaque cellule voisine et la structure intercellulaire. La principale fonction des desmosomes est le maintien de l'intégrité de l'épithélium. Il semble que certaines voies de signalisation cellulaires, induites dans certaines pathologies, pourraient altérer et agir au niveau de la fonction d'adhésion des desmosomes (16).

Enfin, les « gap junctions » ou jonctions communicantes permettent une communication directe entre les cytoplasmes de cellules adjacentes, et assurent le couplage physiologique entre celles-ci (17). Les connexines sont les protéines qui composent ces jonctions communicantes. Elles s'associent en hexamère (connexon) à l'intérieur du cytoplasme de deux cellules adjacentes. Ces connexons migrent à la surface de la membrane cytoplasmique et s'ancrent l'un à l'autre pour former un canal, laissant un espace (gap) d'environ 2 nm entre les membranes plasmiques des deux cellules voisines (18). La présence de jonctions communicantes permet la diffusion intercellulaire d'ions et de petites molécules. Elles interagissent également avec des cofacteurs tels ZO-1, le canal chlore CFTR, les protéines des jonctions adhérentes β -caténine et E-cadhérine. Ces dernières semblent jouer un rôle dans la régulation des jonctions communicantes (18). Une autre fonction attribuée à ces jonctions gap est la régulation de la sécrétion de surfactant par les cellules ATI.

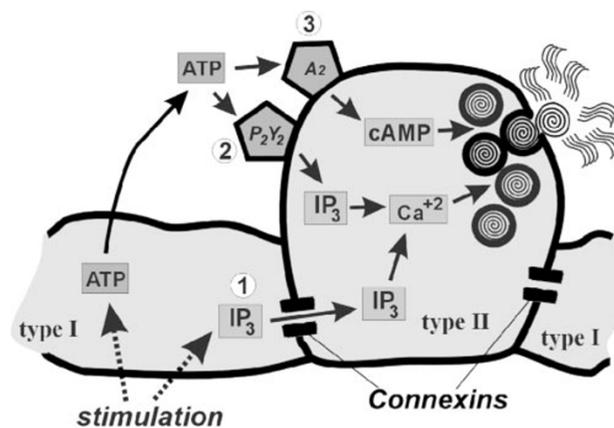


Figure 6: Régulation des échanges intercellulaires via les jonctions communicantes.

(a) Schématisation de la voie de régulation calcium-dépendante des échanges intercellulaires via les jonctions communicantes au niveau de l'épithélium alvéolaire.

Une hausse de la concentration calcique intracellulaire augmente l'activité sécrétoire de surfactant soit par action directe et/ou par la voie de la protéine kinase C dépendante (Fig. 6) (19). Il a été démontré, par le groupe d'Ashino *et al.*, qu'une augmentation de la concentration

de calcium intracellulaire suite à un étirement, est observée dans les cellules ATI. Ce changement électrolytique est transmis aux cellules ATII adjacentes et provoque la sécrétion de surfactant, démontrant ainsi un rôle complémentaire des cellules ATI dans la régulation de la sécrétion du surfactant par les ATII (19).

1.1.3.3. La fonction dans la clairance liquidienne et ionique

La troisième fonction de l'épithélium alvéolaire est la régulation de l'homéostasie ionique et liquidienne en contrôlant les transports des ions et des fluides. Le transport d'eau est essentiellement assuré par voie paracellulaire ainsi que par voie transcellulaire (via des canaux à eau dont les aquaporines). Les transports ioniques se font principalement par voie transcellulaire (impliquant des canaux ioniques et pompes/transporteurs) et en partie par diffusion (voie paracellulaire) (Fig. 7). Ces protéines (canaux et transporteurs) exprimées au niveau des membranes cellulaires permettent de créer un gradient électrochimique, et secondairement osmotique, entre l'espace alvéolaire et interstitiel permettant ainsi de contrôler la réabsorption de liquide. Différents canaux et pompes sont impliqués dans ce phénomène, parmi eux : le canal sodique ENaC, chlore CFTR, les canaux potassiques (dont le KvLQT1) et la pompe sodium/potassium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase).

1.1.3.3.1. Epithelial sodium channel (ENaC)

Il existe deux catégories de canaux sodiques : les canaux hautement sélectifs (HSC) et les canaux non-sélectifs (NSC). ENaC, un canal HSC, faisant partie de la famille de canaux ioniques dégénérine, est exprimé au sein d'épithélia de différents organes tel que le l'intestin, le tubule rénal distal et le poumon (20). Il est inactivé par l'amiloride, une molécule diurétique (21).

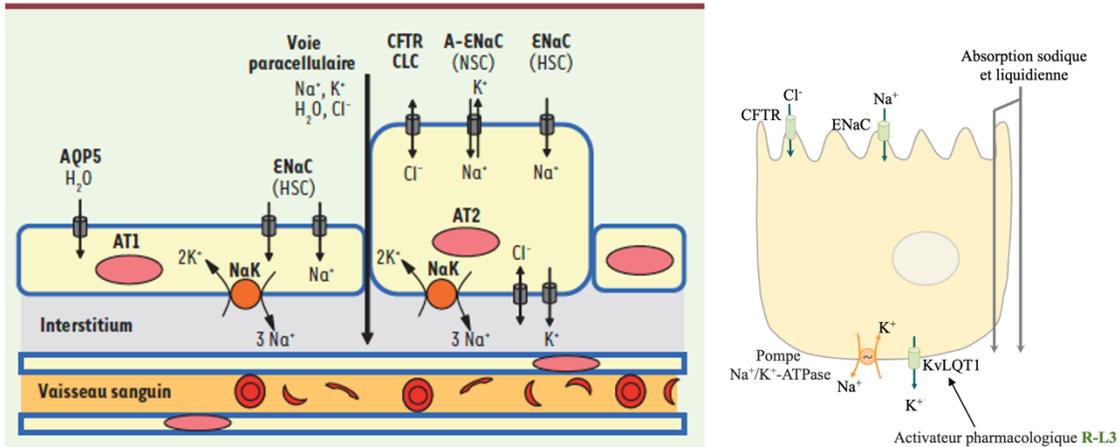


Figure 7: Transports ioniques et liquidiens au niveau des cellules épithéliales de l'épithélium alvéolaire.

Schématisation des transports ionique et liquidien, des canaux et pompes des cellules ATI et ATII. Au niveau de la membrane apicale, sont exprimés les canaux sodiques (HSC : highly selective cation, NSC : non selective cation), le canal chlorure CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) et les aquaporines (AQP5, marqueur des ATI). La pompe Na^+/K^+ -ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) ainsi que des canaux potassiques (dont KvLQT1) sont majoritairement exprimés au niveau de la membrane basolatérale.

(Dagenais, Berthiaume, Boncoeur, 2009)

1.1.3.3.1.1. Structure du canal ENaC

Le canal sodique ENaC est situé au pôle apical des cellules ATI et ATII. Il est formé de 3 sous-unités soit α , β et γ ENaC (Fig. 8). Chacune des sous-unités est composée de deux domaines transmembranaires (M1 et M2), d'une longue boucle extracellulaire et de deux courts segments, ces derniers correspondant aux domaines C- et N-terminaux, situés dans le compartiment cytoplasmique. La présence de la sous-unité α -ENaC est essentielle au bon fonctionnement de celui-ci : en effet, cette sous-unité constitue le pore du canal, les sous-unités β et γ à elles seules ne peuvent donc pas constituer un canal fonctionnel (22).

1.1.3.3.1.2. Fonction du canal ENaC au niveau alvéolaire

Le rôle primordial d'ENaC est son action dans la résorption liquidienne alvéolaire. En effet, celui-ci est responsable de l'absorption de Na^+ , et secondairement de la réabsorption au moment de la naissance du liquide amniotique présent dans les poumons, pour permettre l'échange gazeux au niveau alvéolaire (22). Cette clairance liquidienne du compartiment alvéolaire s'effectue en quatre étapes : 1) l'absorption d'ions Na^+ , via les canaux ENaC et NSC du pôle

apical vers l'espace intracellulaire. Le transport de ces ions, du compartiment alvéolaire à l'espace interstitiel, est rendu possible par un maintien d'une faible concentration d'ions Na^+ intracellulaire grâce à l'action de la pompe Na^+/K^+ ATPase, qui expulse les ions Na^+ via la membrane basale, en échange d'ions K^+ (discuté dans la prochaine section), 2) un transport d'anions (Cl^-) intracellulaire pour maintenir une électroneutralité dans la cellule (principalement par le canal CFTR, discuté dans la prochaine section), 3) un gradient osmotique dans l'espace interstitiel provoqué par une concentration accrue d'anions et cations résultant en un mouvement de liquide paracellulaire du compartiment alvéolaire à l'espace interstitiel et finalement, 4) un déplacement des ions et du liquide de l'espace interstitiel vers la lumière des capillaires pulmonaires, selon la loi de Starling (12). Les canaux potassiques (voir section 1.1.3.3.4) jouent également un rôle prépondérant en maintenant le potentiel de membrane et le gradient électrochimique, essentiel au transport ionique, et secondairement liquidien, transépithélial.

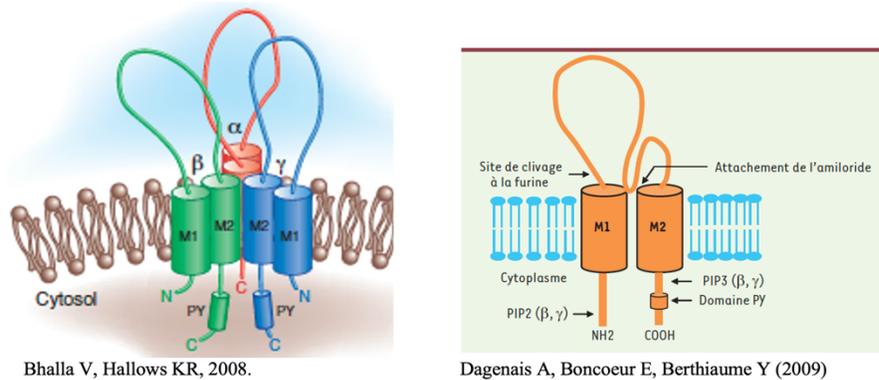


Figure 8: Représentations schématiques de la structure du canal sodique ENaC.

Structure du canal sodique ENaC fonctionnel, formée de sous-unités α , β et γ . Chaque sous-unité est constituée de deux domaines transmembranaires. Le pore formé par ces sous-unités permet le passage des ions Na^+ de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur.

1.1.3.3.1.3. Régulation du canal ENaC

La régulation du canal ENaC est réalisée par modulation directe de son activité, son expression, sa dégradation ou recyclage ainsi que sa localisation membranaire. Divers mécanismes peuvent réguler les canaux ENaC, tant au niveau de l'ouverture de son pore que du nombre de canaux présents au pôle apical de la cellule. Ces mécanismes sont déclenchés par l'activité AMPc, la

présence de stress oxydatif, la force de cisaillement ainsi que par l'activité du canal chlore Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) (20). Certaines protéases jouent un rôle d'autorégulation négative sur le canal, d'autres sur l'expression génique d'ENaC. Par exemple la furine, une protéase à sérine, possède son site de clivage, près du domaine M1. Ce clivage permet d'activer le canal (22). La présence de certaines hormones telles que les catécholamines et les glucocorticoïdes régulent également l'activité ou l'expression d'ENaC (Fig. 9) (23). Les travaux de notre laboratoire ont également montré que l'activité des canaux potassiques (KvLQT1, K_{ATP}) influence également l'expression d'ENaC et secondairement la fonction de transport liquidien au travers de l'épithélium alvéolaire (24). Lors d'un traitement pharmacologique avec un inhibiteur de ces canaux K^+ , par le clofilium, le niveau de l'expression de la sous-unité α -ENaC, les courants sodiques transépithéliaux et la résorption liquidienne diminuait. L'effet inverse (stimulation de l'expression et des courants ENaC et hausse de la résorption liquidienne) a été observé en activant pharmacologiquement ces canaux K^+ (24).

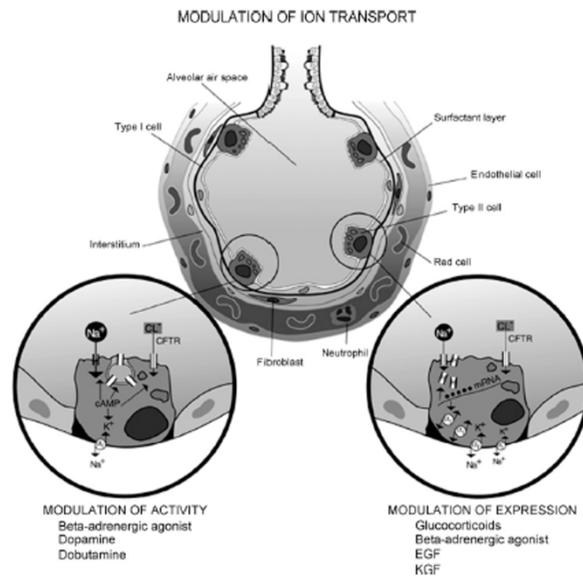


Figure 9: Régulation de l'activité des canaux ioniques ENaC au niveau de l'épithélium alvéolaire. (Berthiaume, Matthay, 2007)

Un environnement pro-inflammatoire (par exemple en présence de haute concentration de la cytokine pro-inflammatoire $TNF\alpha$ (25, 24, 26) ou infectieux (par exemple suite à une exposition à *Pseudomonas aeruginosa* ou en présence de LPS (27, 28, 29) peut avoir un effet délétère sur

l'expression de la sous-unité α du canal ENaC, son activité, et secondairement sur l'absorption de liquide par épithélium alvéolaire. Ces conditions, que l'on peut rencontrer dans le cas d'un Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) vont donc compromettre la capacité du canal ENaC à résoudre l'œdème pulmonaire observé.

En résumé, l'expression, la localisation et la fonction du canal ENaC, dont le rôle est primordial pour la clairance liquidienne alvéolaire, sont finement régulés en conditions physiologiques. Malheureusement, ce canal peut aussi être altéré dans des conditions pathologiques, limitant la clairance liquidienne en cas d'œdème pulmonaire.

1.1.3.3.2. La pompe Na^+/K^+ -ATPase

1.1.3.3.2.1. Structure de la pompe Na^+/K^+ -ATPase

La pompe Na^+/K^+ -ATPase, située au pôle basal des cellules ATI et ATII (Fig. 10), est une protéine transmembranaire hétérotétramère, composée de 2 sous-unités α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$, soit les deux isoformes retrouvées dans l'épithélium alvéolaire), et de 2 sous-unités β . L'activité catalytique de la pompe se retrouve dans les sous-unités α , tandis que les sous-unités β jouent un rôle dans l'insertion et la stabilisation de la protéine dans la membrane cytoplasmique et participe à l'hydrolyse d'ATP.

Dans la figure ci-dessous, 2 sous-unités γ sont indiquées pouvant jouer un rôle important dans l'affinité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase pour l'ATP, mais d'après de récentes découvertes, ces sous-unités ne font pas partie intégrante de cette pompe (30).

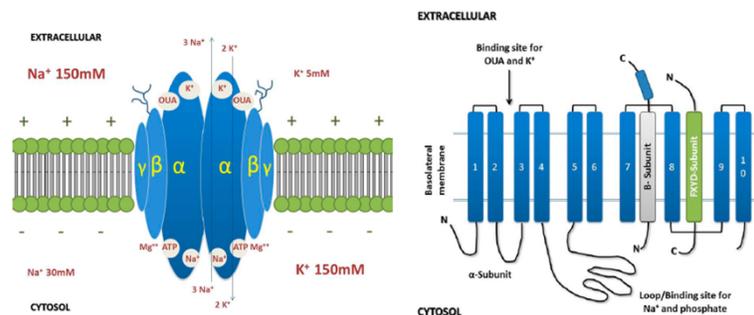


Figure 10 : Représentations schématiques de la structure de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. (Gonçalves-de-Albuquerque, 2017)

1.1.3.3.2.2. Fonction de la pompe Na^+/K^+ -ATPase

Cette pompe ionique maintient un gradient de concentration cationique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique en pompant 3 ions Na^+ à l'extérieur de la cellule en échange de 2 ions K^+ vers l'intérieur de celle-ci (30). Cette activité, comme son nom de pompe l'indique, nécessite l'hydrolyse d'un phosphate ($\text{ATP} \rightarrow$ adénosine diphosphate (ADP)) au niveau de la sous-unité α . Cette dépense énergétique équivaut à 40% de l'énergie cellulaire totale (30). C'est par la présence de ce gradient cationique intracellulaire que la résorption liquidienne alvéolaire s'effectue, via l'absorption de cations Na^+ et d'anion Cl^- , tel que discuté précédemment. Les sous-unités β Na^+/K^+ ATPase jouent aussi un rôle dans l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire en interagissant avec les protéines des jonctions serrées et de la polarité des cellules ATI et ATII (30). En outre, cette pompe ionique joue un rôle important dans le potentiel de repos membranaire, dans le contrôle du volume des cellules et dans la signalisation cellulaire (20).

1.1.3.3.2.3. Régulation de la pompe Na^+/K^+ -ATPase

L'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase est inhibée en présence d'ouabaine (hormone stéroïdienne), de gramicidine (mélange d'antibiotique de gramicidine A, B et C) et suite à une baisse du taux de concentration d'ions K^+ extracellulaire. Un environnement pro-inflammatoire exerce également un effet néfaste sur le fonctionnement de la Na^+/K^+ -ATPase (31).

1.1.3.3.3. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

1.1.3.3.3.1. Structure du canal CFTR

Le canal CFTR est le canal Cl^- le plus répandu dans l'épithélium des voies aériennes et respiratoires (20, 32, 33). Il fait partie de la famille des protéines ABC, est formé de deux domaines de 6 protéines transmembranaires (MSD1 et MSD2) liées entre elles par des boucles intra- et extracellulaires, 2 sites de liaison nucléotidique (NBD) contenant des séquences d'acides aminés liant l'ATP (Fig. 11) (34) et d'un domaine de régulation (35).

1.1.3.3.2. Fonction du canal CFTR

Tout comme ENaC, CFTR participe à la résorption de liquide pulmonaire au niveau alvéolaire au moment de la naissance ainsi que dans la réabsorption de l'œdème pulmonaire chez l'adulte (36, 37). Lorsque la clairance liquidienne alvéolaire est stimulée par l'activité l'AMPc, une absorption d'ions Na^+ mais également de Cl^- via CFTR est observée (contrairement au niveau des voies aériennes où le Cl^- est sécrété via CFTR) est accrue via le canal CFTR (38). En effet, au niveau des voies aériennes, le canal CFTR fonctionne dans le sens de la sécrétion ionique, et secondairement de liquide. Il régule ainsi l'épaisseur, la composition et le pH du liquide de surface des voies aériennes (ASL); jouant ainsi un rôle prépondérant dans le phénomène de clairance mucociliaire. Il est également impliqué dans la sécrétion d'ions bicarbonate (HCO_3^-), probablement par perméabilité à ces ions et est impliqué dans l'activation des échangeurs ioniques $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (35) régulant ainsi le pH du milieu. Le canal CFTR joue aussi un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire innée en régulant la sécrétion de molécules antioxydantes et antimicrobiennes (39).

1.1.3.3.3. Régulation du canal CFTR

Les membres de la famille ABC utilisent l'hydrolyse d'ATP pour le transport d'ions ou de protéines (ex de la P-glycoprotéine). Le CFTR est un canal ionique, avec donc un transport passif d'anion, où la liaison et l'hydrolyse $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ aux sites de liaison nucléotidique NBD occasionnent un changement de configuration du canal et provoquent l'ouverture de celui-ci pour le passage des anions Cl^- (Fig. 11). Il est nécessaire que le domaine de régulation soit phosphorylé par la protéine kinase AMPc-dépendante pour que l'ouverture du canal s'effectue pleinement. Les canaux K^+ (K_{ATP} , KvLQT1 et KCa3.1) régulent également la fonction, ainsi que l'expression (génique et protéique) de CFTR (39, 24).

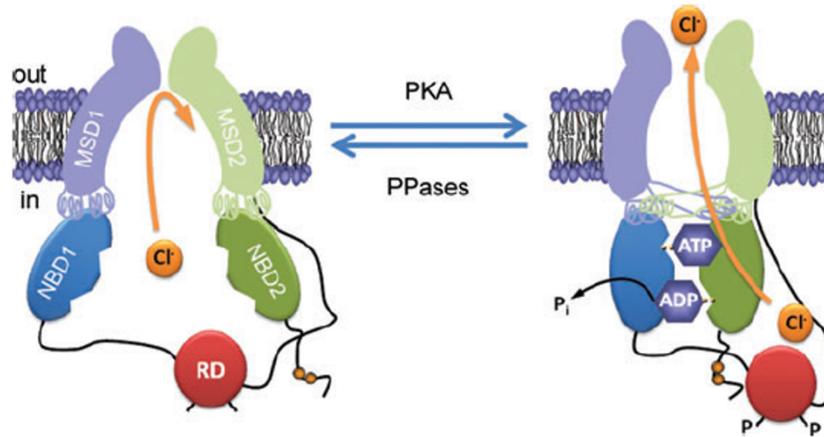


Figure 11: Représentation schématique de la structure du canal CFTR fermé et ouvert.

Schéma d'interactions des différents domaines suivant la phosphorylation du domaine R du canal CFTR permettant son ouverture et le passage des ions Cl^- à l'extérieur des cellules épithéliales au niveau de l'épithélium des voies aériennes ou à l'intérieur des cellules épithéliales alvéolaires. (Hwang, Sheppard, 2009)

1.1.3.3.4. Canaux K^+

Plus de 30 différents types de canaux K^+ , regroupés en 3 différentes classes, sont retrouvés au niveau de l'épithélium respiratoire (Fig. 12) (40). Ces canaux sont groupés en 3 classes, d'après le nombre de segments transmembranaires (STM) de leur structure. La 1^{ère} classe comprend les canaux voltage dépendant (K_v) et activés par le calcium (K_{Ca}) à 6 STM, la 2^e classe inclut les canaux à 4 STM et 2 pores, finalement la 3^e classe comprend les canaux à 2 STM et rectification entrante (Kir).

Au niveau alvéolaire, les canaux voltage dépendant sont les canaux présents en plus grand nombre. Parmi eux, le canal KvLQT1 joue un rôle primordial dans le transport ionique et la clairance liquidienne au niveau pulmonaire. Il est exprimé tout le long des voies aériennes et au niveau des cellules ATI et ATII.

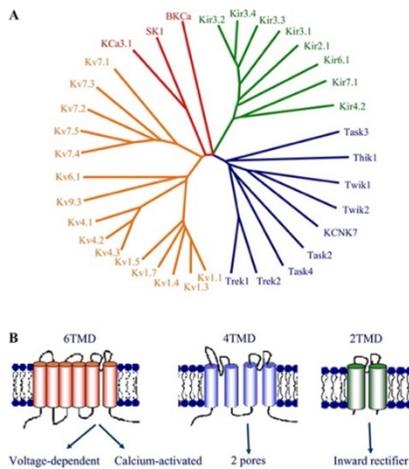


Figure 12: Arbre phylogénique des canaux K^+ de l'épithélium respiratoire.

Répartition par couleur des différentes classes de canaux K^+ : 2 STM à rectification entrante (vert), 4 STM à deux pores (bleu), 6 STM dépendants du voltage (orange) et activés par le calcium (rouge). (Bardou *et al.*, 2009)

1.1.3.3.4.1. Structure du canal KvLQT1

Le canal KvLQT1 est formé de sous-unités α (KCNQ1) et β (KCNE) (Fig. 13). La sous-unité α est composée de 6 STM; les domaines C- et N-terminaux se trouvent à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. La portion voltage dépendante et la région formant le pore du canal se retrouvent dans la structure de cette sous-unité α . La sous-unité β est composée d'un STM où la portion C-terminale se retrouve dans la région cytoplasmique de la cellule et le N-terminal à l'extérieur de celle-ci (41). Elle représente la portion régulatrice de KvLQT1.

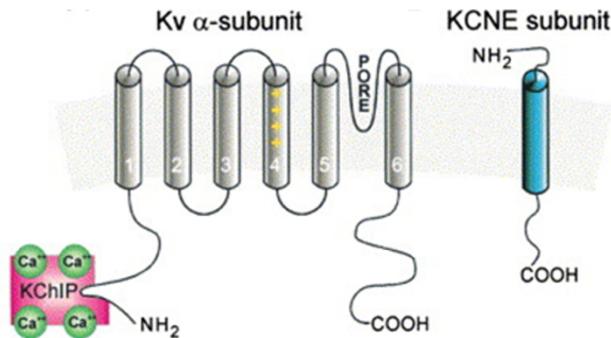


Figure 13: Représentation schématique de la structure du canal KvLQT1.

La sous-unité KCNQ1 est formée de 6 STM. Le STM 4 contient la partie sensible au voltage. Le pore formé entre le STM 5 et 6 permet le passage des ions K^+ . Au niveau du système respiratoire, la sous-unité β KCNE 2 ou 3 est retrouvée. (Modifié de Melman *et al.*, 2002)

L'assemblage de 4 sous-unités KCNQ1 est nécessaire à la formation du canal ionique. Les sous-unités régulatrices du canal KCNE2, KCNE3 et KCNE4 sont présentes au niveau de l'épithélium respiratoire (40), bien que les sous-unités KCNE2-3 demeurent les principales

retrouvées (40). Le canal KvLQT1 pulmonaire diffère ainsi du KvLQT1 cardiaque, composé des sous-unités KCNQ1 et KCNE1.

1.1.3.3.4.2. Fonction du canal KvLQT1

Au niveau cardiaque, le canal KvLQT1 participe à la repolarisation des cardiomyocytes, suite à un potentiel d'action cardiaque (41). Au niveau alvéolaire et des voies aériennes, les canaux K^+ participent au transport ionique et à la résorption liquidienne alvéolaire en contrôlant le potentiel de membrane (-40 mV à -20 mV) et en produisant un gradient électrochimique favorisant le déplacement des ions et du liquide. Ainsi, le canal KvLQT1 participe au contrôle du volume et à la composition des liquides de surface au niveau des alvéoles et des voies aériennes (40).

La modulation du canal potassique KvLQT1 (mais aussi K_{ATP}) influence l'expression de l'ARNm et l'activité du promoteur de la sous-unité α ENaC. En effet, l'activation pharmacologique des canaux KvLQT1 avec la molécule (3-R)-1,3-dihydro-5-(2--Fluorophenyl)-1,3-dihydro-3-(1H-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (R-L3), est suivie par une augmentation marquée de l'expression la sous-unité α -ENaC (39). Inversement, l'inhibition pharmacologique (chromanol ou clofilium) chronique de ce canal K^+ entraîne une diminution secondaire de l'expression de la sous-unité α -ENaC, démontrant sa régulation par les canaux KvLQT1 (40).

Il a été démontré, notamment par les travaux de notre laboratoire qu'à la suite des lésions au niveau de l'épithélium alvéolaire, plusieurs types de canaux K^+ , dont KvLQT1, K_{ATP} et/ou $K_{Ca3.1}$, sont impliqués dans les différentes étapes de la réparation épithéliale, c'est-à-dire dans la réparation, la migration et la prolifération cellulaire (Fig.14) (42).

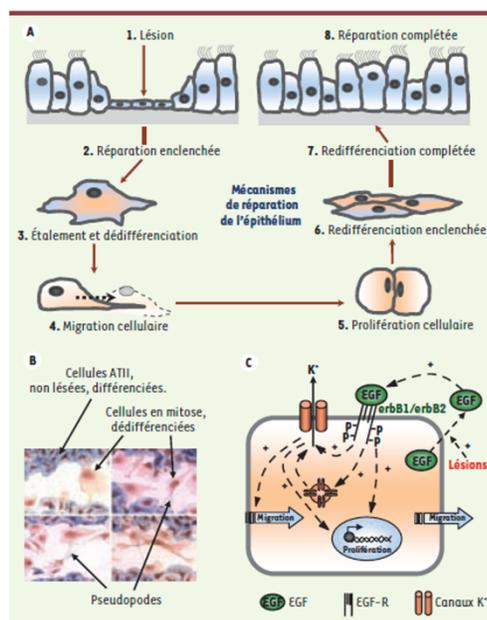


Figure 14: Schématisation des processus de réparation alvéolaire et rôle des canaux K^+ . (Bardou *et al.*, 2009)

1.1.3.3.4.3. Régulation du canal KvLQT1

Le facteur de croissance Epithelial Growth Factor (EGF) et l'AMPC intracellulaire stimulent l'activité du canal KvLQT1 (43). Les molécules pharmacologiques clofilium et chromanol agissent en tant qu'inhibiteurs de ce canal.

1.1.3.4. La fonction dans l'immunité

Comme énoncé précédemment, les alvéoles sont en contact direct avec l'extérieur et sont donc exposées à de nombreuses agressions (pathogènes, polluants, fumée de cigarette). La réponse immunitaire est assurée essentiellement par les macrophages. Toutefois, lors d'agressions au niveau pulmonaire, les cellules épithéliales sont capables de sécréter des molécules impliquées dans la réponse immunitaire/inflammatoire. En effet, les ATII ont aussi la capacité d'exprimer et de sécréter des chimiokines (MCP-1) et cytokines pro-(IL-6, -8) et anti- (IL-10) inflammatoires, leur conférant un rôle d'immunomodulateur, en agissant sur les macrophages alvéolaires et les leucocytes. La sécrétion de protéine de surfactant A (SP-A) pourrait également

influencer la production d'oxyde d'azote et de relâche de radicaux libres (ROS) par les macrophages alvéolaires.

1.1.3.5. Les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire en condition physiologique et pathologique

Le système respiratoire est en contact direct avec l'environnement extérieur. Il est donc exposé continuellement à des particules ou molécules indésirables toxiques, chimiques et xénotiques pouvant causer des dommages sur l'épithélium respiratoire. En conditions physiologiques, il est donc constamment renouvelé suite à ces agressions (14). Compte tenu de l'importance de l'intégrité et des différentes fonctions du tissu épithélial, sa régénération naturelle, ainsi que sa réparation suite aux lésions, sont donc primordiales.

Les épisodes d'exposition aux infections bactériennes, virales et agents chimiques, peuvent affecter transitoirement la fonction pulmonaire (44) et un SDRA peut en résulter. Le SDRA est un syndrome pouvant avoir pour causes une pneumonie, un sepsis autre que pulmonaire, des lésions par inhalation ou aspiration, un barotraumatisme par ventilation mécanique, une pancréatite, un traumatisme, de multiples transfusions de produits sanguins ou encore les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) en transplantation (44, 42).

La présence de médiateurs inflammatoires dans le contexte de SDRA induit la mort cellulaire soit par apoptose, nécrose, nécroptose ou ferroptose *etc.* (45), au niveau de l'endothélium vasculaire, mais également, majoritairement dans la population de cellules épithéliales ATI, plus sensibles à un environnement inflammatoire, laissant ainsi des portions de la membrane basale dénudée. En revanche, les cellules ATII sont plus résistantes et possèdent une fonction de cellules progénitrices des cellules ATI (44). Cette desquamation de la membrane basale permet l'infiltration d'un œdème alvéolaire, causé par l'altération des jonctions intercellulaires, un transport ionique et liquidien déficient et une sécrétion de surfactant compromise.

Le processus de réparation est nécessaire pour le rétablissement de l'intégrité et de la fonctionnalité de l'épithélium alvéolaire. Les cellules ATI recouvrent 95% de la surface des

alvéoles et participent aux échanges gazeux, il est donc primordial de renouveler cette population de cellules et restaurer la structure alvéolaire (46).

La réparation de l'épithélium alvéolaire s'effectue en quatre principales étapes : (Fig. 15)

1) L'étalement et dé-différentiation des cellules ATII intactes

2) La migration des cellules ATII saines

Ces deux premières étapes dépendent d'une régulation fine du cytosquelette. Celui-ci est responsable des protusions de lamellipodes et de filopodes au pôle antérieur de la cellule, puis de rétraction du pôle postérieur de la cellule de la matrice extracellulaire, par l'action entre autres des enzymes Rho Guanine Tri Phosphate (GTP)ases, permettant ainsi aux cellules de s'étaler puis de se déplacer.

3) La prolifération des cellules ATII

Elles prolifèrent et recouvrent la membrane basale représentant une hyperplasie cellulaire. Les facteurs favorisant la prolifération de ces cellules sont des facteurs de croissance (tels que HGF, KGF, EGF, GMCSF), des facteurs de transcription (comme FOXM1) et des voies de signalisation (telles que celles de EGF/EGFR ou de la β -caténine).

4) La re-différenciation des cellules et régénération de l'épithélium alvéolaire

Les cellules ATII dédifférenciées sont capables ensuite de se redifférencier en cellules ATI ou ATII. Ces mécanismes ne sont pas bien élucidés, cependant il a été montré que ces mécanismes sont promus en partie par le Transforming Growth Factor (TGF)- β , sécrété par les lymphocytes T régulateur, et insulin-like growth factor-I (44).

Si le dommage épithélial est très important, des cellules progénitrices « accessoires » autres que les cellules ATII pourrait contribuer à la réparation de l'épithélium alvéolaire. En effet, la migration et la prolifération des cellules souches bronchiolaires cytokératine-5-positives (KRT5⁺) et de cellules Club, ayant la capacité de jouer le rôle de cellules progénitrices de l'épithélium alvéolaire, peuvent également contribuer (46).

Ces mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire sont primordiaux pour restaurer l'intégrité de la barrière et la fonction d'échange gazeux (par les ATI), de sécrétion de surfactant (par les ATII) et d'absorption ionique et liquidienne (par les ATI et ATII), autant de rôles essentiels à l'homéostasie et au fonctionnement adéquat du système respiratoire.

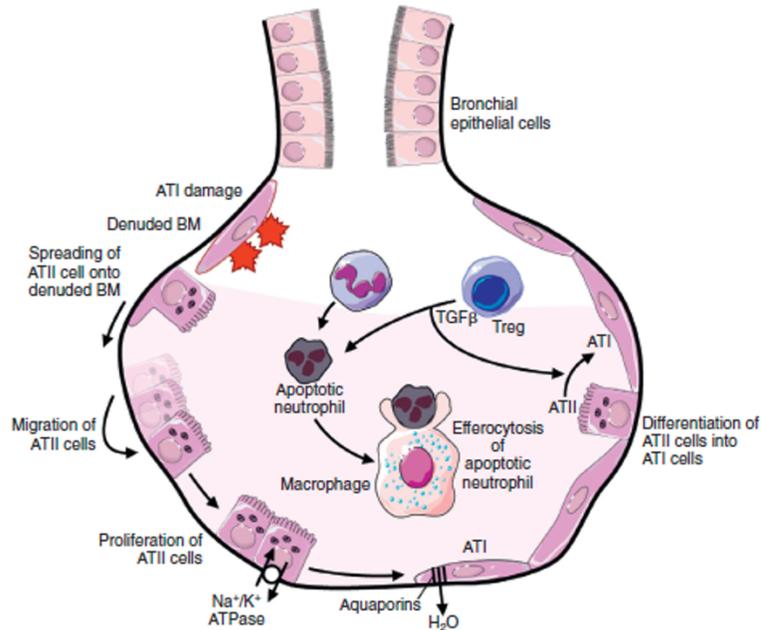


Figure 15: Différentes étapes de la réparation de l'épithélium alvéolaire.

Suite à des lésions de l'épithélium respiratoire, des mécanismes de réparation se mettent en place pour la défense de l'organisme. En premier lieu, les cellules progénitrices ATII vont s'étaler pour recouvrir la surface de la membrane basale et migrer. S'en suit une étape de prolifération cellulaire et enfin des étapes de re-différentiation cellulaire pour obtenir un épithélium alvéolaire fonctionnel composé d'ATI et ATII (Zemans, Downey, 2016).

1.2. La transplantation

Malgré les phénomènes de réparation et régénération tissulaire exposés ci-dessus, lorsque les dommages et la baisse de fonction pulmonaire sont trop sévères, la transplantation pulmonaire est l'option ultime pouvant être offerte aux patients atteints de pathologies respiratoires au stade terminal (47).

1.2.1. Données épidémiologiques

Selon les données de l'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) publiées en 2019, 69 200 transplantations pulmonaires ont été réalisées de 1985 au 30 juin 2018 dans le monde, avec une augmentation continue d'année en année (Fig. 16) (48).

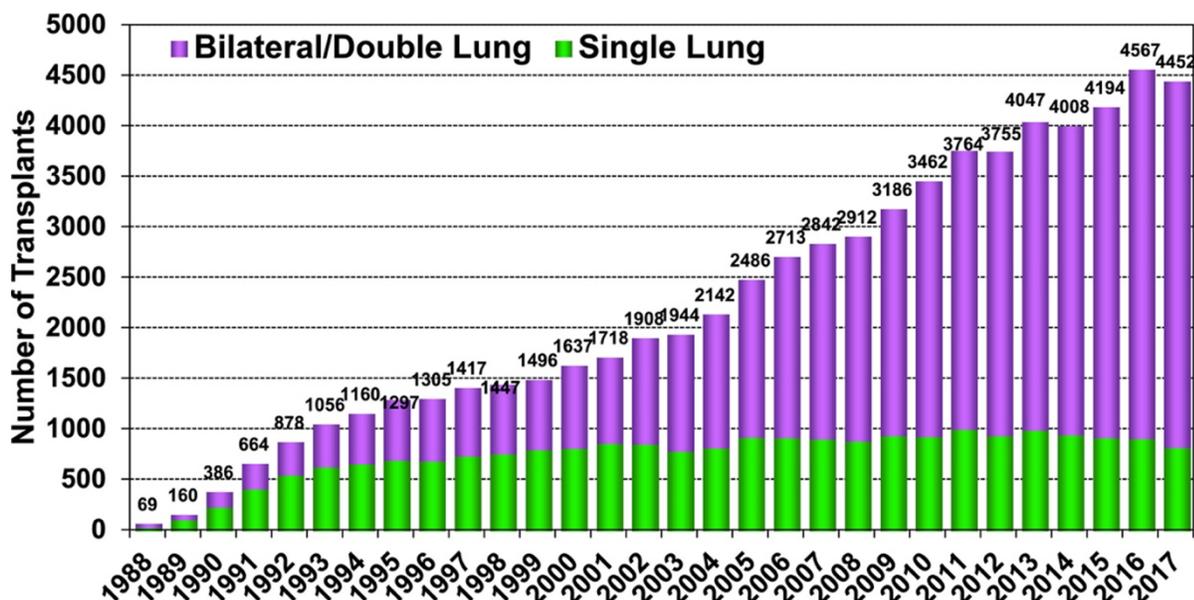


Figure 16: Graphique représentant le nombre de transplantations pulmonaires chez l'adulte effectuées par année, de 1988 à 2017.

Ces transplantations ont été réalisées dans 260 centres participants. Elles ont été classées par procédure pour chacune des années, soit greffe pulmonaire unilatérale (vert) ou bilatérale (violet). Il est à noter que le nombre de transplantations d'un seul greffon ne cesse de décroître, ne représentant que 19% du nombre total des interventions en 2017.

(Chambers *et al.*, 2019)

Table 46 Lung transplants by transplant type, Canada (excluding Quebec), 2006 to 2015 (number)

Type of transplant	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Bilateral lung	101	127	114	125	121	137	129	164	162	188	1 368
Single lung	30	27	23	27	23	13	29	31	22	33	258
Living-donor lobar	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
Heart-lung	5	3	4	5	2	2	3	0	2	1	27
Total	137	157	141	157	146	153	161	195	186	222	1 655

Note

Data from Quebec was excluded from this table because of significant under-reporting between 2012 and 2015.

Source

Canadian Organ Replacement Register, 2016, Canadian Institute for Health Information.

Tableau I : Tableau des transplantations au Canada (excluant le Québec) illustrant le nombre de transplantations de lobes pulmonaires chez un donneur vivant, de poumons uni ou bilatérales ainsi que de transplantations cœur-poumons, effectuées au Canada (excluant le Québec), de 2006 à 2015.

Au Québec, le nombre de transplantations pulmonaires s'élevait à 71 pour l'année 2020.

Les principales pathologies observées en transplantation sont énumérées dans le tableau II.

Adult Lung Transplants
Diagnoses (Transplants: January 1995 – June 2018)

Diagnosis	SLT (N=19,958)	BLT (N=43,572)	TOTAL (N=63,530)
COPD	7,750 (38.8%)	11,402 (26.2%)	19,152 (30.1%)
IIP	7,536 (37.8%)	9,047 (20.8%)	16,583 (26.1%)
CF	227 (1.1%)	9,447 (21.7%)	9,674 (15.2%)
ILD-not IIP	1,123 (5.6%)	2,486 (5.7%)	3,609 (5.7%)
A1ATD	814 (4.1%)	2,155 (4.9%)	2,969 (4.7%)
Retransplant	1,003 (5.0%)	1,553 (3.6%)	2,556 (4.0%)
IPAH	95 (0.5%)	1,768 (4.1%)	1,863 (2.9%)
Non CF-bronchiectasis	77 (0.4%)	1,637 (3.8%)	1,714 (2.7%)
Sarcoidosis	343 (1.7%)	1,197 (2.7%)	1,540 (2.4%)
PH-not IPAH	140 (0.7%)	838 (1.9%)	978 (1.5%)
LAM/tuberous sclerosis	161 (0.8%)	420 (1.0%)	581 (0.9%)
CTD	169 (0.8%)	395 (0.9%)	564 (0.9%)
OB	79 (0.4%)	460 (1.1%)	539 (0.8%)
Cancer	8 (0.0%)	30 (0.1%)	38 (0.1%)
Other	433 (2.2%)	737 (1.7%)	1,170 (1.8%)



Tableau II: Tableau illustrant les différentes pathologies associées à des transplantations pulmonaires uni- et bi-latérales dans 260 centres de greffes de janvier 1995 à juin 2018.

(STL : single lung transplant; BLT : bilateral lung transplant; COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease; IIP: Idiopathic Interstitial Pneumonia; CF: Cystic Fibrosis; IDL: Interstitial Lung Disease; A1ATD: A1 Anti-Trypsin Disease; IPAH: Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension; PH-not IPAH: Pulmonary Hypertension-not IPAH; LAM/tuberous sclerosis: Lymphangiomyomatosis/tuberous sclerosis; CTD: Connective Tissue Disease; OB: Obliterative Bronchiolitis).

D'après ces récentes données, il semble y avoir une augmentation de patients transplantés atteints des pathologies de maladies pulmonaires interstitielles (MPI) et de fibroses pulmonaires (FP). Une autre observation est la diminution progressive du nombre de transplantations pulmonaires dans la population de patients atteints de fibrose kystique, en lien avec l'amélioration des soins et de la survie chez ces patients (48).

1.2.2. Nécessité d'un donneur d'organe

1.2.2.1. Investigations pour l'éligibilité d'un donneur

Un individu devient un donneur potentiel lorsque tous les efforts ont été mis en œuvre pour sa guérison et qu'il n'y a aucune possibilité de survie. Le consentement de la famille est requis. La quantité d'organes disponibles en bons états étant restreinte, de nouvelles procédures sont actuellement en développement telles que la perfusion du poumon *ex-vivo* (EVLP) afin de reconditionner des greffons pulmonaires marginaux. Les poumons marginaux sont définis

comme des greffons provenant de donneurs se présentant avec des critères de sélection élargis tels, par exemple, des infiltrats pulmonaires visibles à l'image radiologique, une valeur de PaO₂ inférieure à 300 mm Hg, la présence de sécrétions purulentes lors de la bronchoscopie. Depuis peu, les GD provenant de donneurs ayant recours à l'aide médicale à mourir (AMM) sont également considérés comme poumons marginaux.

De plus, l'assouplissement des critères de sélection/exclusion est mis en place pour la recherche d'un donneur « acceptable », et non plus « idéal ». Ainsi, un tabagisme actif ou ancien, un âge plus avancé, la présence d'un foyer d'infection d'un microorganisme non-multi-résistant, un historique de cancer en rémission ne constituent plus nécessairement des contre-indications systématiques pour le don d'organe (49).

1.2.2.2. Causes de décès

Les causes de décès les plus fréquentes des donneurs sont les accidents vasculaires cérébraux (AVC), l'anoxie, les traumatismes crâniens et les accidents de la route.

1.2.2.3. Types de dons

Il existe trois types de dons : le don par décès neurologique (DDN) et le don par décès cardiocirculatoire (DDC), comprenant les personnes ayant recours à l'AMM.

Le DDN est défini par une atteinte neurologique grave irréversible nécessitant une ventilation mécanique en absence de respiration spontanée dite primaire, ou secondaire dont l'atteinte neurologique s'est faite suite à une défaillance d'un autre organe (cardiaque, pulmonaire).

Le DDC est défini par une atteinte neurologique grave et irréversible nécessitant des traitements de maintien des fonctions vitales (TMFV), mais qui ne répondent pas aux critères de diagnostic de décès neurologiques.

D'après la « Loi concernant les soins de fin de vie », les personnes ont maintenant le choix d'opter pour l'AMM dans le cadre des soins en fin de vie et leurs organes peuvent être éligibles pour une collecte (si non affectés par la maladie du donneur).

1.2.3. Appariement d'un patient receveur avec un donneur d'organe

Le choix d'un donneur d'organe pour un patient receveur sur la liste d'attente de transplantation pulmonaire, implique la compatibilité immunologique entre eux : soit de groupe sanguin ABO et des Human Leukocyte Antigens (HLA), et celle par rapport au volume des greffons en relation avec la capacité de la cage thoracique du receveur (parité de taille du greffon) (50). Tel que décrit plus bas, une récession du greffon pulmonaire peut toutefois être réalisée pour un ajustement à la cage thoracique du receveur.

La concordance du système sanguin ABO est primordiale dans l'assignation des greffons en transplantation pulmonaire (51). Les greffons de donneurs ayant un groupe sanguin O peuvent être attribués aux receveurs de tous types de groupes sanguins. De même que les greffons de donneur de groupe A peuvent être attribués à des receveurs de groupe A (identique) et de groupe O (compatible). Le groupe Fakhor M. *et al.* (52) a démontré que les receveurs ayant reçu un don pulmonaire de groupe compatible, démontraient un taux de survie semblable aux receveurs ayant été transplantés avec des poumons de groupe identique. Les receveurs de groupe O, restreints à des greffons de groupe O seulement, sont désavantagés dans la distribution des dons. Cela engendre, pour cette population, un délai de transplantation et un taux de mortalité deux fois plus élevé sur la liste d'attente de greffe (51).

Un autre facteur limitant pour l'attribution de greffons, est la compatibilité immunologique des HLA « donneur-receveur ». Il existe 2 classes d'HLA : les HLA de classe I (HLA-A, -B, -C), exprimés sur toutes les cellules nucléées, et les HLA II (HLA-DRB1 et -DQB1). retrouvés sur les cellules présentatrices d'antigènes (Ag) (53). Des dosages d'Ac anti-HLA sont également effectués chez les receveurs pour augmenter la compatibilité donneur-receveur (54). Un patient receveur ayant déjà reçu des transfusions sanguines, d'autres transplantations ou, pour les femmes ayant eu des grossesses antérieures, peut avoir développé des anticorps (Ac) anti-HLA. Si ces Ac anti-HLA sont dirigés vers les HLA exprimés au niveau des GD, cela pourrait déclencher la cascade du complément, une réaction inflammatoire neutrophilique, un dommage de l'endothélium vasculaire, un œdème interstitiel et la formation de thrombi de fibrine dans les greffons au moment de la transplantation, ayant pour conséquence un rejet hyper-aigu (53). Afin d'identifier les GD possédant la meilleure compatibilité possible envers un receveur, un

panel de réactivité aux Ac calculé (PRAc) est effectué. Ce calcul représente le pourcentage des HLA exprimés dans une population en général, contre lesquels un receveur possède des Ac.

Les différents paramètres de compatibilité des greffons pulmonaires des donneurs par rapport aux receveurs, énoncés plus haut, sont importants par la relation des greffons pulmonaires, la mécanistique de la respiration et la capacité de la cage thoracique du patient receveur (55). Cela se fait par estimation de la capacité pulmonaire totale (pTLC). La formule pour évaluer la TLC utilise les données des donneurs et receveurs dont l'âge, le sexe, le poids et la taille (48). Considérant que le nombre de greffons disponibles est très limité et que le nombre de patients inscrits sur liste d'attente ne cesse de croître, il n'est pas toujours possible de respecter la concordance parfaite. Dans certaines pathologies, un ratio 1:1 n'est pas un ratio idéal pour le patient receveur : la pTLC peut être sous-optimale chez les receveurs présentant des pathologies pulmonaires restrictives. Un groupe de Séoul (Corée) a comparé la pTLC et la TLC obtenue par tomодensitométrie (CT Scan) (TLC_{CT}). Leurs résultats ont démontré que la TLC_{CT} s'avérait toujours inférieure à la pTLC, et cette différence se trouvait plus marquée chez les receveurs atteints de pathologies pulmonaires restrictives (56). Finalement, le groupe coréen suggère d'inclure la TLC_{CT} dans le choix des greffons.

1.2.4. Le déroulement de la transplantation pulmonaire

1.2.4.1. Le prélèvement

Lorsque le don de greffons pulmonaires d'un patient donneur est confirmé et qu'un patient receveur est identifié, l'équipe de transplantation pulmonaire se présente en salle d'opération du centre hospitalier où se trouve le patient donneur (centre de prélèvement d'organe, CPO). Après s'être assuré qu'une valeur de la pression partielle d'oxygène/Fraction inspirée d'oxygène (P/F) \geq à 300 mmHg est mesurée, une sternotomie est effectuée chez le donneur et s'ensuit la procédure de prélèvement pulmonaire. Le début du temps d'ischémie froide est initié à partir du moment où il y a clampage aortique et début de la perfusion de la solution froide de pneumoplégie (ou solution de préservation de la qualité des greffons). Une fois prélevés, les greffons pulmonaires sont placés sur glace jusqu'au moment de la transplantation chez le receveur. Toute cette durée représente le temps d'ischémie froide.

1.2.4.2. La conservation

Le rôle de la solution de pneumoplégie, dans la conservation des greffons pulmonaires, est de limiter les effets délétères de l'ischémie froide, son impact lors de la reperfusion chez le patient receveur et le développement de la dysfonction primaire du greffon (DPG) (57). Pour ce faire, cette solution, faible en concentration d'ions potassiques (K^+), est composée de macromolécules exerçant une pression oncotique, minimisant la formation d'œdème interstitiel et préservant l'intégrité épithéliale (58). La conservation sur glace des greffons ($\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$) est choisie car le métabolisme cellulaire est ralenti à cette température, ce qui favorise la viabilité des cellules des greffons en état ischémique (57).

1.2.4.3. La greffe pulmonaire

Pendant ce temps au centre de transplantation, le receveur est amené au bloc opératoire et la chirurgie est débutée. Les greffons seront transplantés un à la fois et le choix d'ordre de transplantation des greffons est pris préalablement à la chirurgie, suite aux résultats obtenus à la scintigraphie pulmonaire ventilation/perfusion (V/Q). En effet, à capacité ventilatoire égale, la décision de transplanter le greffon droit en premier lieu sera prise pour des raisons de meilleure exposition chirurgicale et de stabilité hémodynamique.

Lorsque l'équipe de prélèvement d'organe est arrivée au bloc opératoire du receveur, les greffons sont préparés pour la transplantation. Le temps d'ischémie froide prend fin au moment de la reperfusion des greffons, soit au déclantage des artères pulmonaires chez le receveur. En fin de procédure, avant le départ du patient receveur vers l'unité des soins intensifs, une bronchoscopie est effectuée pour vérifier l'intégrité des anastomoses bronchiques et la présence de sang ou bouchons muqueux et un lavage bronchoalvéolaire (BAL) est réalisé.

L'évaluation du développement d'une DPG chez le patient greffé, se fera à intervalle régulier (toutes les 24H) au cours des prochaines 72 heures suivant la transplantation pulmonaire (2).

1.3. Dysfonction primaire du greffon

1.3.1 Définition de la dysfonction primaire du greffon

Selon l'ISHLT, DPG se définit comme un SDRA se développant à l'intérieur des 72 heures post-transplantation (59). Elle est caractérisée par une hypoxémie accompagnée d'un infiltrat diffus alvéolaire (2). Ce syndrome est la cause de mortalité la plus importante en période péri-, post-opératoire et est associé à un plus haut risque de développement de rejet chronique et de mortalité à long terme (2).

1.3.2. Détermination du grade de DPG

Le grade de DPG est déterminé en fonction de deux paramètres : la valeur du ratio P/F et la présence, ou non, d'œdème alvéolaire observé à partir des images radiologiques pulmonaires.

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

Grade	Pulmonary edema on chest X-ray	Pao ₂ /Fio ₂ ratio
PGD grade 0	No	Any
PGD grade 1	Yes	> 300
PGD grade 2	Yes	200 to 300
PGD grade 3	Yes	< 200

Grade severity notes: Patients with no evidence of pulmonary edema on chest X-ray are considered grade 0. Absence of invasive mechanical ventilation should be graded according to the Pao₂/Fio₂ ratio, using methods similar to those receiving mechanical ventilation.
Fio₂, fraction of inspired oxygen; Pao₂, partial pressure of arterial oxygen; PGD, primary graft dysfunction.

Tableau III: Tableau explicatif de la détermination du grade de DPG suite à une transplantation pulmonaire.

(PaO₂ : Pression partielle artérielle d'oxygène; FiO₂ : Fraction inspirée d'oxygène; PGD : Primary Graft Dysfunction).
(Snell *et al.*, 2017)

Dans la littérature, un ratio P/F supérieur à 300 mmHg, avec (Grade 1), ou sans (Grade 0), présence d'opacité diffuse (due à l'infiltration de liquide d'œdème) observée à l'image radiologique est considéré comme une absence de DPG (dit non-DPG), aucune différence n'étant constatée dans le taux de mortalité entre ces deux grades (47). De plus, une absence totale d'opacités diffuses aux rayons X pulmonaire attribue un grade DPG 0 quelle que soit la valeur du ratio P/F. En revanche, la présence d'œdème pulmonaire associée à un ratio P/F inférieur à 300 mmHg est attribué au grade DPG de sévérité 2 (ratio P/F entre 200 et 300 mmHg)

ou 3 (ratio P/F inférieur à 200 mmHg). Ce ratio est évalué à trois temps post-transplantation : 24, 48 et 72H post-transplantation. Si lors de l'une de ces évaluations, avec la présence d'œdème pulmonaire visualisée, ce ratio est inférieur à 300 mmHg, alors, ce sera un cas de DPG.

1.3.3 DPG et survie post-transplantation

Comme énoncé dans le chapitre 2, il est maintenant clairement reconnu que la DPG constitue la première cause de mortalité et morbidité dans la période péri-opératoire. En effet, des études réalisées au CHUM indiquent que les patients transplantés entre 1997 et 2011 ayant développé une DPG (grade 2 et 3) avaient un taux de survie post-transplantation amoindrie, comparé aux greffés n'ayant pas développé de DPG (Fig. 17). Par exemple, 10 ans post-transplantation, le taux de survie est inférieur à 50% pour les receveurs DPG alors qu'il demeure à 65-70% pour les receveurs non-DPG.

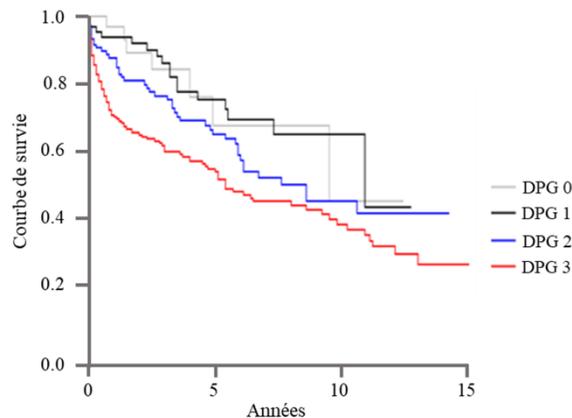


Figure 17: Courbe de survie des receveurs greffés pulmonaires au CHUM au cours de la période 1997 à 2011.

Ces données ont été collectées à partir de 385 patients transplantés au CHUM, seul centre de transplantation pulmonaire du Québec. Les grades DPG (PGD, primary graft dysfunction) 0 et 1 sont attribués à des patients ne développant pas de DPG (non-DPG, DPG⁻) et les grades 2 et 3 à des patients développant une DPG (DPG, DPG⁺).

1.3.4. Autres impacts de la DPG

Comme il a été mentionné auparavant, ce syndrome est associé à un plus haut taux de mortalité en période péri-opératoire et à long terme. Il est aussi caractérisé par à un temps de ventilation

mécanique et d'hospitalisation aux soins intensifs plus long, à un développement de sepsis et de pneumonie plus élevé, et à une hausse du risque de développement de bronchiolite oblitérante (BOS) (60). La DPG est également associée à une réaction inflammatoire majeure, causant un dommage direct aux greffons. La DPG peut également se manifester lors d'une présence d'auto-immunisation chez le receveur. La présence d'Ac, chez le patient receveur, reconnaissant les Ag collagène type V et/ou K- α tubulin présents dans le tissu des greffons, peut provoquer un rejet hyper-aigu. De plus, une auto-immunité présente chez le patient receveur pourrait favoriser un rejet chronique. Ces deux types de rejet pourraient se manifester par le développement d'une DPG (61).

1.3.5. Associations entre DPG et SDRA

La DPG présente les caractéristiques majeures retrouvées dans le SDRA (Fig. 18).

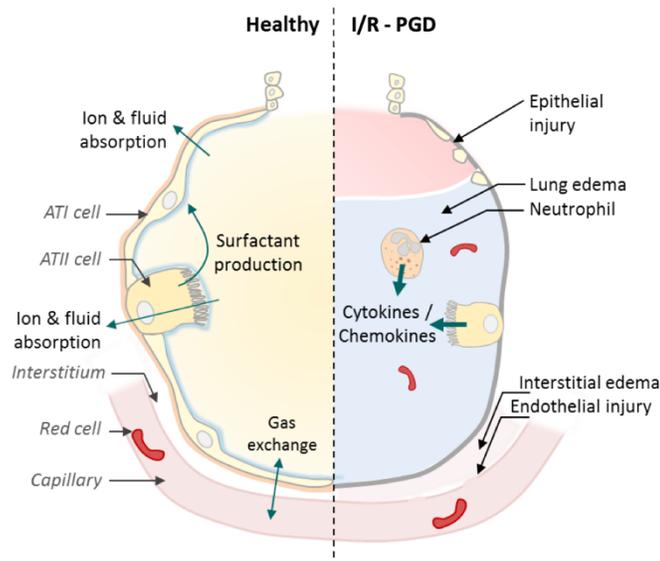


Figure 18: Structure d'une alvéole saine et en condition pathologique retrouvée lors d'une DPG.

Schématisation des différences entre les cellules et composantes retrouvées au niveau alvéolaire en condition physiologique (gauche) et en DPG/SDRA (droite) : lésions de l'épithélium alvéolaire et de l'endothélium, formation d'un œdème riche en protéines, neutrophiles recrutés au niveau des alvéoles, sécrétion par les macrophages, neutrophiles et cellules structurales de cytokines/chemokines. (Modifié d'après Ware et Matthay *et al.*, 2000)

Tout comme retrouvé dans le SDRA, des dommages endothéliaux (au niveau des capillaires) et épithéliaux sont notés et un œdème pulmonaire de perméabilité est observé. Un

environnement de stress oxydatif et pro-inflammatoire exacerbé est également noté avec la présence d'une infiltration de cellules inflammatoires et d'un niveau élevé de cytokines et chemokines.

Les altérations retrouvées au niveau alvéolaire dans la DPG seraient essentiellement une résultante causée par des lésions induites par l'ischémie / reperfusion (décrite ci-dessous). (62).

1.4. L'ischémie et reperfusion

1.4.1. Définitions de l'ischémie

L'ischémie se définit par une baisse ou un arrêt de l'irrigation d'un tissu, engendrant un déclin ou une absence d'apport d'oxygène au niveau cellulaire, créant un environnement hypoxique. Une ischémie peut être dite froide ou chaude.

L'ischémie est dite froide (I) lorsqu'un tissu est conservé dans un liquide froid, soit une solution de pneumoplégie lors d'un prélèvement pulmonaire d'un donneur par le type de don DDN. L'ischémie froide est une stratégie utilisée afin de limiter les effets délétères de l'ischémie par l'action du froid, ralentissant ainsi le métabolisme cellulaire (31). Il est à noter que les poumons ne manquent pas d'apport en oxygène, les alvéoles étant en contact avec de l'oxygène dans la période d'ischémie (63).

L'ischémie chaude peut être associée au type de don DDC, incluant les dons suite à l'AMM. Contrairement au DDN, le DDC comporte une durée d'ischémie chaude observée entre le moment de l'arrêt des traitements de maintien des fonctions vitales (TMFV) chez le patient donneur et le début de la perfusion de la solution de pneumoplégie froide lors du prélèvement des greffons (64).

Il est à souligner qu'un temps d'ischémie « tiède » pourrait être considéré lors des transplantations pulmonaires : celui-ci se définirait comme la période où le greffon est retiré de

son environnement froid jusqu'au moment du déclampage de l'artère pulmonaire correspondant à la période de reperfusion.

1.4.2. Définition de la reperfusion

La reperfusion (R) marque la fin de la période d'ischémie, donc la réintroduction d'oxygène (réoxygénation) dans les tissus pulmonaires donneur par la circulation sanguine du patient receveur (65).

1.4.3. Mécanismes enclenchés par l'I/R

L'hypothermie, l'ischémie, l'hypoxie et, par la suite, la reperfusion, déclenchent des processus néfastes pour les greffons incluant la production d'espèces oxydatives réactives, la libération de molécules inflammatoires, un stress métabolique, une surcharge calcique, pouvant conduire à divers phénomènes, incluant l'induction d'apoptose/ mort cellulaire, des dommages tissulaires ou par exemple une régulation à la baisse de protéines (ENaC, Na⁺/K⁺-ATPase) impliquées dans l'homéostasie ionique et liquidienne.

Éléments de physiopathologie de l'ischémie-reperfusion en transplantation pulmonaire	
Conséquences de l'ischémie froide et de l'hypoxie	Conséquences de la reperfusion
Glycolyse anaérobie et acidose lactique	Production d'espèces oxygénées réactives responsables de lésions cellulaires et de l'ouverture du PTPm
Décroissance en ATP	Apoptose par ouverture du PTPm
Inactivation de la pompe à sodium avec accumulation de calcium intracellulaire qui potentialise la production d'espèces oxygénées réactives	Libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que : IL-1 β , IL-6, TNF- α et RAGE
Surcharge en calcium intracellulaire qui favorise l'ouverture du PTPm	Activation du système du complément
Accumulation d'hypoxanthine et de NADPH à l'origine du stress oxydatif	
Production d'oxyde nitrique par les eNOS dont la production est favorisée par la NADPH oxydase	

ATP : adénosine triphosphate ; IL : interleukine ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; eNOS : endothelial nitric oxide synthase ; PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondriale ; RAGE : receptor for advanced glucose end-products ; TNF : tumor necrosis factor.

Tableau IV: Tableau illustrant les différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie froide/hypoxie et la reperfusion en transplantation pulmonaire. (Gennai *et al.*, 2014)

1.4.3.1. Le stress oxydatif et apoptose

Le stress oxydatif se détermine par la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), molécules très instables, telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical

hydroxyle. Ils interagissent avec les molécules environnantes, souvent des lipides dont sont composées les membranes plasmiques, pouvant créer des pores dans celles-ci et même leur lyse et ainsi conduire à la mort cellulaire (31).

L'action du stress oxydatif, au niveau du parenchyme pulmonaire, est provoquée par deux mécanismes : le 1^{er} mécanisme est l'hypoxie/anoxie où une baisse d'ATP, source d'énergie cellulaire, est observée. Son produit de dégradation, l'hypoxanthine, est la molécule de base pour la formation de toutes les ROS produites lors de la reperfusion/ventilation mécanique des greffons. Un environnement hypoxique favorise aussi la production de monoxyde d'azote (NO) au niveau de l'endothélium vasculaire et crée une vasoconstriction de cet endothélium pouvant interférer avec la perfusion adéquate de la solution de pneumoplogie (65).

Le 2^{ème} mécanisme, associé à l'étape d'ischémie, est relié à la production de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) qui, sous l'action de la NADPH oxydase, favorise les ROS (Fig. 19). Ce phénomène survient majoritairement au niveau des cellules endothéliales, des neutrophiles et des monocytes/macrophages.

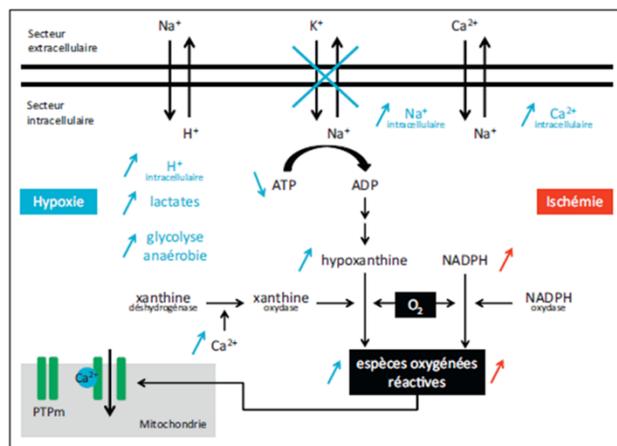


Figure 19: Formation d'espèces oxygénées réactives au cours de l'ischémie-reperfusion pulmonaire. (Gennai *et al.*, 2014)

Au moment de la réoxygénation des greffons lors de la reperfusion, la production de ROS est favorisée par une forte concentration d'hypoxanthine et de NADPH présents dans les tissus pulmonaires suite à l'ischémie froide et en condition hypoxique, contribuant ainsi à une augmentation du stress oxydatif dans ceux-ci.

La présence d'une forte concentration d'ions calciques intracellulaires peut provoquer des dommages en favorisant la formation de ROS et en permettant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm). Ce pore, en condition normale, est fermé et est imperméable à une vaste majorité d'ions et de métabolites. En présence de stress oxydatif, le PTPm s'ouvre, la matrice mitochondriale se gonfle par la pression osmotique exercée par les protéines contenues à l'intérieur de cette matrice, ayant pour résultat une rupture de la paroi externe de la mitochondrie et la libération de molécules pro-apoptotiques. L'induction apoptotique suivant la reperfusion est modulée par 2 voies : la voie intrinsèque est enclenchée par la mitochondrie et le PTPm par la présence de ROS et d'une concentration élevée de calcium intracellulaire. L'activation de cette voie se fait précocement. La voie extrinsèque implique des récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands. Celle-ci se manifeste plus tard, parfois plusieurs heures après la reperfusion des greffons.

1.4.3.2. Le défaut de la pompe Na^+/K^+ -ATPase

Une autre conséquence de l'ischémie froide est la dysfonction de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, créant une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions Na^+ , favorisant ainsi la présence d'un « œdème cellulaire » (31).

La surcharge calcique intracellulaire est liée à la dysfonction de la pompe et à l'hypothermie qui provoque la libération le calcium de ses compartiments à l'intérieur des cellules.

1.4.3.3. La réponse immunitaire et inflammatoire exacerbée

La relâche de cytokines pro-inflammatoires est aussi augmentée en I/R. En transplantation pulmonaire, des cytokines pro- et anti-inflammatoires, telles que $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, interleukine (IL)-8, IL-10, IL-12 et IL-18, sécrétées. L'IL-8 est celle dont la concentration est la plus élevée au moment de la reperfusion et corrèle avec un développement de la DPG (63).

Les macrophages alvéolaires sécrètent le $\text{TNF-}\alpha$ et IL-8, stimulant et amplifiant la réponse endothéliale et épithéliale suite à une hypoxie et réoxygénation (49).

Les macrophages alvéolaires peuvent occasionner la migration des neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire par la sécrétion de chimiokines (IL-8, epithelial cell-derived neutrophil activating protein).

De plus, la présence de phospholipase A₂ a été détectée dans plusieurs réactions inflammatoires dont l'I/R. Elle stimule entre autres l'expression de Platelet-activating factor, qui joue un rôle primordial dans l'initiation de lésions pulmonaires. Il est sécrété par plusieurs cellules : les macrophages, les neutrophiles, les plaquettes, les cellules endothéliales et les mastocytes. Le Platelet-activating factor active son récepteur ayant pour effet d'activer les leucocytes, l'agrégation plaquettaire, la sécrétion de cytokines et l'expression de molécules d'adhérence de surface (63).

L'activation leucocytaire se ferait en deux étapes : une 1^{ère} étape s'effectuerait rapidement au début de la reperfusion, les macrophages, issus des GD, seraient impliqués à ce moment. La 2^e étape, environ 24 heures suivant la reperfusion, inclurait les neutrophiles et les lymphocytes associés au patient receveur. Les macrophages alvéolaires présents dans les GD peuvent produire de grandes quantités de molécules pro-coagulantes et un large éventail de cytokines (66).

L'I/R favorise l'expression des molécules de surface des cellules endothéliales pulmonaires auxquelles s'accrochent les neutrophiles favorisant leur présence dans le tissu pulmonaire (63).

L'activation du complément est aussi une conséquence de l'I/R. Elle joue un rôle primordial de médiateur de dommages au niveau des greffons, de rejet humoral et de rejet chronique (67).

1.4.3.4. L'hypoxie/anoxie

L'hypoxie enclenche un état pro-coagulant au niveau de l'endothélium et dans la population de macrophages. Dans un modèle où les souris étaient placées dans un environnement hypoxique, l'activité fibrinolytique intrinsèque était supprimée suite à l'augmentation de sécrétion de facteurs inhibiteurs de cette voie par les macrophages (63). Lors de l'ischémie froide, les poumons sont les seuls organes à bénéficier de la respiration en mode aérobie. Si l'hypoxie subsiste au cours du temps, ils vont perdre cette capacité (68).

1.4.3.5. Dommages sur l'endothélium : la cessation du flot sanguin

La cessation du flot sanguin lors de la période d'ischémie froide, enclenche des voies de signalisation cellulaire au niveau de l'endothélium pulmonaire provoquant une cascade de

signaux nommée la « méchanotransduction » (65). L'arrêt du flot intravasculaire est ressenti par des « méchanosomes ». L'activation de ceux-ci déclenche une dépolarisation des cellules endothéliales provoquant la formation de ROS par l'action de la NADPH oxydase. Cette dépolarisation induit aussi une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire se traduisant par la formation de NO. Lorsque ces phénomènes sont présents en transplantation pulmonaire, cela peut mener à un stress oxydatif, qui en premier lieu, déclenche une réponse inflammatoire et une mort des cellules endothéliales dans les GD (65). Il a été observé *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin, qu'en absence de force de cisaillement, la production de ROS pouvait aussi activer l'expression des facteurs de transcription, tels HIF-1 α , NF κ B, stimulant la prolifération cellulaire et la formation de néo-vaisseaux (61).

1.4.3.6. Dommages sur l'épithélium alvéolaire

Les dommages observés au niveau de l'épithélium alvéolaire ont pour conséquences, entre autres, l'inactivation de la production du surfactant ou une production de surfactant moins importante chez les transplantés pulmonaires (69).

Une dysfonction de la production et de l'efficacité du surfactant des cellules ATII impliquera une réduction dans la compliance statique et dynamique pulmonaire. Cette baisse de surfactant pourrait aussi être associée à une libération de Phospholipase A₂, une enzyme de dégradation de surfactant relâchée par les macrophages en mort cellulaire (65). En revanche, les cellules ATI sont plus résistantes à l'inflammation et leurs fonctions demeurent intactes, même en présence d'un dommage pulmonaire sévère (65).

De plus, l'I/R altère la capacité de l'épithélium alvéolaire de résorber un œdème contenu dans les alvéoles. En effet, le groupe Sugita *et al.* a utilisé un modèle animal d'ischémie froide et de transplantation pulmonaire unilatérale, afin de comparer le greffon pulmonaire et le poumon *in situ*. Ils ont démontré une réduction nettement significative de la clairance liquidienne alvéolaire dans le poumon greffé par rapport au poumon natif. De plus, leurs résultats illustrent une baisse d'expression de l'ARNm du canal sodique ENaC, qui joue un rôle prépondérant dans la résolution d'œdème pulmonaire, tel que discuté dans la section 1.1.3.3.1.2. (26).

Le rôle délétère de l'I/R a amené à définir des limites de temps d'ischémie froide afin de protéger la qualité des greffons. Ainsi, un temps de 6h (46) constitue désormais la limite

acceptée avant la transplantation d'un greffon. Toutefois, l'impact de temps d'ischémie plus court sur l'intégrité et la fonctionnalité des GD, et ensuite sur le développement de la DPG chez les receveurs, n'est pas clairement défini.

Plusieurs biomarqueurs de l'immunité innée, d'inflammation ou de dommage tissulaire, associés avec la DPG, l'I/R ou une mortalité accrue post-transplantation, ont été identifiés chez les donneurs et receveurs (49). En effet, des études récentes indiquent que des facteurs phénotypiques des donneurs, en plus des facteurs de risques liés au receveur ou aux procédures péri-opératives, peuvent contribuer au développement d'une DPG (70). Ainsi, de plus amples recherches sont nécessaires pour mieux expliquer les causes de la DPG, et tenter de les prévenir ou de les contrer. En effet, aucun traitement pharmacologique n'est actuellement disponible pour traiter la DPG et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc essentielle.

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Basé sur nos travaux et les données de la littérature, nous avons posé l'hypothèse que l'altération de l'épithélium alvéolaire du greffon donneur, induite par l'ischémie/reperfusion, joue un rôle majeur dans le développement de la dysfonction primaire du greffon chez le patient receveur suite à une transplantation pulmonaire.

2.1. Notre premier objectif a été d'étudier l'intégrité et la fonctionnalité de l'épithélium alvéolaire par l'analyse des marqueurs d'intégrité (ZO-1), de dommage tissulaire et de fonctionnalité alvéolaire (canaux ENaC, CFTR et KvLQT1), qui sont des cibles potentielles dans le développement de la DPG.

L'objectif général de ce projet alliant des composantes cellulaires, *ex vivo* chez l'animal et translationnel chez l'humain, était donc de démontrer l'importance de ces cibles dans la dysfonction alvéolaire associée à l'ischémie-reperfusion et la sévérité de la DPG.

2.2. Notre deuxième objectif était d'étudier la relation potentielle entre les facteurs phénotypiques du donneur, associés avec des marqueurs de dysfonction/dommage alvéolaire présents dans le greffon donneur, et le développement, ou non, de la DPG chez les patients receveurs.

Afin de réaliser ces 2 objectifs principaux nous avons entrepris trois sous-études, utilisant 1) un modèle cellulaire, soit des ATII de poumons de rat, soumises à un protocole mimant l'ischémie froide suivie d'une étape de reperfusion chaude,

2) des modèles de transplantation et d'inflammation chez le gros animal

3) des analyses des données des donneurs et receveurs, ainsi que des échantillons (biopsie de parenchyme et lavages bronchoalvéolaires) prélevés chez les patients dans le cadre des transplantations au CHUM.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Approbation éthique et collecte des échantillons animaux

L'autorisation du Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA), en accord avec les normes du Conseil canadien de la protection des animaux (CCPA) a été obtenue pour l'ensemble des procédures (décrites ci-dessous) effectuées sur les animaux dans le cadre de ce projet de recherche.

3.2. Collecte des poumons de rat, isolation et culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires de type II (ATII)

L'isolation des cellules ATII est faite à partir de poumons de rats mâles Sprague-Dawley ayant un poids entre 175 et 200 g, selon un protocole décrit dans la littérature (71) adapté de (72). En résumé, les animaux ont été anesthésiés avec du pentobarbital (65 mg/kg). La cage thoracique a été ouverte puis une trachéostomie a été pratiquée et une aiguille 18G y a été insérée. Les animaux ont ensuite été exsanguinés en sectionnant la veine cave inférieure et l'aorte abdominale. Afin que le lit vasculaire des poumons soit le plus possible exempt de globules rouges et de macrophages, une canule a été insérée dans l'artère pulmonaire (AP) pour perfusion. Par la suite, le bloc cœur-poumons a été prélevé et les voies aériennes des poumons rincées 10 fois avec une solution physiologique. Une solution d'élastase (4 UI/ml) (Worthington Biochemical Corporation, New-Jersey, États-Unis (É-U)) a ensuite été injectée en intratrachéal et les poumons incubés dans une solution sodium-glucose-gentamycine-septra (SGGS) à 37 ° Celsius (C), permettant un début de digestion des tissus pulmonaires. Le cœur a alors été détaché des poumons, puis 12 UI/ml de DNase (ROCHE, Ont., Canada) ont été ajoutés à la solution SGGS, avant de cisailer les poumons finement pendant 4 minutes (min). Après le découpage, 5 ml de FBS ont été ajoutés pour stopper la digestion des tissus. La suspension cellulaire hétérogène a alors été filtrée au travers d'une succession de gazes puis de filtres de porosités décroissantes (compresse non-tissées, filtres de nylon 150 µm et 30 µm). Ensuite, la solution filtrée a été centrifugée et le culot cellulaire a été resuspendu dans le milieu Minimal

Essential Medium (MEM) (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, É-U). Une technique d'adhérence (73) a ensuite été utilisée pour éliminer les macrophages résiduels. Brièvement, la suspension cellulaire a été déposée dans des boîtes de pétri p100 (de bactériologie) placées dans un incubateur à 37 °C en présence de 5% de dioxyde de carbone (CO₂) pendant 1 heure (H). Tandis que les macrophages alvéolaires, présents dans la suspension cellulaire, adhèrent rapidement à la surface de plastique des pétris, les cellules épithéliales alvéolaires en suspension peuvent être récoltées dans le surnageant. Comme précédemment décrit par le laboratoire, cette technique d'isolation permet d'obtenir une culture cellulaire composée de >80% de cellules ATII (24). La suspension de cellules non adhérentes a ensuite été centrifugée et le culot cellulaire resuspendu dans un milieu MEM additionné de 10% FBS, de Septra (association de deux antibiotiques : triméthoprime 3µg/ml et sulfaméthoxazole 17 µg/ml) et de gentamycine (80 µg/ml). Un décompte cellulaire a été réalisé en présence de bleu de Trypan afin de ne compter que les cellules vivantes. Les cellules ATII ont alors étéensemencées et incubées à 37 °C avec 5% CO₂ pendant 3 jours afin d'obtenir une confluence. Les types de support choisis pour la mise en culture, soit des boîtes de pétris 35 mm de diamètre (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Allemagne), des filtres Transwell® 4,67cm² (8,6 x 10⁵ cellules/cm², Costar, Maine, É-U) et des labteks (1,4 x 10⁶ cellules/puits, Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Allemagne), dépendent des expérimentations réalisées (voir descriptions aux sections suivantes).

3.3. Collecte d'échantillons de parenchyme pulmonaire de porcs

3.3.1. Modèle de transplantation pulmonaire unilatérale chez le porc

La technique de transplantation unilatérale chez les porcs mâles de race hybride Yorkshire, pesant 55-65 kg (Ferme TRIPORC, Ste-Élizabeth, QC) a été réalisée selon un protocole décrit par (74). Un schéma résumant les différentes étapes et les prélèvements collectés est présenté à la Figure 20A. En bref, suite à l'anesthésie et l'intubation du porc « Donneur », une sternotomie a été faite et une 1^{ère} biopsie du parenchyme du poumon droit a été collectée (PD Donneur). L'aorte et l'AP ont été identifiées et une canule de perfusion a été installée dans l'AP. La

perfusion d'une solution de pneumoplogie (Perfadex, XVIVO Perfusion, Gothenburg, Suède) par voie antérograde, a été débutée suite au clampage de l'aorte et à l'ouverture des appendices auriculaires. Les poumons ont ensuite été prélevés et mis sur glace pour une période de 2 H, constituant la phase définie de « temps d'ischémie froide » (I).

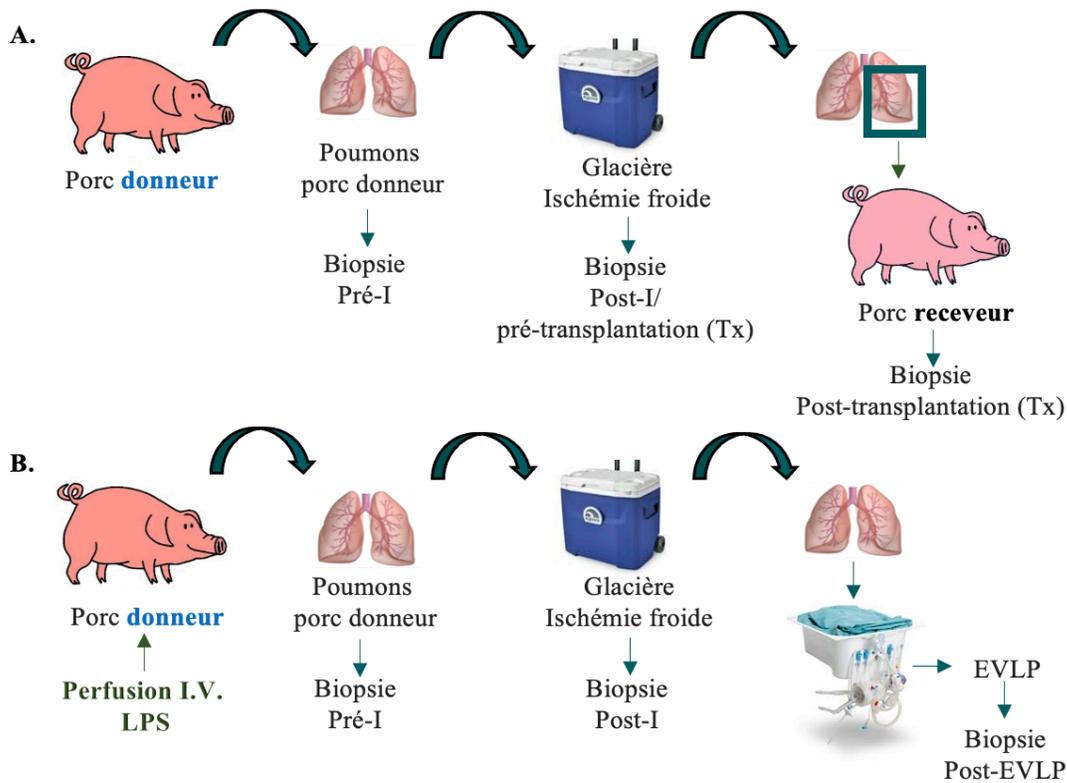


Figure 20: Design expérimental du modèle animal *in vivo*.

À partir d'un modèle de transplantation pulmonaire chez le porc, une 1^{ère} biopsie a été récupérée précédant le prélèvement pulmonaire chez un animal donneur (Pré-I). Les poumons furent placés dans une glacière à 4 °C pendant 2 heures (I). Par la suite, le greffon donneur a été isolé et une 2^e biopsie a été prélevée (Post-I), suivi d'une transplantation pulmonaire unilatérale chez un animal receveur (Tx). Une 3^e biopsie a été prélevée 48 heures suivant la greffe chez le porc receveur (Post-Tx) (A). Dans un modèle d'infection/inflammation, une perfusion de lipopolysaccharides (LPS), protéine bactérienne pro-inflammatoire, a été administrée chez le porc pour une durée de 1 heure, suivi d'une période d'observation de 90 minutes. Tout comme dans la partie A, une 1^{ère} biopsie a été recueillie en Pré-I. Ensuite, les greffons ont subi une période d'I de 2 heures et une 2^e biopsie a été prise en Post-I puis un reconditionnement et une évaluation des greffons ont été effectués à l'aide de la technologie de perfusion *ex-vivo* du poumon (EVLP) pour une période de 4 heures. Finalement, une 3^e biopsie a été prélevée post--EVLP (B).

Pendant ce temps, l'animal « Receveur » a été préparé, comme décrit ci-haut, pour une pneumonectomie gauche par approche de thoracotomie gauche. Durant ce temps, une fois la période d'ischémie froide terminée, le poumon gauche a été isolé et une 2^e biopsie a été prélevée

(PG pré-greffe). Ensuite le poumon a été pesé et préparé pour la transplantation unilatérale gauche. Le greffon a été transplanté dans l'animal « Receveur » en anastomosant la bronche souche, l'artère pulmonaire et l'îlot des veines pulmonaires gauches, après l'élimination d'air dans le réseau vasculaire : cette étape correspond à la phase reperfusion (R). Les paramètres hémodynamiques et ventilatoires de l'animal ont été surveillés pendant 1 H post-reperfusion du greffon et des analyses sanguines d'équilibre acido-basique effectuées (EPOC, Siemens, Oakville, Ont.) à toutes les 30 min. Par la suite, le thorax a été refermé et une radiographie pulmonaire a été réalisée. L'animal a été extubé lorsque jugé sécuritaire et surveillé pendant 48 H. Au 2^e jour post-transplantation, l'animal « Receveur » a été anesthésié, réintubé et une seconde radiographie pulmonaire a été exécutée. Une sternotomie médiane a été faite, les paramètres hémodynamiques et ventilatoires surveillés et une évaluation de la fonction du greffon a été réalisée. Les poumons ont ensuite été prélevés comme décrit ci-dessus. Une 3^e biopsie au niveau du greffon (PG post-Tx) a finalement été prise suite au prélèvement pulmonaire.

3.3.2. Modèle d'infection-inflammation, suivi de perfusion *ex-vivo* (EVLV), chez le porc

Afin de mimer un état infectieux et inflammatoire chez le porc, un protocole de perfusion de lipopolysaccharides (LPS) a été utilisé. Les animaux ont été séparés de façon aléatoire en deux groupes expérimentaux : un 1^{er} groupe contrôle (CTRL) et un 2^e LPS, celui-ci ayant reçu une perfusion de LPS à une concentration de 20µg/ml (*Escherichia coli*; sérotype O111: B4, Sigma, Saint Louis, MO, USA) (voir schéma décrivant le modèle à la Fig. 20B). Ce traitement a été infusé par voie intraveineuse durant une période de 60 min. L'état hémodynamique des porcs et les paramètres ventilatoires ont été surveillés et ajustés pour une durée de 90 min et des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 30 min. À partir de ce moment, les groupes CTRL et LPS ont subi les mêmes procédures : une sternotomie a été effectuée, une 1^{ère} biopsie a été prise (Pré-ischémie) et s'en est suivi le prélèvement pulmonaire comme cité plus haut.

Durant cette étape, une collecte du sang de l'animal a été effectuée et celui-ci a été traité à l'aide d'un autotransfuseur (C.A.T.S., Fresenius HemoCare GmbH, Bad Homburg, Allemagne) afin d'obtenir une solution de globules rouges lavés. Les greffons pulmonaires ont alors été placés dans une glacière pour une période d'I de 2 H. Ensuite, les poumons ont été retirés de la glacière et une 2^e biopsie a été prélevée (Post-I / Pré-EVLP). Par la suite, ils ont été préparés, pesés et placés dans l'appareil Vivoline LS1 (Vivoline Medical AB, Lund, Suède) pour la procédure de perfusion *ex-vivo* du poumon (EVLP) selon le protocole de Lund (75) pour une durée de 4H. En résumé, les poumons ont été perfusés avec une solution à pression oncotique élevée, pour minimiser l'œdème, avec l'ajout de globules rouges lavés pour favoriser l'oxygénation du tissu pulmonaire. Lorsque la température du perfusât s'écoulant des veines pulmonaires a atteint les 32 °C, la ventilation des poumons a été débutée. La fonction des poumons a été évaluée lorsque la normothermie et le débit cardiaque cible ont été atteints. Des prélèvements de perfusât ont été exécutés toutes les 30 min. durant la procédure. À la fin du protocole, les poumons ont été retirés du bassin, pesés de nouveau et une 3^e biopsie a été prise (Post-EVLP).

3.4 Collecte d'échantillons humains lors des transplantations pulmonaires

3.4.1. Approbation du Comité d'éthique de la recherche (CER) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

La collecte d'échantillons de parenchyme pulmonaire et de lavage bronchoalvéolaire (BAL) effectuée au cours des transplantations pulmonaires au CHUM ainsi que la collecte des données des patients, a été approuvée par le CER du CHUM, après avoir obtenu le consentement écrit des patients en attente de greffe (Protocole de recherche CER 08.063). Ces échantillons sont conservés dans la Biobanque de tissus respiratoires du Centre de recherche du CHUM (CRCHUM), dirigée par la Dre Emmanuelle Brochiero.

3.4.2 Bases de données

Afin d'obtenir les informations cliniques des patients donateurs et receveurs nécessaires à la réalisation de ce projet, deux bases de données ont été consultées : Transplant 7 et Oacis (pour

Open Architecture Clinical Information System) (Fig. 21). Il est à noter que seules les données des patients ayant signé un consentement et celles de leur donneur associé, ont été relevées.

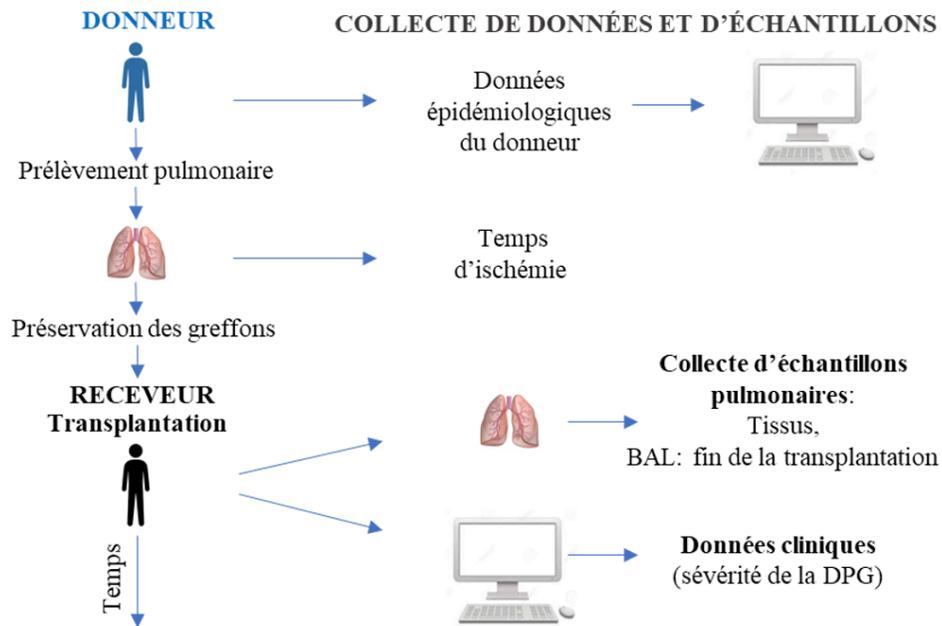


Figure 21: Schématisation du design expérimental et de la collecte des données et échantillons dans le volet de recherche translationnelle chez l'humain.

La récolte d'informations cliniques des patients donneurs a été faite à partir de bases de données utilisées au CHUM. Suite aux prélèvements pulmonaires, les greffons ont été mis sur glace jusqu'au moment de la transplantation chez les patients receveurs (temps d'ischémie). Au moment des transplantations, lorsqu'une disparité entre la grandeur des greffons et la capacité thoracique des receveurs était présente, il y a eu collecte de tissus de greffons donneur (pneumoréduction). Des lavages bronchoalvéolaires (BAL) ont été récoltés en postopératoire immédiat. Durant les 72 heures suivant les transplantations, les données cliniques des receveurs ont été recueillies pour déterminer le grade de dysfonction primaire du greffon (DPG).

3.4.2.1 Transplant 7

Cette base de données, mise sur pied par l'équipe du programme de transplantation du CHUM, inclut des informations à propos du profil clinique du donneur (cause du décès, centre hospitalier où a eu lieu le prélèvement d'organe, type de don, statut tabagique, résultats d'analyses de laboratoire), de la pathologie du receveur et des caractéristiques de la transplantation elle-même (date de la chirurgie, type de chirurgie, temps d'ischémie). De façon à ce que le donneur ne puisse être identifié, celui-ci reçoit un numéro d'identification unique (anonyme) du donneur (QTX) attribué par Transplant Québec, organisme responsable de la

coordination du processus de dons d'organes et leur distribution dans les centres de transplantation.

3.4.2.2 Oacis

Le système d'informations cliniques informatisé utilisé par le CHUM, Oacis, a été consulté pour la cueillette de données reliées aux patients receveurs, tels que les résultats d'analyses sanguines, de fonction respiratoire, d'imagerie médicale et d'histopathologie. Cette base de données nous a également permis d'avoir accès aux notes médicales lors des rendez-vous cliniques, de l'hospitalisation des patients avant, pendant et après la greffe, ainsi que pour le suivi post-transplantation pulmonaire.

3.4.3 Collecte d'échantillons humains lors des transplantations pulmonaires

Des membres de l'équipe de transplantation pulmonaire se sont rendus au site d'hospitalisation du donneur pour effectuer le prélèvement pulmonaire. Une 1^{ère} étape a consisté à évaluer la qualité des poumons par une analyse de gaz sanguin suite à un recrutement alvéolaire à une fraction inspirée d'O₂ réglée à 100% (FiO₂). Après confirmation de la qualité adéquate des poumons (ratio PaO₂/FiO₂ ≥ 300mmHg), le prélèvement pulmonaire a débuté. Cette procédure est semblable à celle décrite précédemment dans le modèle animal avec l'ajout d'une perfusion de Perfadex par voie rétrograde pour l'élimination de thrombi dans les vaisseaux pulmonaires. Le bloc « trachée- poumons » a été prélevé suite à une manœuvre de recrutement alvéolaire suivi d'un clampage de la trachée à l'aide d'une agrafeuse GIA 60mm (Johnson&Johnson, Guelph, Ont.) et mis sur glace jusqu'au moment de la transplantation. Le temps de l'I a été noté à partir de l'heure du début de la perfusion de la pneumoplogie.

Une fois rendu dans la salle d'opération, les greffons ont été préparés pour la greffe et, lorsque la taille des greffons était supérieure à la capacité de la cage thoracique du receveur, ils ont été réduits (pneumoréduction) (Fig. 22). Ainsi, dans certains cas, une partie du parenchyme a pu être collectée et mise en banque (biobanque de tissus respiratoires du CRCHUM dirigée par la Dre Emmanuelle Brochiero), pour utilisation ultérieure dans le cadre de ce projet. Ensuite, les greffons pulmonaires ont été transplantés, un à la fois, avec la séquence d'anastomoses décrite plus haut, soit une anastomose bronchique, puis artérielle et enfin veineuse, après avoir chassé

l'air présent dans les vaisseaux. Les périodes d'I de chaque greffon ont pris fin lors du déclampage des artères pulmonaires, tandis que les greffons ont été perfusés par la circulation sanguine du patient receveur, marquant le début de la période R. Avant le départ du patient vers les soins intensifs, une bronchoscopie a été réalisée pour vérifier l'intégrité des anastomoses bronchiques.

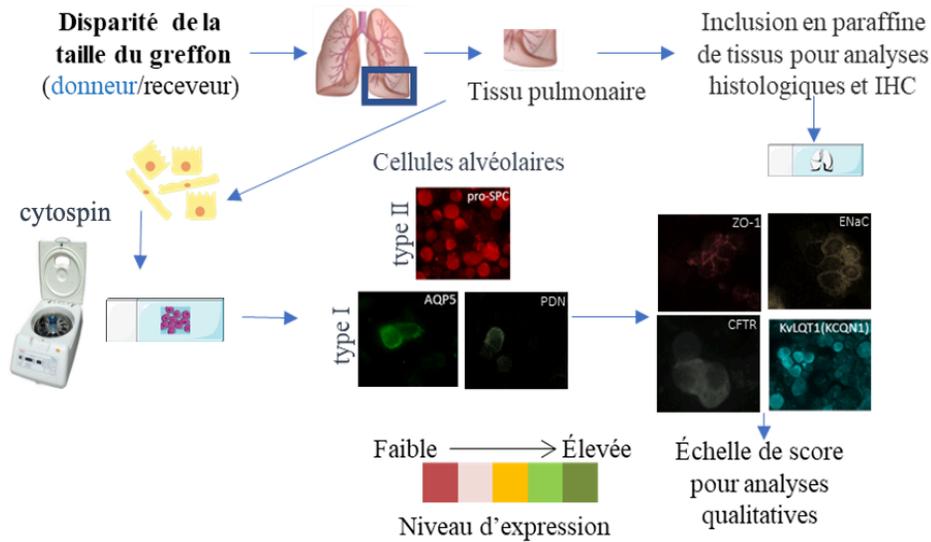


Figure 22: Design expérimental pour analyses qualitatives d'expression de protéines d'intégrité et de fonctionnalité des ATII à partir d'échantillons de parenchymes de greffons pulmonaires et l'élaboration d'une échelle de score d'expression de ces protéines.

Suite à une disparité entre la taille des greffons et la capacité thoracique des receveurs, une pneumoréduction a été effectuée et des analyses d'immunohisto/cytochimie (IHC)/(ICC) par fluorescence ont été réalisées. Pour évaluer qualitativement l'expression de ces protéines d'intérêts, une échelle de niveau d'expression a été élaborée en observant cinq paramètres : 1) l'intensité du marquage, 2) la localisation du marquage (membranaire ou cytoplasmique, 3) la présence d'un marquage continu ou discontinu, 4) le pourcentage de cellules positives et 5) l'homogénéité du marquage.

À ce moment-là, un BAL a été effectué en injectant, via la bronchoscope (Olympus BF type P180, Olympus, Québec, QC), 30 ml de chlorure de sodium (NaCl, 0,9%) dans le lobe moyen droit du greffon. Cet échantillon de BAL a été conservé dans la biobanque de tissus respiratoires du CRCHUM.

3.5. Expérimentations des échantillons cellulaires, animaux et humains

3.5.1. Modèle *in vitro* mimant l'ischémie froide et la reperfusion (I/R) dans des cultures primaires de cellules alvéolaire de type II de rat

La conception de ce protocole est illustrée dans la Fig. 23. Au 2^e jour de culture, les cellules primaires ATII de rats sur supports de boîtes de pétri p35, de filtres Transwell ® 4,67cm² et de labteks (voir la section Collecte des poumons de rat, isolation et culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires de Type II (ATII), ont subi, ou non, un prétraitement de 24 H avec un activateur pharmacologique du canal potassique KvLQT1, soit le 5-(2-Fluorophenyl)-1,3-dihydro-3-(1H-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (R-L3) (4 µM ajouté au milieu de culture). Un volume équivalent de diméthylsulfoxyde (DMSO), véhicule du R-L3, a été ajouté aux cultures (condition contrôle). L'expérimentation réalisée par la suite s'est faite suivant un protocole élaboré par le groupe Cardella *et al.* (68). Ce protocole vise à étudier les effets de l'ischémie froide (I) et de la reperfusion (R) dans un modèle cellulaire s'apparentant aux conditions de préservation en milieu hypothermique et aérobique soumises aux greffons pulmonaires, lors de transplantations. Tel qu'illustré à la Fig. 23, le 3^e jour suivant l'isolation des ATII de rats, les cultures ont été divisées en 2 nouveaux groupes: le groupe contrôle (CTRL, incluant les sous-groupes CTRL véhicule et CTRL R-L3), et le groupe ischémie/reperfusion (I/R, comprenant les sous-groupes I/R DMSO et I/R R-L3). Tous les milieux de culture ont été changés avec ou sans l'ajout de R-L3, selon les sous-groupes.

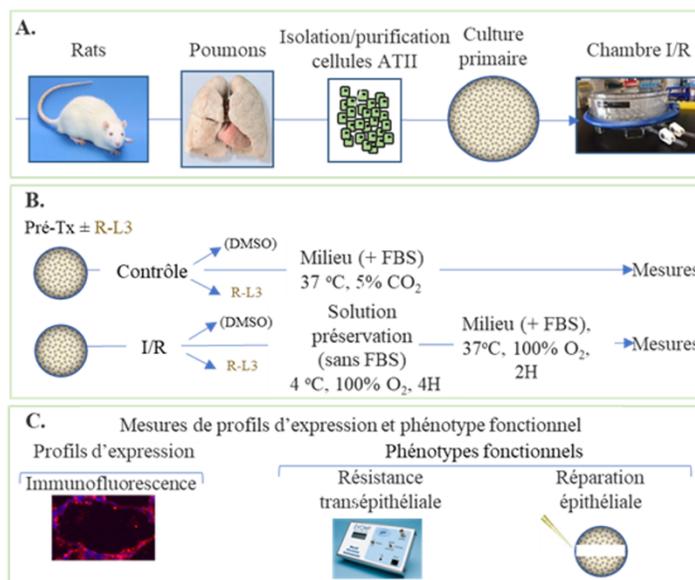


Figure 23: Design expérimental du modèle cellulaire *in vitro*.

Suite à l'isolation de cellules primaires ATII de rats, un protocole mimant l'ischémie/reperfusion (I/R) a été suivi (A). Dans un premier temps, les cultures cellulaires ont été prétraitées ou non pendant 24 heures avec un activateur pharmacologique du canal KvLQT1 (R-L3, 4 μ M). Ensuite, deux groupes ont été réalisés : un groupe contrôle (CTRL, maintenu à 37°C en présence de milieu de culture contenant du FBS) et un groupe où les cultures ont subi l'I/R. Dans le groupe I/R, les cellules ont été placées en présence de solution de pneumoplégie (solution de préservation sans FBS) dans une chambre hermétique à atmosphère 100% oxygène, à 4 °C pour une durée de 4 heures, mimant ainsi l'ischémie froide (I). Par la suite, celles-ci ont été mises en présence du milieu de culture contenant du FBS, dans la chambre hermétique, placé à 37 °C, mimant ainsi la reperfusion (B). Nous avons évalué l'intégrité épithéliale en mesurant la résistance électrique épithéliale (RTE) des cultures jusqu'au 3^e jour. À la fin du protocole, nous avons vérifié l'expression de protéines associées à l'intégrité et à la fonctionnalité épithéliale alvéolaire par immunocytochimie en fluorescence et nous avons mesuré la capacité de réparation des cultures de cellules ATII par la technique de plaies mécaniques.

Les cultures du groupe I/R ont subi une période d'I en présence d'une solution de pneumoplégie Perfadex (sans FBS) en remplacement du milieu de culture et les cellules ont été placées dans une chambre hermétique à une atmosphère de 100% O₂, à 4 °C pour une période de temps de 4H (T4H). Après ce laps de temps, le milieu de préservation a été remplacé à nouveau par le milieu de culture MEM +FBS 10% et les cellules ont été remises dans la chambre hermétique à une atmosphère à 100% d'O₂, placée dans un incubateur à 37 °C pour une période de 2 H (T4H+T2H) mimant la R. Les cultures du groupe CTRL sont, quant à elles, restées pendant toute l'expérimentation (6H) dans le milieu de culture MEM + FBS 10%, dans un incubateur à 37 °C avec 5% CO₂ (un changement de milieu était toutefois effectué au T4H). Suite à cette expérimentation, les filtres Transwell et labteks ont été gardés en culture pour une période de

72 H, alors que les pétris ont été utilisés directement pour procéder à des mesures de vitesse de réparation de plaies mécaniques (voir ci-dessous).

3.5.2. Mesure de réparation de plaies après lésions mécaniques

Selon une technique décrite par le laboratoire de Dre Brochiero (76, 77, 32) des plaies mécaniques ont été effectuées sur les cultures cellulaires sur boîtes de pétris p35 à l'aide d'un embout de pipette P10 à raison de 6 plaies/pétri suite au modèle d'I/R. Le milieu de culture a ensuite été changé pour retirer les débris cellulaires et les plaies ont été photographiées immédiatement (T0H) et après 24 H de réparation (T24H) à l'aide d'une caméra Nikon associée à un microscope optique. Des marques ont été faites sous les boîtes de pétris pour permettre de photographier les plaies aux mêmes endroits à T0H et T24H. Les aires de surface de plaies aux T0H et T24H ont pu être déterminées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, É-U). Ensuite, nous avons pu calculer la vitesse de réparation correspondant à la surface de réparation des plaies en fonction du temps, exprimée en $\mu\text{m}^2/\text{H}$:

Vitesse de réparation = $d(\text{aire de la surface réparée})/dT = (\text{aire de la plaie à T0H} - \text{aire de la plaie à T24H}) / 24\text{H}$

La vitesse peut se définir comme le différentiel (d) d'un paramètre en fonction du temps (T). Dans le cas cité ci-haut, la vitesse de réparation des plaies représente l'aire de surface réparée en fonction du temps (T). Pour la calculer, on détermine en premier lieu l'aire initiale de la plaie (T0H) à laquelle on soustrait l'aire finale de la plaie à T24H divisé par le temps écoulé donc 24H.

3.5.3. Mesure de la résistance électrique transépithéliale (RTE)

La mesure de la RTE a été réalisée sur les cultures d'ATII de rats sur filtres Transwell® 4,67 cm^2 , suite au modèle d'I/R à l'aide de l'appareil EVOM (World Precision Instruments, Floride, É-U). La lecture de RTE, en ohm x cm^2 ($\Omega.\text{cm}^2$) été faite par 2 électrodes de longueurs différentes placées dans le milieu de culture, de part et d'autre de la culture cellulaire sur filtres

perméants. Les mesures ont été prises pour les groupes CTRL et I/R aux T0H, T4H, T4H+2H, T24H, T48H et T72H.

3.6. Mesure d'indice d'œdème pulmonaire dans le modèle d'infection-inflammation chez le porc

Le ratio wet-to-dry (W/D) permet de mesurer l'indice d'œdème pulmonaire. À partir de biopsies prélevées chez des animaux ayant reçu ou non une perfusion de LPS (biopsie Pré-ischémie, voir section Modèle infection-inflammation chez le porc), des échantillons ont été coupés et placés dans des nacelles pour être pesés (poids humide). Ensuite, ceux-ci ont été placés au four à 60°C pendant 24 H et pesés par la suite (poids sec). Le ratio W/D a été obtenu en divisant la valeur du poids humide (W) par la valeur du poids sec (D). La valeur du ratio W/D du groupe LPS a été comparée avec celle du groupe CTRL donnant ainsi une mesure d'indice d'œdème pulmonaire (78).

3.7. Mise sur lame de cellules épithéliales alvéolaires ATII humaines par cyto centrifugation (cytospin)

L'isolation de cellules ATII humaines, à partir des biopsies de parenchyme collectées durant les transplantations pulmonaires, s'est faite d'après le protocole utilisé pour l'isolation de cellules ATII de rats (voir section Isolation et culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires de Type II (ATII) de rats). La mise sur lame de microscopie a ensuite été réalisée en utilisant la technique de cyto centrifugation (Cytocentrifugeuse Shandon Cytospin ® 4, ThermoScientific, Massachusetts, É-U).

Le montage est composé d'une lame de microscopie, d'un papier filtre et d'une chambre d'échantillonnage, le tout maintenu par un support métallique. Une 1^{ère} étape consiste à imbiber le papier filtre en ajoutant un volume de 100 µl de PBS dans la chambre d'échantillonnage à une vitesse de 600 révolutions/min. (RPM) pour une durée de 4 min. Une 2^e étape consiste en

l'ajout d'un volume de 200 µl de suspension cellulaire (≈80 000 – 100 000 cellules) dans la chambre d'échantillonnage, à une vitesse de 750 RPM, pour 6 min. Les cellules ayant une densité plus élevée que le liquide, sont transférées par la force centrifuge, sur la lame et le liquide est absorbé par le papier filtre (79).

3.8. Inclusion de tissus pulmonaires en paraffine

Des biopsies de parenchyme pulmonaire collectées dans les modèles porcins d'infection-inflammation et de transplantation unilatérale chez le porc ainsi qu'en transplantation pulmonaire chez l'humain, ont été fixées le plus rapidement possible dans une solution de formol 10% neutre tamponné pendant 24 H, puis dans une solution de paraformaldéhyde (pFA) 4% (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvanie, É-U; ampoules de pFA 20%) pour une durée de 2 à 4 H, selon la dimension des échantillons.

Les tissus ont ensuite été immergés dans des bains successifs d'alcool de différents gradients de concentration (soit d'EtOH à 70% pour 24 H, d'EtOH 95% et d'isopropanol pour une durée de 2H) à une température de 4 °C, afin de les déshydrater. Ensuite, pour l'étape de clarification, les tissus ont été immergés dans 2 bains de xylène, pendant 1 H chacun à température pièce (RT). Pour terminer, les échantillons ont ensuite été placés dans des cassettes identifiées, celles-ci mises dans un bain de paraffine au four à température entre 60 et 62 °C pendant toute la nuit pour l'étape d'imprégnation. Le lendemain, les échantillons ont été mis dans un 2^e bain de paraffine, pour une durée d'1 H au minimum, avant l'inclusion. Le bloc de paraffine est gardé à RT jusqu'à la coupe au microtome.

3.9. Coupes de parenchyme pulmonaire inclus en paraffine au microtome

Des coupes de parenchymes inclus en paraffine d'une épaisseur de 5 µm, ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica Microsystems, Illinois, É-U). Elles ont été placées sur des lames

de microscopie SuperFrost® et mises au four à 42-60 °C toute la nuit. Cette étape a pour but d'éliminer une grande partie de la paraffine et permettre aux coupes de tissus de bien adhérer aux lames.

3.10. Colorations histologiques de parenchyme pulmonaire à l'hématoxyline Harris et à l'éosine (HE)

Les coupes de tissus placées sur lame ont été déparaffinées en les plongeant dans 2 bains successifs de xylène de 10 min. Par la suite, l'étape de réhydratation a été effectuée en immergeant les coupes, pour une durée de 5 min chacune, dans des bains d'alcool à concentrations décroissantes (soit 100%, 95%, 70% et 50%). Les lames ont ensuite été rincées en les plaçant dans un bain d'eau distillée puis de tampon phosphate salin (PBS). Ensuite les tissus ont été fixés à l'aide de la solution Rapid Fix (ThermoScientific, Massachusetts), rincés à l'eau et colorés à l'HE en utilisant la trousse Rapid-Chrome Sections Staining Kit (ThermoScientific, Massachusetts). Les coupes de tissus ont ensuite été recouvertes d'une lamelle (VWR, New-Jersey, É-U) fixée à l'aide d'une résine de conservation (Cytoseal 60, ThermoScientific, Massachusetts, É-U). Les tissus colorés ont été observés en microscopie optique et photographiés (Olympus).

3.11. Immunocytochimie et immunohistochimie par immunofluorescence

Les cytopins d'ATII humaines et les labteks d'ATII de rats (voir section Modèle *in vitro* mimant l'ischémie froide et la reperfusion (I/R) dans des cultures primaires de cellules alvéolaire de type II de rat) furent fixés avec la pFA 4% pendant 10 min préalablement à la technique d'immunocytochimie. Les coupes de tissus porcins et humains inclus en paraffine ont subi un déparaffinage et une réhydratation (voir section 3.10) qu'une étape de démasquage des épitopes des protéines en préparation pour la technique d'immunohistochimie. Lors du démasquage les coupes de tissus ont été immergées dans une solution tampon citrate (citrate de sodium 0,1 M et acide citrique 0,1 M, Sigma, pH 6.0), placées dans un micro-ondes à puissance

maximale à l'intérieur d'un autocuiseur pour 15 min suivi d'une période de refroidissement de 20 min. À partir de cette étape-ci tous les échantillons ont été rincés au PBS, recouverts d'une solution de saturation composée de 10% BSA et de FBS pour une période d'1 H à RT. Pendant ce temps, les solutions d'anticorps (Ac) primaires ont été préparées à une dilution 1:50 : les anticorps polyclonaux de lapin anti-ENaC- α (#AB2184369, PA1-920A, IgG, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, É-U), anti-KCNQ1 extracellulaire (#APC-168, anti-KvLQT1 extracellulaire, IgG, Alomone Labs, Israël), anti-ZO-1 (#61-7300, IgG, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, É-U), de souris anti-CFTR 570 (IgG1, Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics (CFFT), MA, É-U) et anticorps monoclonaux de souris anti-Na⁺/K⁺-ATPase α -1 (clone C464.6, IgG1 κ). Lorsque la période de 1 H de saturation fut terminée, la solution de saturation a été retirée, remplacée par les solutions d'Ac primaires et les échantillons ont été incubés à 4 °C pour la nuit. Le lendemain, après lavages au PBS et une période de saturation de 15 min, les spécimens ont été incubés avec les Ac secondaires couplés à des fluorochromes d'âne anti-lapin (Sigma 633, Sigma Aldrich, France) ou de chèvre anti-souris (Alexa Fluor 568, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts É-U) dilués à un ratio de 1:200, pendant 4 H à RT en obscurité. Ensuite, après lavages au PBS et une incubation en présence de la solution de saturation 10% pour une durée de 15 min, les échantillons ont été incubés en présence de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), à une dilution de 1:1000, pour une période de 10 min (contre-coloration des noyaux). Le DAPI est une molécule fluorescente qui se lie par affinité à l'ADN double brin, principalement aux bases adénine-thymine, permettant ainsi d'identifier les noyaux des cellules. La lumière d'excitation de cette molécule est ~350nm et la lumière d'émission ~460nm, donc dans le spectre de la lumière bleue (80, 81).

Puis, les lames ont été lavées 3 fois au PBS et recouvertes de lamelles fixées avec de la résine Prolong® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts É-U). Finalement, les lames ont été observées au microscope à épifluorescence (Olympus, Richmond Hill, Ontario) ou au microscope confocal (Leica Biosystems, É-U) et 10 photos (par échantillon) ont été prises et analysées à l'aide des logiciels ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, É-U) et Icy (Institut Pasteur, France).

3.12. Analyses qualitatives d'expression des marqueurs épithéliaux

Les expérimentations des immunomarquages en fluorescence des différents marqueurs (ZO-1, ENaC, CFTR, KvLQT1 et Na⁺/K⁺-ATPase) ont été réalisées dans les trois modèles comme décrites dans la partie 3.11. Les lames ont été observées au microscope à épifluorescence (Olympus, Richmond Hill, Ontario) ou au microscope confocal (Leica Biosystems, É-U). Dix photos du marqueur de noyaux (DAPI) et de la protéine d'intérêt (par n échantillon) ont été prises et analysées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, É-U). Des photos représentatives des observations ont été choisies et l'hétérogénéité remarquée a été prise en compte. Pour le volet translationnel aux transplantations chez l'humain, un indice d'expression (Fig. 22) été établi prenant en compte 5 paramètres distincts: 1) l'intensité moyenne du marquage, 2) la localisation membranaire ou non du marquage (partie fonctionnelle des canaux ionique et de ZO-1), 3) la présence d'un marquage continu ou discontinu, 4) le pourcentage de cellules positives et 5) l'homogénéité du marquage entre les différentes photos et au sein d'une même photo.

3.13. Analyses quantitatives d'expression protéique totale du marquage ENaC

Ces analyses ont été effectuées sur les cultures de monocouches de cellules primaires épithéliales alvéolaires de rat (n=3) et sur les cellules alvéolaires isolées à partir des résections de GD effectués avant la transplantation chez le patient receveur (n=10). A partir des photos prises par le microscope à épifluorescence, une quantification de l'intensité moyenne de fluorescence (en UA) a pu être évaluée à l'aide du logiciel Icy (Institut Pasteur, Paris, France). Pour cela, 10 photos par échantillon du marquage ENaC et du DAPI ont été analysées. Pour le modèle cellulaire de rat, chaque photo comportait en moyenne 250 cellules par photo et par condition pour les labteks de rat soit 7500 cellules environ par condition et par temps ont été analysées dans le cadre de cette quantification. Pour les cellules alvéolaires humaines isolées, l'analyse s'est portée sur 5 GD où les receveurs étaient DPG- et 5 DPG+. Chaque photo

comportait en moyenne 100 cellules par photo par échantillon soit 5000 noyaux en moyenne ont été analysées pour chaque groupe. La valeur d'intensité moyenne en UA par photo a été rapportée dans un graphique en nuage de points et la moyenne +/- SEM y est indiquée.

3.14. Dosages de cytokines à partir d'échantillons de lavages bronchoalvéolaires (BAL)

Des BAL ont été collectés lors de transplantations pulmonaires (voir section Collecte d'échantillons humains lors des transplantations pulmonaires). Ceux-ci ont été centrifugés à 200g pendant 8 min à 4 °C et leur surnageant a été récolté. Des dosages des cytokines (Interleukine (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, Tumor necrosis Factor alpha (TNF- α) et de la chimiokine Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) ont été réalisés par la méthode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Procartaplex Immunoassays, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts É-U). Les plaques d'ELISA ont été lues à l'aide du système Luminex x MAP™ Technology.

Le choix des cytokines à doser dans les échantillons a été fait en raison des données recueillies dans la littérature. Selon De Perrot *et al.*, la concentration des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-8 serait plus élevée durant la période d'I des greffons pulmonaires (63). Pendant la période de R, les concentrations, non-seulement des cytokines citées ci-haut, mais également MCP-1, IL-6 et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 seraient amplifiées (63). Le groupe de Frick *et al.* (82) a démontré, à partir d'échantillons de BAL prélevés en-dedans de 24H suite au clamage aortique chez le donneur, une relation entre l'élévation de la concentration de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et des temps prolongés d'intubation, de séjour à l'unité des soins intensifs et d'hospitalisation des receveurs ayant développé une DPG (grade 2-3). Par ailleurs, une élévation des concentrations de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β à partir d'échantillons de BAL a été observée chez les receveurs ayant développé un rejet aigu suite à une transplantation pulmonaire (83).

3.15. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Les tests statistiques Wilcoxon (paire, non-paramétrique) ont été utilisés pour les analyses de mesures de RTE et de réparation des plaies dans notre modèle *in vitro* et Mann-Whitney (non-paire, non-paramétrique) pour les analyses de notre modèle *in vivo*, les expérimentations sur les échantillons humains et pour les analyses quantitatives d'intensité de fluorescence d'expression protéique totale des canaux ENaC. Dans la section recherche translationnelle, un test de t non-paire avec correction de Welch's a été utilisé pour palier à la très grande disparité du nombre d'échantillonnage entre les groupes de patients receveurs DPG- et DPG+ en fonction du temps d'ischémie froide. Un test statistique considéré significatif est associé à une valeur de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

4. RÉSULTATS

4.1 Étude de l'atteinte épithéliale alvéolaire dans le cadre d'un modèle mimant l'ischémie/reperfusion *in vitro*

Un protocole préalablement établi (68) a été utilisé afin de mimer la période d'ischémie froide (I; en plaçant les cultures à 4 °C dans une solution de pneumoplégie sans FBS) suivie d'une période simulant la reperfusion (R; en plaçant à nouveau les cultures à 37 °C en présence de milieu de culture contenant du FBS) (les limites de ce protocole sont révisées dans la section 5.1.1). Afin de vérifier si ce protocole mimant l'I/R avait un effet sur l'intégrité de l'épithélium alvéolaire, nous avons mesuré la résistance épithéliale (RTE) sur des cultures cellulaires primaires d'ATII de rat sur filtres perméants, en condition contrôle (CTRL) ou I/R (Fig. 24).

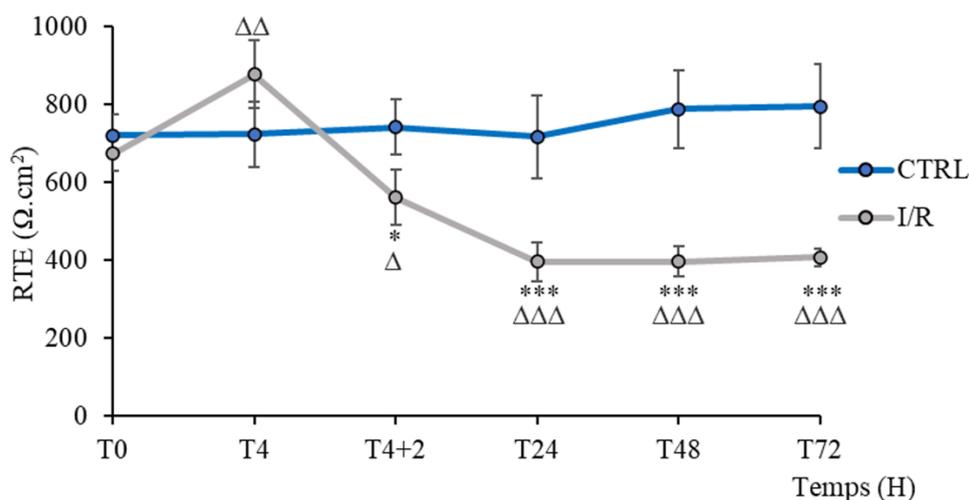


Figure 24: Mesure des résistances électriques transépithéliales des cultures ATII de rat ayant subi ou non le protocole mimant une I/R.

Nous avons mesuré les RTE des cultures n'ayant pas subi (groupe CTRL, en bleu) ou ayant subi le protocole I/R (groupe I/R, en gris) au cours du temps : avant le protocole (T0H), après 4H d'ischémie froide (T4H, I), après ischémie et 2H de reperfusion (T4+2H, I/R), et 24H, 48H et 72H après l'I/R. (n=15). Test non paramétrique pairé (Wilcoxon). * : comparaison par rapport au groupe CTRL; Δ : comparaison par rapport au T0H. * ou Δ : $p < 0.05$, Δ Δ : $p < 0.01$, *** ou Δ Δ Δ : $p < 0.001$.

Après l'I/R, une baisse statistiquement significative des valeurs de RTE a été observée, en comparaison aux valeurs du groupe CTRL, au T4H+2H. La baisse de RTE perdurait au cours du temps (jusqu'à la dernière mesure effectuée à 72H), comparativement au groupe CTRL

(Fig. 24). Les mesures de RTE à l'intérieur du groupe I/R démontrent également une variation significative de la résistance après le protocole I/R par rapport au temps initial (T0 I/R), tandis que les valeurs de RTE restent stables au cours du temps dans le groupe CTRL. Ces résultats suggèrent donc une altération de l'intégrité des cultures cellulaires alvéolaires suite au protocole mimant l'I/R.

Nous nous sommes alors demandé si la chute observée de RTE pouvait être associée à une altération de la protéine de jonctions serrées, ZO-1, dans les cultures d'ATII (Fig. 25).

Dans le groupe I/R, après l'I (au T4H), l'expression de cette protéine est faiblement abaissée par rapport au T0H (I/R) et par rapport au T4H du groupe CTRL, suggérant un léger effet de l'ischémie froide sur l'intégrité épithéliale alvéolaire. En revanche, une forte altération a été observée au T4H+2H dans le groupe I/R, en comparaison du T0 (groupe I/R) ou du temps T4H+2H (groupe CTRL) comme illustré sur les photos représentatives présentées à la (Fig. 25), suggérant que la R et/ou l'association I/R altère la barrière de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire.

Un traitement pharmacologique au R-L3, activateur du canal K^+ , KvLQT1, que nous avons préalablement montré favorisant l'intégrité alvéolaire (43), semble provoquer une augmentation du niveau d'expression de ZO-1 au T4H+2H dans les 2 groupes.

Nous avons ensuite voulu étudier l'impact du protocole d'I/R sur la capacité réparatrice des cultures de cellules ATII à la suite de lésions, en utilisant une méthode de plaies mécaniques bien établie au laboratoire (76, 77, 32) Nous avons alors observé une diminution significative de la vitesse de réparation des monocouches de cellules ATII du groupe I/R (Fig. 26), par rapport aux cultures d'ATII du groupe CTRL. Le traitement avec l'activateur du canal KvLQT1 permet d'augmenter significativement la vitesse de réparation non seulement dans les conditions CTRL (tel que montré précédemment (43)) mais également dans le groupe I/R.

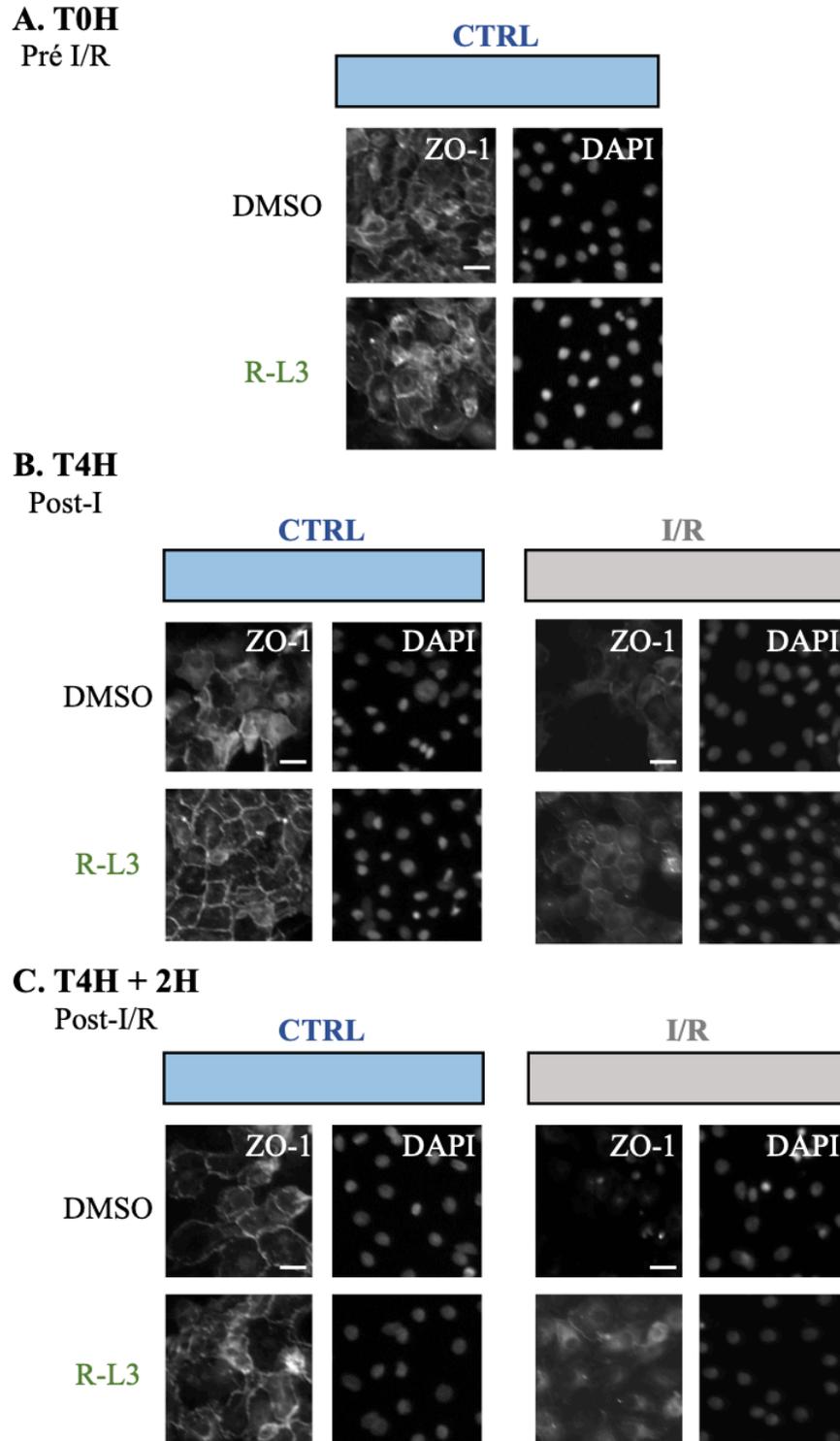


Figure 25: Expression de la protéine d'intégrité ZO-1 en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.

L'expression de la protéine de jonction ZO-1 a été mise en évidence par ICC en fluorescence en pré--protocole I/R, après 4 heures d'ischémie froide (T4H II) et 2 heures de reperfusion (T4H + 2H I/R) dans le groupe I/R et CTRL. L'activateur du canal K⁺ KvLQT1, le R-L3, a été utilisé sur la moitié des cultures cellulaires (groupes CTRL R-L3 et I/R R-L3). Grossissement X200. Échelle: 20 μm. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (marqueur nucléaire).

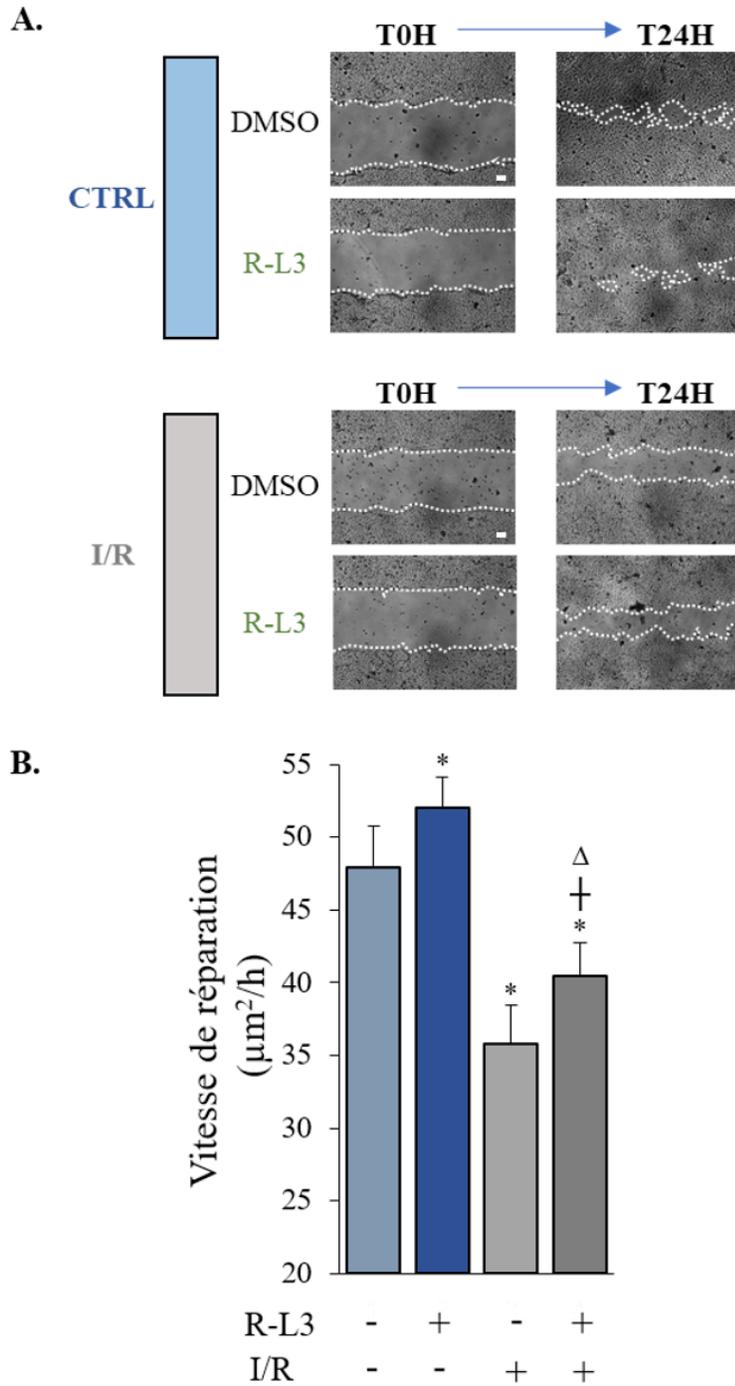


Figure 26: Mesure de la vitesse de réparation de plaies après lésions mécaniques sur des cultures de cellules ATII de rats suite au protocole mimant l'I/R.

Des lésions mécaniques ont été effectuées sur des cultures cellulaires ATII des groupes CTRL et I/R. Des photographies ont été réalisées immédiatement suite aux lésions (T0H) et après 24 heures de réparation (T24H) Grossissement X40. (A.). La vitesse de réparation des groupes CTRL, CTRL R-L3 (bleu) et I/R, I/R R-L3 (gris) est représentée en B. (n= 19). *: comparaison par rapport au groupe CTRL; † : comparaison par rapport au groupe CTRL +R-L3; Δ: comparaison par rapport au groupe I/R. Test non paramétrique pairé (Wilcoxon). *, †, Δ: $p < 0,05$. Échelle : 20µm

Ensuite, nous avons voulu évaluer si l'I/R avait un impact sur le niveau d'expression des canaux ioniques impliqués dans la fonctionnalité de l'épithélium alvéolaire, soit les canaux sodique ENaC, chlorure CFTR et potassique KvLQT1 (voir photos représentatives présentées aux Fig. 27, 28 et 29). Nos analyses qualitatives et quantitatives de marquages en immunofluorescence indiquent qu'après l'I (au T4H), le niveau d'expression d'ENaC, dans le groupe I/R, est significativement altéré par rapport au groupe CTRL au même temps (voir photos représentatives présentées à la Fig. 27). Cette baisse d'expression est également statistiquement significative dans le T4H+2H, par rapport au groupe CTRL mais également par rapport au T4H du groupe I/R mais non de façon significative.

Un traitement au R-L3 semble avoir un effet positif sur le niveau d'expression d'ENaC au T4H+2H du groupe CTRL, ainsi qu'aux T4H et T4H+2H du groupe I/R. Ces résultats sont en accord avec des travaux du laboratoire démontrant que l'activation de KvLQT1 par R-L3, augmentait l'activité du promoteur de la sous-unité α -ENaC et son expression génique (33). Toutefois, des analyses quantitatives de marquages à l'aide du logiciel ICY pourrait permettre de confirmer cette observation.

Nos analyses qualitatives semblent démontrer que le niveau d'expression de CFTR des cultures cellulaires alvéolaires du groupe I/R, semble également légèrement affecté au T4H (I), par rapport au groupe CTRL (Fig. 28). Tout comme observé pour les canaux ENaC, cette baisse est également marquée au T4H+2H (I/R), en comparaison au groupe CTRL au même temps et également à l'intérieur du groupe I/R (vs T4H (I)). Un traitement au R-L3 semble aussi avoir une légère augmentation sur le niveau d'expression de CFTR aux temps T4H et T4H+2H dans le groupe I/R. Cette observation est également en accord avec les travaux précédents du laboratoire démontrant une hausse non seulement du niveau d'expression du canal ENaC mais également du canal CFTR suite à l'activation du KvLQT1 (40, 24,71).

Finalement, nous avons voulu déterminer si l'I/R pouvait avoir un impact sur le niveau d'expression du canal KvLQT1. Nous avons constaté que l'I/R ne semble pas affecter le niveau d'expression de ce canal K⁺ (Fig. 29).

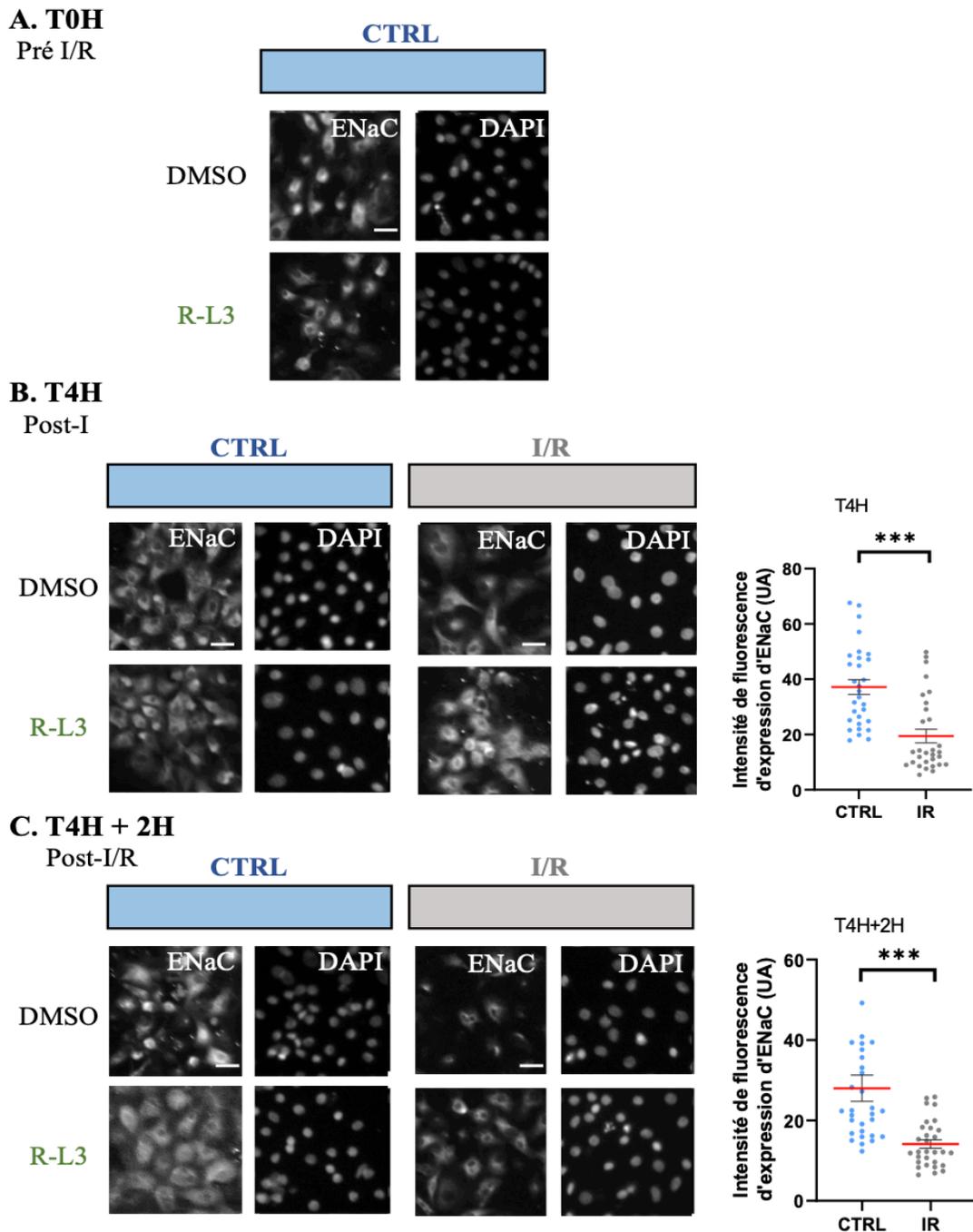


Figure 27: Expression des canaux sodique ENaC en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules d'ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.

Les expressions des canaux ioniques ENaC ont été mises en évidence par ICC en fluorescence en pré--protocole I/R (A.), après 4 heures d'ischémie froide (B., T4H I) et 2 heures de reperfusion (D., T4H + 2H I/R) dans le groupe I/R et CTRL. L'activateur de K⁺, le R-L3, a été utilisé sur la moitié des cultures cellulaires (groupes CTRL R-L3 et I/R R-L3). Grossissement X200. Échelle: 20 µm. L'expression protéique totale d'ENaC a été quantifiée par le logiciel Icy en C. et E.

(n=3, 7500 cellules environ analysées par condition). ***, :p < 0,001. Test Mann-Whitney.

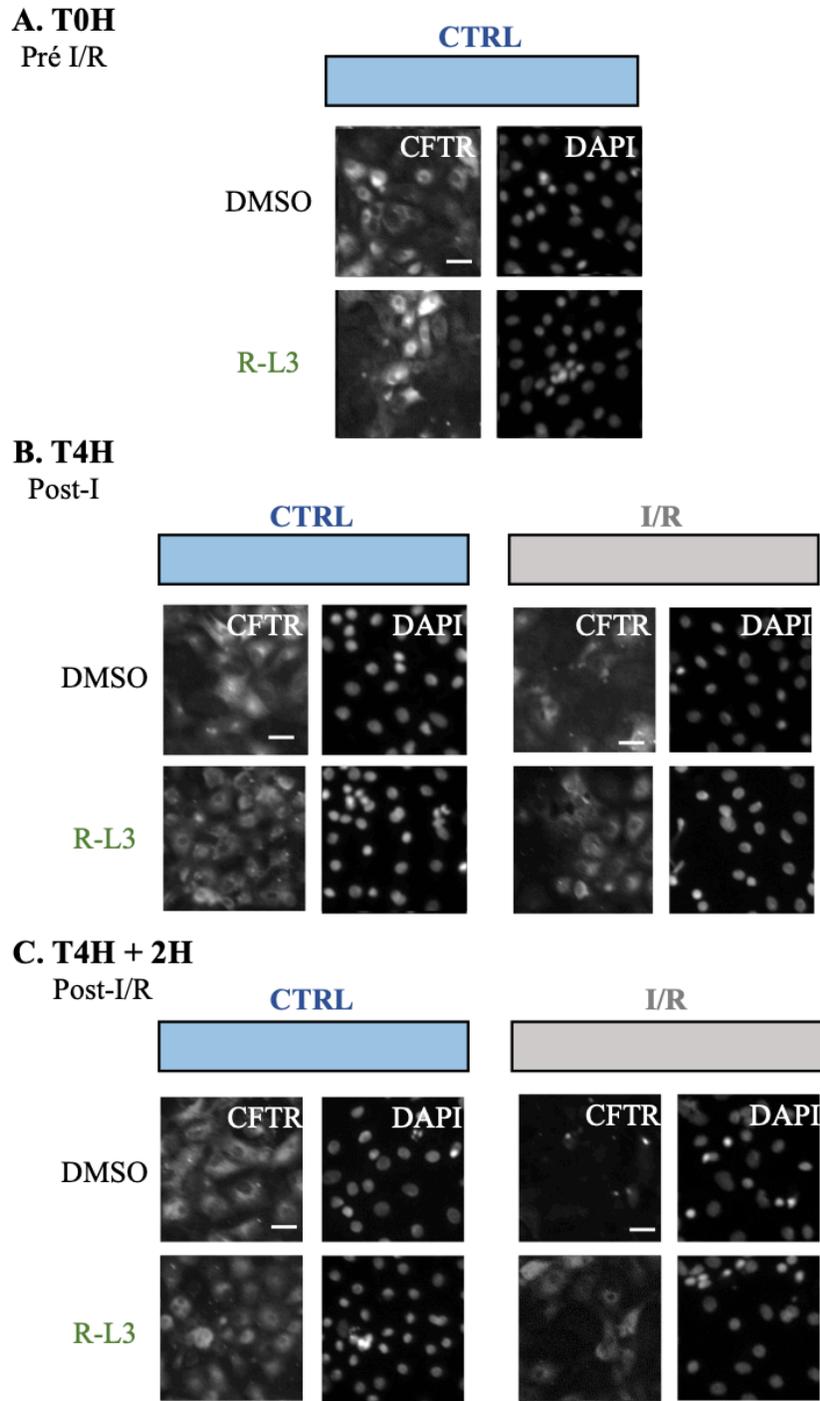


Figure 28: Expression des canaux chlorures CFTR en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules d'ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.

Les expressions des canaux ioniques CFTR ont été mises en évidence par ICC en fluorescence en pré-protocole I/R, après 4 heures d'ischémie froide (T4H I) et 2 heures de reperfusion (T4H + 2H I/R) dans le groupe I/R et CTRL. L'activateur de K^+ , le R-L3, a été utilisé sur la moitié des cultures cellulaires (groupes CTRL R-L3 et I/R R-L3). Grossissement X200. Échelle: 20 μ m.

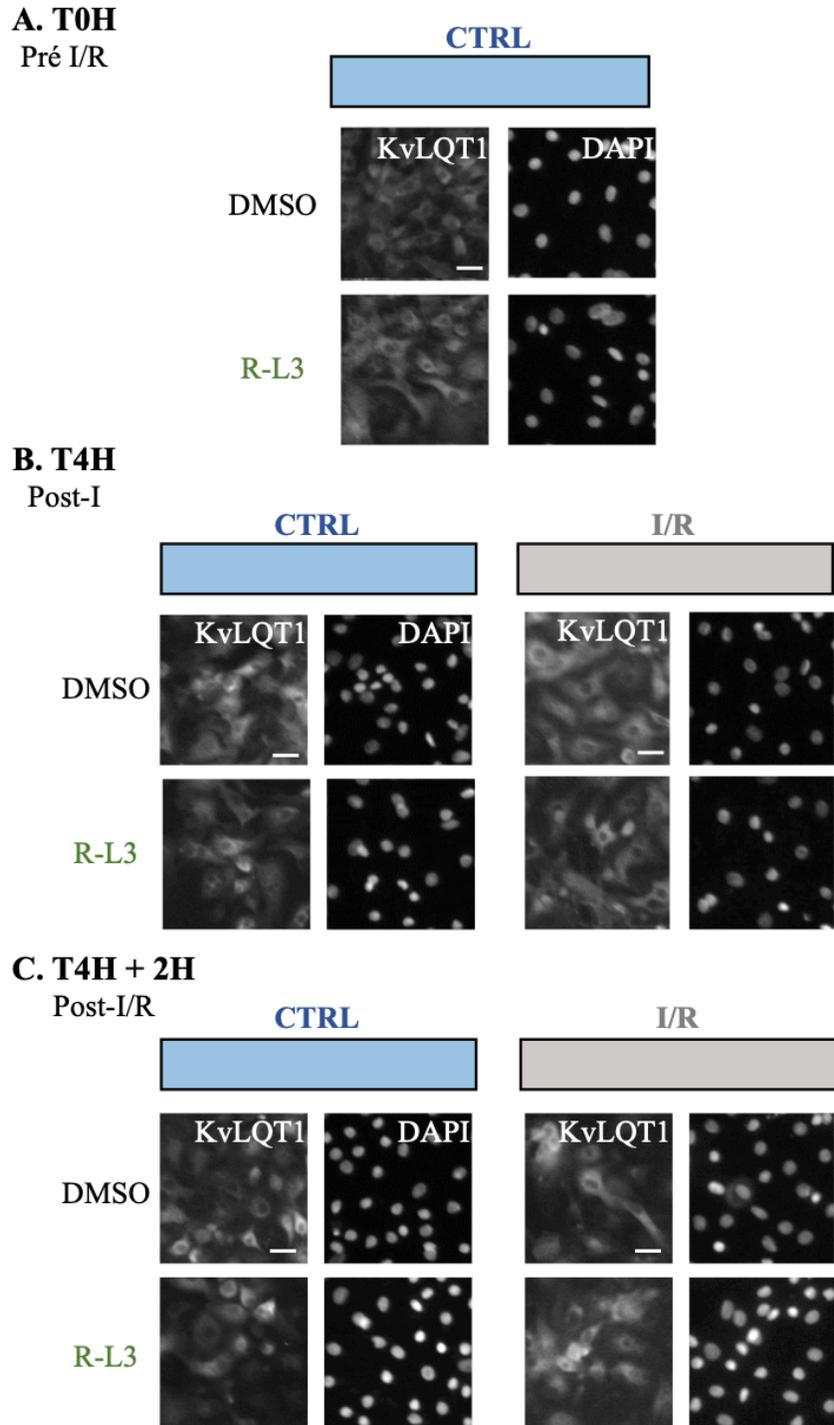


Figure 29: Expression des canaux potassiques KvLQT1 en conditions CTRL et I/R dans les cultures de cellules d'ATII de rats selon le protocole mimant l'I/R.

Les expressions des canaux potassiques KvLQT1 ont été mises en évidence par ICC en fluorescence en pré-protocole I/R, après 4 heures d'ischémie froide (T4H I) et 2 heures de reperfusion (T4H + 2H I/R) dans le groupe I/R et CTRL. L'activateur de K⁺, le R-L3, a été utilisé sur la moitié des cultures cellulaires (groupes CTRL R-L3 et I/R R-L3). Grossissement X200. Échelle: 20 µm.

En résumé, les résultats, obtenus dans le cadre des expériences *in vitro* sur des cultures primaires de cellules alvéolaires, indiquent que le protocole mimant les conditions d'I/R affecte l'intégrité épithéliale (baisse de RTE et d'expression de la protéine de jonctions serrées ZO-1), la capacité de réparation suite à des lésions ainsi que l'expression de canaux (ENaC et CFTR), clefs dans le transport ionique et liquidien. L'activation du canal KvLQT1, par le R--L3, semble renverser, du moins en partie, l'effet néfaste de l'I/R.

4.2 Étude de l'atteinte épithéliale alvéolaire dans un modèle *in vivo* chez le porc

Suite aux résultats obtenus dans notre modèle *in vitro* de cultures cellulaires d'ATII de rats, nous avons voulu observer l'impact de l'I/R dans un modèle *in vivo* chez un grand animal. En effet, le porc représente un modèle de choix de par ses similarités anatomiques et physiologiques avec le système respiratoire humain.

4.2.1. Modèle de transplantation

Notre premier modèle d'expérimentation *in vivo* fut la transplantation pulmonaire unilatérale chez le porc (Fig. 30A). Afin de vérifier l'impact de l'I seule ou I/R sur l'épithélium alvéolaire, des biopsies pré- et post-I ont été prélevées dans les poumons des porcs donneurs, ainsi que 48H post-transplantation chez les porcs receveurs.

Des analyses histologiques ont tout d'abord été effectuées sur les biopsies des GD en pré-I et post-I. Tel qu'illustré à la Fig. 30B, les biopsies post-I (n=8) démontrent des épithélia alvéolaires atteints de façon hétérogène. En effet, nous avons remarqué qu'une majorité (n=5 sur 8) d'entre elles présentaient un épaissement des parois alvéolaires (Fig. 30C, haut). Une infiltration cellulaire intra-alvéolaire a également été notée dans les biopsies de 3 animaux sur 8. D'autres biopsies (n=3) n'ont démontré aucun effet de l'I sur la structure de l'épithélium alvéolaire (Fig. 30C, bas). Ces résultats suggèrent une atteinte hétérogène de l'intégrité épithéliale alvéolaire après une I (Fig. 30C, haut, bas).

Les analyses histologiques des biopsies post-transplantation ont démontré une importante infiltration interstitielle dans tous les spécimens (n=3) et une infiltration cellulaire intra-alvéolaire dans le spécimen récolté suite à l'une des greffes (Fig. 30C, post-Tx, bas).

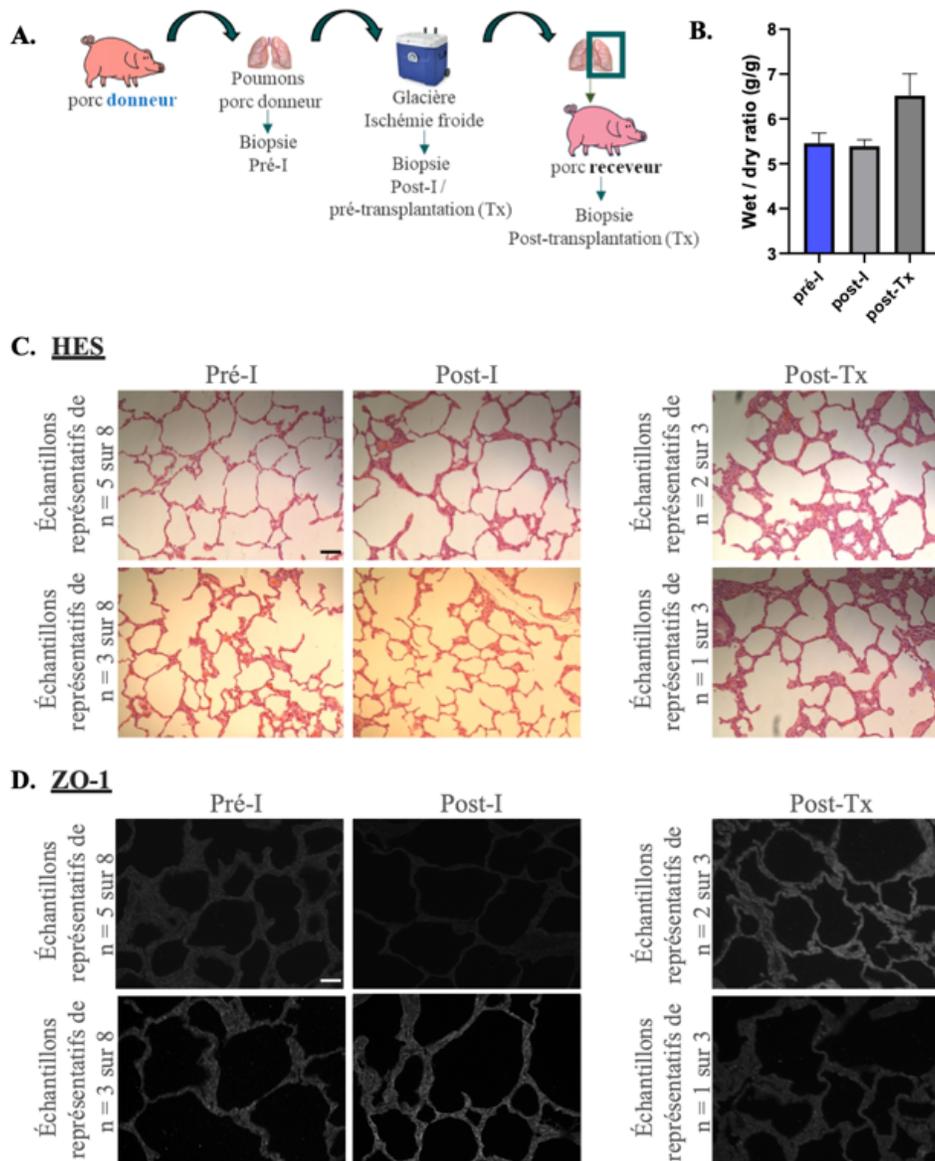


Figure 30: Impact de l'I/R sur l'épithélium alvéolaire dans un modèle animal de transplantation pulmonaire.

A. Schéma d'un modèle de transplantation pulmonaire chez le porc, tel que décrit à la figure 5, section Matériel et Méthodes. **B.** La détermination d'un indice d'œdème en pré-, post-I et post-Tx, par le ratio W/D, a été effectuée sur les tissus du greffon donneur gauche tout au long de la transplantation (n=3). **C.** Les biopsies prélevées en pré- (n=8), post-I (n=8) et 48 heures post-Tx (n=3), ont été incluses en bloc de paraffine, coupées, colorées à l'HE et analysées histologiquement. Grossissement X100. **D.** Le niveau d'expression des protéines associées à l'intégrité (ZO-1) a été évalué en IHC/IF. Grossissement X200. Les photos de la ligne du haut (**C.** et **D.**) sont représentatives du résultat majoritairement observé (en pré- et post-I : n=5 sur 8; en post-Tx : n=2 sur 3) et celles de la ligne du bas sont représentatives du résultat minoritaire (en pré- et post-I : n=3 sur 8; en post-Tx : n=1 sur 3). Échelles: 20 µm.

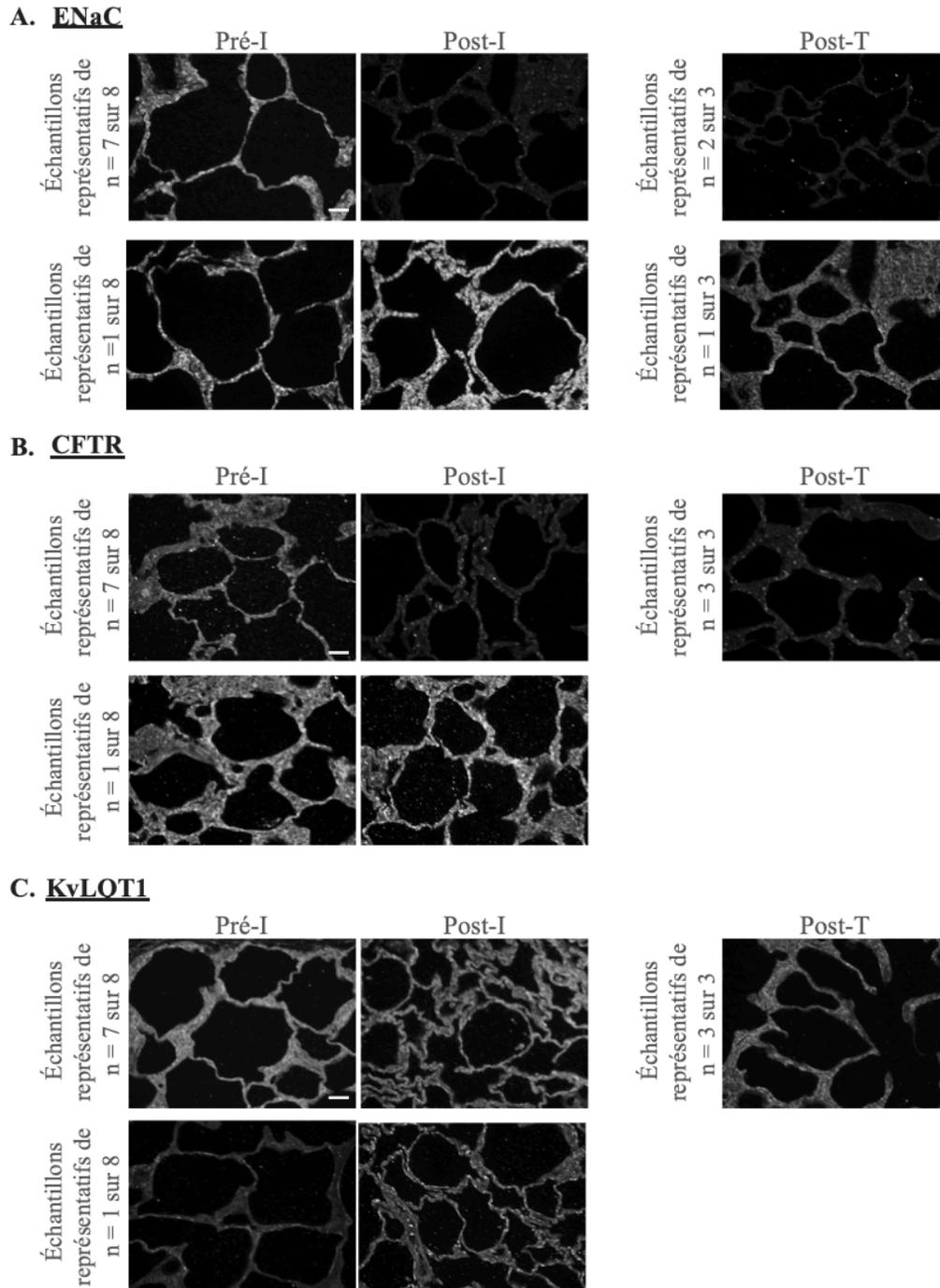


Figure 31: Impact de l'I/R sur l'expression des canaux ioniques de l'épithélium alvéolaire dans un modèle animal de transplantation pulmonaire.

L'évaluation du niveau d'expression des marqueurs de fonctionnalité (ENaC (A.), CFTR (B.), KvLQT1 (C.)) de l'épithélium alvéolaire, a été réalisée IHC en fluorescence. Les photos de la ligne du haut (A., B. et C.) sont représentatives du résultat majoritairement observé (en pré- et post-I : n=7 sur 8; en post-T : n=2 sur 3 pour ENaC et n= 3 sur 3 pour CFTR et KvLQT1) et celles de la ligne du bas sont représentatives du résultat minoritaire (en pré- et post-I : n=1 sur 8; en post-T : n=1 sur 3 pour ENaC). Grossissement X200. Échelle: 20 µm.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'I seule et de l'I/R, en IHC en IF, non seulement sur le niveau d'expression de la protéine d'intégrité ZO-1 (Fig. 30D), mais également sur les canaux ioniques associés à la fonctionnalité épithéliale alvéolaire, soit ENaC, CFTR et KvLQT1 (Fig. 31A-C).

Une diminution du niveau d'expression membranaire (absence de marquage intense aux jonctions intercellulaires) de ZO-1 associée à une augmentation de son expression cytoplasmique a été notée dans les analyses des biopsies post-I (n=5 sur 8, Fig. 30D, post-I, haut), suggérant une altération de la localisation cellulaire de cette protéine de jonction (Fig. 30D, post-I, haut). Pour les autres biopsies post-I, une expression membranaire normale de ZO-1 a été plutôt observée (n=3 sur 8, Fig. 30D, post-I, bas). Les biopsies post-transplantation de 3 porcs présentent une expression membranaire de ZO-1 moins élevée que dans les biopsies pré-I (Fig. 30C). En revanche, comparées aux biopsies post-I, les analyses effectuées 48H post-transplantation présentent des résultats hétérogènes. En effet, deux biopsies post-transplantation (n=2 sur 3, Fig. 30D, post-Tx, haut) présentent une légère augmentation de l'expression membranaire de ZO-1 et la 3^{ème} une diminution de l'expression membranaire de ZO-1 (n=1 sur 3, Fig. 30D, post-Tx, bas).

En post-I, les niveaux d'expressions des canaux ENaC (n=7 sur 8) et CFTR (n=7 sur 8) ont été altérés au niveau de l'épithélium alvéolaire : diminution de l'intensité d'expression et diminution de la localisation membranaire (Fig. 31A-B, haut). Les analyses d'IHC en IF, réalisées sur les biopsies récoltées 48H post-transplantation, démontrent une altération du niveau d'expression d'ENaC sur deux des trois greffes (n=2 sur 3, Fig. 31A, post-Tx, haut) et une altération de CFTR sur les trois greffes (n=3 sur 3, Fig. 31B, post-Tx). Les analyses d'IHC en IF du niveau d'expression de KvLQT1, faites à partir de biopsies prélevées en pré- et post-I ainsi que 48H post-transplantation lors des 3 greffes ne démontrent aucune altération d'expression et de localisation (Fig. 31C, post-Tx). Ces derniers résultats, démontrant que KvLQT1 ne semble pas affecté par I/R, sont similaires à ceux obtenus dans notre modèle *in vitro*.

4.2.2. Modèle d'inflammation induite par infusion de LPS chez le porc

Une réponse inflammatoire exacerbée est une caractéristique majeure observée en clinique dans différentes conditions, telle que suite à une I/R, une DPG ou encore un SDRA causé par exemple par une infection bactérienne (pneumonie ou septicémie) (46).

Afin d'observer l'effet d'un tel état pro-inflammatoire sur l'épithélium alvéolaire, un modèle animal d'infection/inflammation *in vivo* chez le porc, par infusion de LPS, a été choisi. Nous avons également utilisé la technologie de perfusion *ex vivo* du poumon (EVLP) pour vérifier son efficacité dans ce contexte inflammatoire (Fig. 32A).

Dans un premier temps, afin de s'assurer de la présence d'un état pro-inflammatoire chez les porcs ayant reçu le LPS, une quantification des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) du groupe LPS, en comparaison au groupe CTRL, a été réalisée sur le sérum des animaux. Nos analyses en ELISA (Fig. 32B) ont confirmé une augmentation des niveaux de TNF- α (1464 \pm 252 en présence *vs* 89 \pm 89 pg/ml, en absence de LPS) et d'IL-6 (2077 \pm 364 *vs* 0 \pm 0 pg/ml, respectivement en conditions LPS *vs* CTRL).

Des biopsies pré- et post-I dans les groupes CTRL (n=8) et LPS (n=6) ont été prélevées et des analyses histologiques ont été réalisées. Nous avons noté une hétérogénéité au niveau de l'infiltration alvéolaire et interstitielle au sein du parenchyme d'une même biopsie mais également entre les différentes expérimentations. Toutefois, il semble que l'atteinte soit plus marquée dans le groupe LPS (n=4 sur 6; Fig. 32C, LPS, haut). Une infiltration alvéolaire de cellules inflammatoires est également notée dans les biopsies post-I en CTRL et LPS.

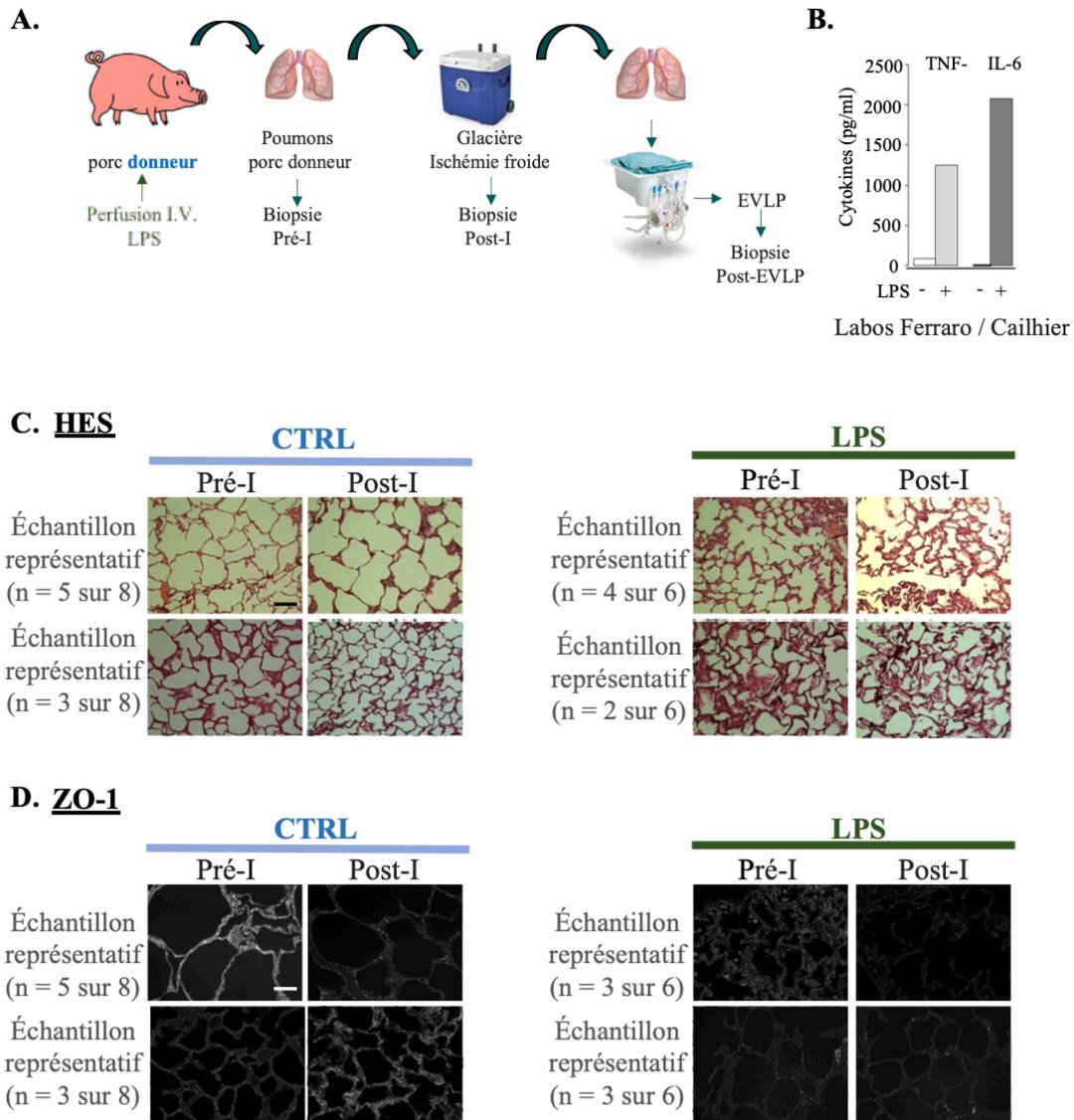


Figure 32: Impact de l'ischémie froide sur l'épithélium alvéolaire, dans un modèle d'infection/inflammation *in vivo* chez le porc.

A. Schéma d'un modèle d'infection/inflammation induites par le LPS *in vivo* chez le porc, tel que décrit à la figure 5, section Matériel et Méthodes. **B.** Afin de vérifier l'état inflammatoire dans le groupe LPS en comparaison au groupe CTRL, une quantification des concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) a été effectuée. **C.** Les biopsies prélevées en pré-I et post-I des groupes CTRL et LPS, ont été incluses en bloc de paraffine, coupées, colorées à l'HE et analysées histologiquement. **D.** Le niveau d'expression de la protéine de jonction ZO-1, associée à l'intégrité de l'épithélium, a été évalué en IHC en fluorescence aux mêmes périodes dans les groupes CTRL et LPS. Les photos de la ligne du haut (**C.** et **D.**) sont représentatives du résultat majoritairement observé (post-EVLP : n=4 sur 5 pour le groupe CTRL et n=4 sur 6 pour le groupe LPS); et celles de la ligne du bas sont représentatives du résultat minoritaire (post-EVLP : n=1 sur 5 pour le groupe CTRL et n=2 sur 6 pour le groupe LPS). Grossissement X200. Échelle: 20 μ m.

Nous avons comparé le niveau d'expression de la protéine ZO-1 en pré- et post-I, dans les groupes CTRL et LPS (Fig. 32D). Il semble que le niveau d'expression de ZO-1 en post-I dans le groupe CTRL soit légèrement diminué alors que dans le groupe LPS, l'expression de ZO-1 semble très fortement altérée (en pré- et post-I), comme l'illustrent les photos représentatives montrées à la Fig. 32D. La moitié de nos biopsies post-I présentaient une altération plus prononcée de l'expression de ZO-1 comparée aux biopsies pré-I (Fig. 32D, LPS, haut), contrairement à l'autre moitié qui ne présentait pas cet effet délétère additif (Fig. 32D, LPS, bas).

Le développement d'un œdème pulmonaire étant une caractéristique majeure du SDRA (46) nous avons également effectué des mesures du ratio W/D à partir des biopsies issues des groupes CTRL et LPS en pré-I (Fig. 33A). Tel qu'attendu, un indice d'œdème significativement plus élevé a été calculé dans le groupe LPS, en comparaison au groupe CTRL ($5,94 \pm 0,06g$ vs $5,43 \pm 0,13g$).

Nous avons alors évalué le niveau d'expression d'ENaC et CFTR. Des analyses d'IHC en IF, effectuées sur des biopsies prélevées en pré- et post-I dans les 2 groupes, révèlent que les niveaux d'expression d'ENaC, malgré l'hétérogénéité observée semblent davantage altérés suite à l'I dans le groupe LPS. En effet, dans le groupe LPS, une baisse du niveau d'expression membranaire d'ENaC est plus marquée en post-I (n=4 sur 6; Fig. 33B, LPS, haut).

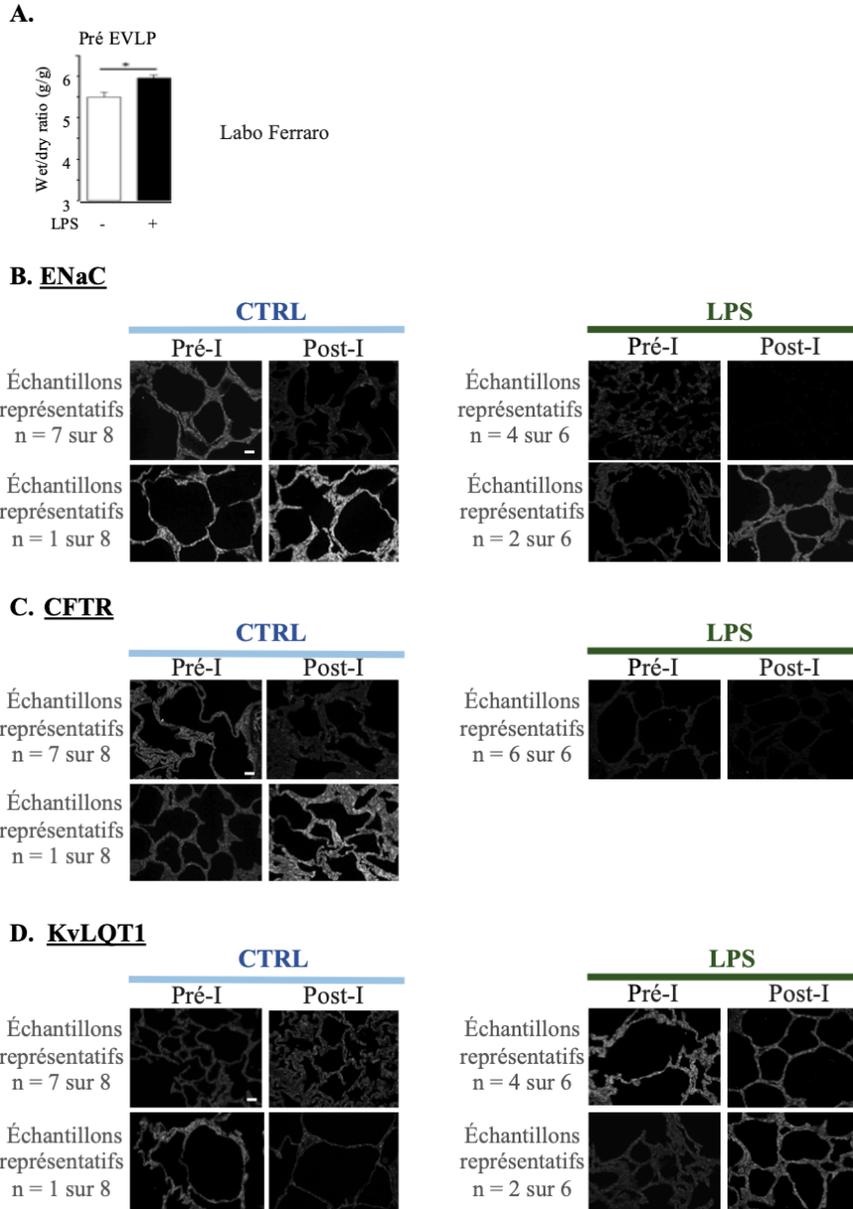


Figure 33: Effet du LPS sur le degré d'expression des canaux ioniques ENaC, CFTR et KvLQT1 de l'épithélium alvéolaire du groupe LPS en comparaison au groupe CTRL.

A. La détermination d'un indice d'œdème en pré- et post-I, par le ratio W/D, a été effectuée sur les tissus du groupe LPS en comparaison du groupe CTRL. Test non paramétrique non païré Mann-Whitney. *, $p < 0,05$. LPS : liposaccharides. L'expression des canaux ENaC (B.) CFTR (C.) et de KvLQT1 (D.) ont été mises en évidence par IHC/IF en pré- et post-I dans les groupes CTRL et LPS. Les photos de la ligne du haut (B., C. et D.) sont représentatives du résultat majoritairement observé (pré- et post-I: n=7 sur 8 pour le groupe CTRL, et n=4 sur 6 pour ENaC et KvLQT1 et n=6 sur 6 pour CFTR, pour le groupe LPS); et celles de la ligne du bas sont représentatives du résultat minoritaire (pré- et post-I : n=1 sur 8 pour le groupe CTRL et n=2 sur 6 pour ENaC et KvLQT1 pour le groupe LPS). Grossissement X200. Échelle: 20 μm .

Les mêmes observations ont été faites pour CFTR avec une diminution de son expression membranaire dans la biopsie en pré-I dans le groupe LPS (n=6 sur 6) par rapport au groupe CTRL, davantage marquée après l'I comparé au temps pré-I (Fig. 33C, LPS).

Des analyses d'IHC en IF des niveaux d'expression des canaux ioniques KvLQT1 (Fig. 33D) ont également été réalisées sur des biopsies prélevées en pré- et post-I dans les 2 groupes. Même si nous avons encore une fois observé de l'hétérogénéité quant aux niveaux d'expression entre des biopsies de porcs différents mais également au sein d'une même biopsie, le niveau d'expression de KvLQT1 semble peu, ou pas altéré par l'I dans les 2 groupes (Fig. 33D).

Par la suite, les greffons pulmonaires ont été reconditionnés et évalués en EVLP (Fig. 34A). Pendant la durée de ce protocole, des échantillons de perfusat ont été prélevés toutes les 30 minutes et une quantification de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1 β) et anti-inflammatoire (IL-10) a été réalisée (Fig. 34B). Nous avons constaté de faibles concentrations des cytokines IL-10 et IL-1 β et une plus forte concentration de la cytokine TNF- α , demeurée stable durant la procédure. Une augmentation importante, graduelle au cours de l'EVLP, de la cytokine IL-6 a aussi été mesurée, confirmant un état pro-inflammatoire persistant tout au long des 4H de perfusion des greffons.

Une dernière biopsie a finalement été recueillie dans les groupes CTRL et LPS en post-EVLP. Des analyses histologiques ont été réalisées à partir de celles-ci et démontrent une infiltration alvéolaire plus marquée dans le groupe LPS, en comparaison au groupe CTRL (Fig. 34C). Cependant, nous avons noté une diminution de l'épaississement de la paroi de l'épithélium alvéolaire et de l'infiltration des parois alvéolaires (pour n=4 sur 5, Fig. 34C, CTRL gauche), par rapport au post-I suggérant ainsi que l'EVLP puisse avoir un effet bénéfique (Fig. 32C et 34C).

L'analyse d'IHC en IF démontre que le niveau d'expression de ZO-1 ne semble pas altéré majoritairement dans le groupe CTRL suite à la procédure EVLP (n=4 sur 5; Fig. 34D, CTRL, gauche). Dans le groupe LPS, nous pouvons noter une légère augmentation du niveau d'expression de la protéine ZO-1 (n=4 sur 6; Fig. 34D, LPS, gauche), par rapport

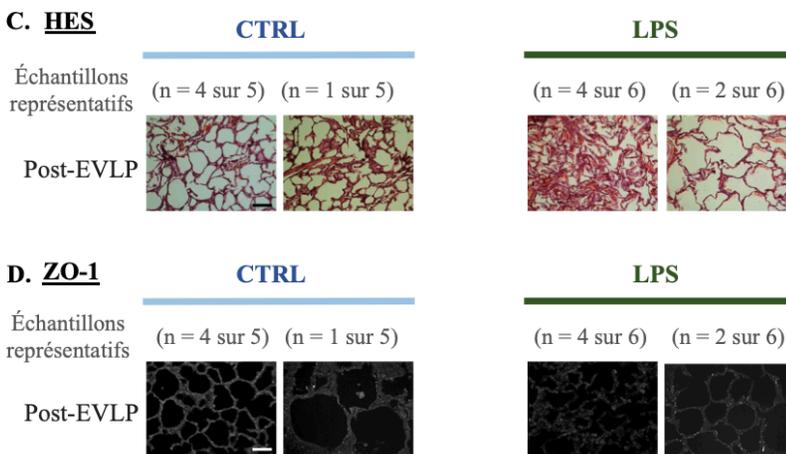
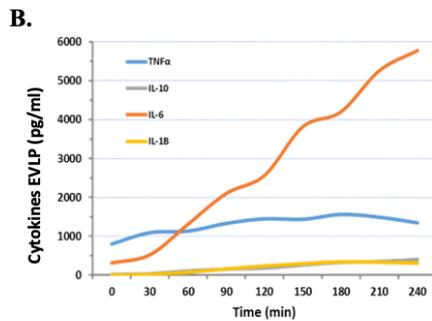
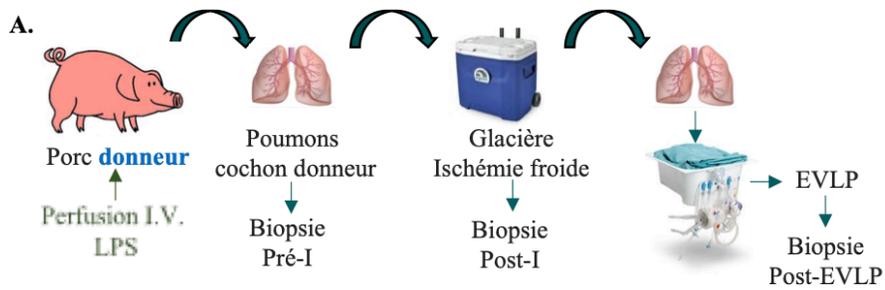


Figure 34: Impact de la technologie de perfusion ex-vivo du poumon (EVLP) sur l'épithélium alvéolaire dans un modèle d'infection/inflammation *in vivo* chez le porc.

A. Schéma d'un modèle d'infection/inflammation induites par le LPS *in vivo* et EVLP chez le porc, tel que décrit à la figure 5, section Matériel et Méthodes. **B.** Une évaluation de l'état inflammatoire des poumons placés en EVLP, a été effectuée en quantifiant les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et anti-inflammatoire (IL-10) au cours du temps pendant l'EVLP (n= 11). **C.** En fin de procédure d'EVLP, des biopsies ont été prélevées dans les groupes CTRL et LPS. Celles-ci ont été incluses en paraffine, coupées, colorées à l'HE et analysées histologiquement. Grossissement X100. Échelle : 20 μ m. **D.** L'intégrité épithéliale alvéolaire a été observée en examinant le niveau d'expression de la protéine de jonction ZO-1 en IHC par fluorescence. Les photos de la ligne du haut (**C.** et **D.**) sont représentatives du résultat majoritairement observé (post-EVLP : n=4 sur 5 pour le groupe CTRL et n=4 sur 6 pour le groupe LPS); et celles de la ligne du bas sont représentatives du résultat minoritaire (post-EVLP : n=1 sur 5 pour le groupe CTRL et n=2 sur 6 pour le groupe LPS). Grossissement X200. Échelle: 20 μ m.

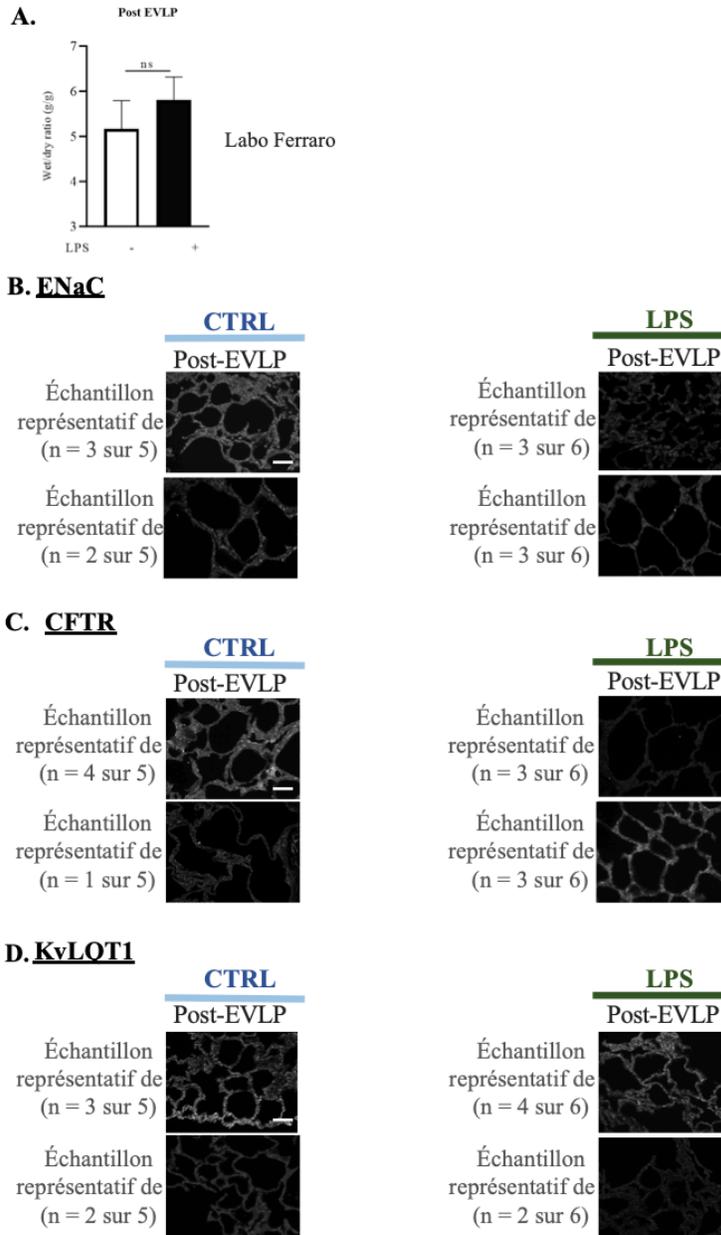


Figure 35: Impact de la technologie de perfusion ex-vivo du poumon (EVLP) sur l'expression des canaux ioniques de l'épithélium alvéolaire dans un modèle d'infection/inflammation in vivo chez le porc.

A. Un ratio W/D a été effectué à la fin de la procédure d'EVLP pour comparer l'indice d'œdème du groupe LPS par rapport au groupe CTRL (n=6 pour le groupe LPS, n=5 pour le groupe CTRL). Le niveau d'expression des canaux ENaC (B.), CFTR (C.) et KvLQT1 (D.), des deux groupes, a été analysé par IHC en fluorescence. Les photos de la ligne du haut (B., C. et D.) sont représentatives du résultat majoritairement observé (post-EVLP : n=3 sur 5 pour ENaC et KvLQT1 et n=4 sur 5 pour CFTR, pour le groupe CTRL et n=3 sur 6 pour ENaC et CFTR et n=4 sur 6 pour KvLQT1, pour le groupe LPS); et celles de la ligne du bas sont représentatives du résultat minoritaire (post-EVLP : n=2 sur 5 pour ENaC et KvLQT1 et n=1 sur 5 pour CFTR pour le groupe CTRL, et n=3 sur 6 pour ENaC et CFTR et n=2 sur 6 pour KvLQT1 pour le groupe LPS). Grossissement X200. Échelle: 20 µm.

au temps post-I de ce groupe (Fig. 34D vs 32D). L'EVLP semble donc renverser partiellement l'effet délétère du LPS sur le niveau d'expression de ZO-1. Ces observations devraient toutefois être confirmées par analyses quantitatives.

Par la suite, les ratio W/D des biopsies ont été déterminés dans les groupes CTRL et LPS en post-EVLP (Fig. 35A). L'indice de ratio W/D semble être plus élevé dans le groupe LPS en comparaison au groupe CTRL ($5,82 \pm 0,21g$ vs $5,17 \pm 0,28g$), mais non plus de façon significative, comme cela a pu être observé au temps pré-I (Fig. 35A vs Fig. 33A).

Dans les biopsies post-EVLP, les analyses d'IHC en IF du niveau d'expression d'ENaC, canal associé à la résorption d'œdème alvéolaire, montrent que dans le groupe CTRL, le niveau d'expression semble légèrement augmenté (n=3 sur 5; Fig. 35B, haut), en comparaison aux niveaux observés en post-I dans ce même groupe (Fig. 35B vs 33B). Les résultats du niveau d'expression d'ENaC dans le groupe LPS sont hétérogènes avec des zones d'épithélia présentant une expression fortement altérée (n=3 sur 6; Fig. 35B, LPS haut) des canaux ENaC alors que d'autres montrent une expression normale (n=3 sur 6; Fig. 35B, LPS bas).

Des résultats relativement similaires ont été observés pour CFTR dans les biopsies post-EVLP. Dans le groupe CTRL, une augmentation de l'expression membranaire de CFTR est observée dans 4 cas sur 5 par rapport aux biopsies post-I (Fig. 35C, CTRL, haut vs 33C). Tout comme observé pour les canaux ENaC, dans le groupe LPS, les résultats sont hétérogènes avec des zones d'épithélia présentant une expression fortement altérée des canaux CFTR (n=3 sur 6; Fig. 35C, LPS haut) alors que d'autres montrent une expression normale (n=3 sur 6; Fig. 35C, LPS bas).

Finalement, nous avons noté que le niveau d'expression de KvLQT1 en post-EVLP dans le groupe CTRL est peu altéré même si de la variabilité a pu être notée sur certaines biopsies post-EVLP (Fig. 35D, CTRL haut et bas). Le niveau d'expression de KvLQT1 ne semble pas varier en post-EVLP dans la condition LPS (Fig. 35D LPS, haut et bas).

En résumé, malgré les hétérogénéités d'expression observée entre les échantillons mais également au sein de mêmes biopsies, nous avons pu valider dans le modèle animal l'effet délétère de l'ischémie froide seule et ischémie/reperfusion sur la structure, l'intégrité épithéliale

et les marqueurs de fonctionnalité alvéolaire (ENaC et CFTR), comme observé dans le modèle *in vitro*. D'autre part, ces effets néfastes sont davantage prononcés dans un modèle pro-inflammatoire (LPS). L'EVLP semble avoir un léger effet bénéfique sur l'épithélium alvéolaire (diminution de l'altération des parois alvéolaires) et renverse partiellement la baisse d'expression de la protéine ZO-1 et des canaux ENaC, CFTR dans un modèle d'inflammation. Finalement, l'absence d'altération de l'expression des canaux K⁺ KvLQT1, contrairement aux canaux ENaC et CFTR, est également confirmée dans ce modèle, et ce quel que soit l'insulte subie (ischémie froide seule ou avec reperfusion et état pro-inflammatoire induit par le LPS).

4.3. Étude translationnelle chez l'humain de l'altération épithéliale alvéolaire dans les greffons et des facteurs reliés à la DPG suite à une transplantation pulmonaire

Suite aux résultats obtenus dans nos modèles *in vitro* et *in vivo*, montrant que l'I/R et l'inflammation exacerbée menaient à une altération de l'intégrité épithéliale et des niveaux d'expression des protéines impliquées dans la fonctionnalité alvéolaire, nous avons voulu vérifier si ces altérations étaient également présentes dans le cadre de la transplantation pulmonaire chez les patients développant une DPG. Nous avons également tenté de mieux définir les facteurs phénotypiques, des donneurs et des receveurs, ainsi que les interventions (avant ou pendant la transplantation) qui pourraient être associées avec le développement d'une DPG chez les greffés pulmonaires.

Le nombre de patients dans notre cohorte n'est pas suffisant, vu le nombre de facteurs confondants (section 4.3.1), pour qu'il soit possible de pouvoir identifier avec des analyses statistiques des facteurs responsables du développement de la DPG. Toutefois, nous avons voulu évaluer s'il pouvait ressortir certaines tendances avec certains facteurs afin d'ensuite pouvoir les relier avec les marqueurs que nous avons identifié dans les volets cellulaire et animal (section 4.3.2., p. 85). Les limitations de cette démarche sont élaborées plus amplement dans la discussion (section 5.1.3.).

Lors de transplantations pulmonaires, une certaine proportion des receveurs développera une DPG. A partir de la base de données Oacis du CHUM, nous avons collecté les rapports de radiographie pulmonaire (afin de déterminer la présence, ou non, d'opacités/œdème pulmonaire) ainsi que les valeurs de pression partielle d'oxygène (PaO_2) et de fraction inspirée d'oxygène (FiO_2) (afin d'établir le ratio P/F) du receveur à 24, 48 et 72h post-transplantation. Ces données nous ont permis d'établir le grade de DPG, selon les critères établis par l'ISHLT (voir Tableau III, p.53). Dans notre cohorte de patients receveurs pulmonaires ayant été transplantés entre 2013 et 2020 (total de 172 patients), 25% (46 patients) ont développé une DPG, dont 11% (19 patients) d'un grade moyen (DPG+, Grade 2) et 15% (27 patients) d'un grade sévère (DPG+, Grade 3), alors que 74% (126 patients) n'ont pas développés de DPG (DPG-Grade 0/1) (Fig. 36A).

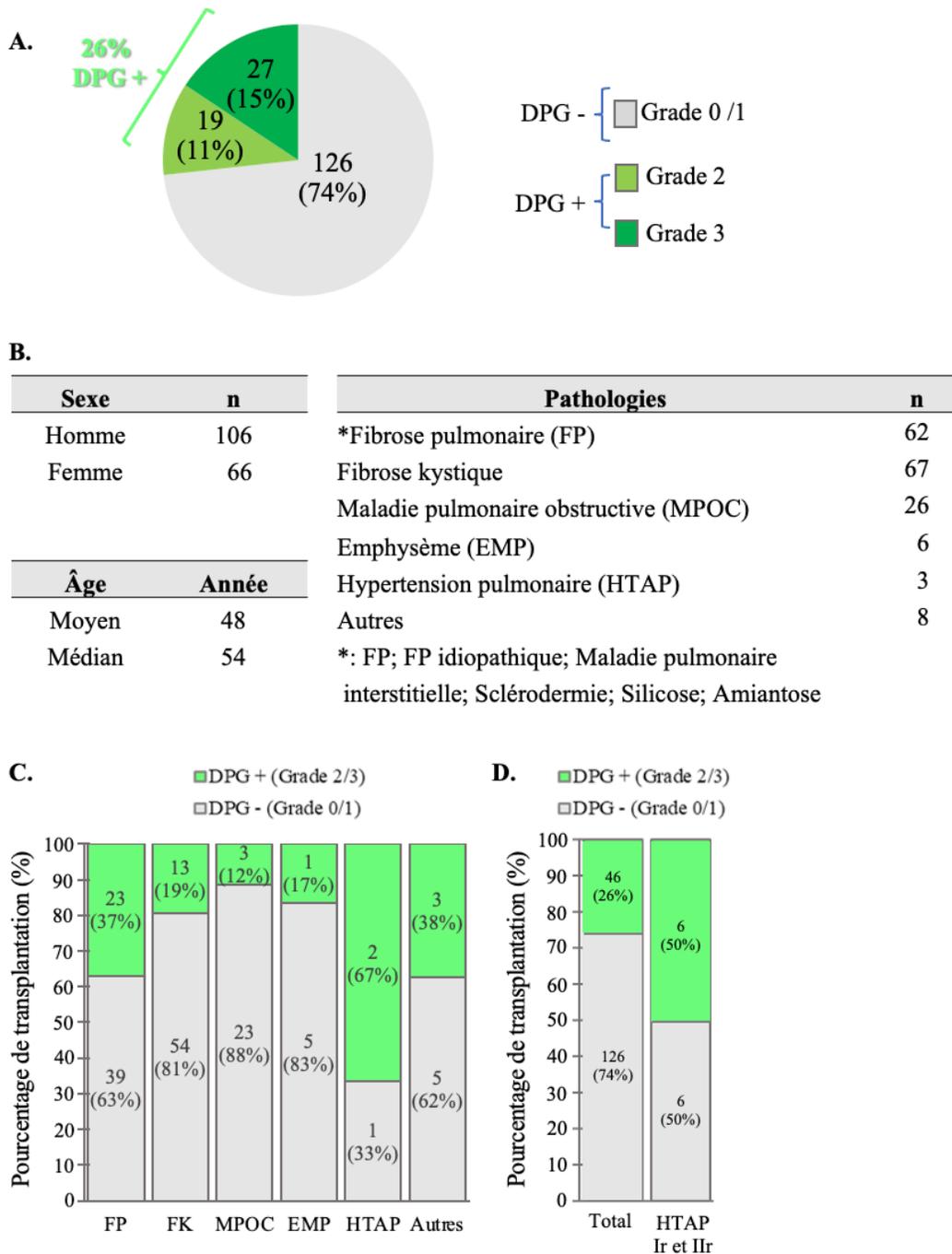


Figure 36: Présentation de la cohorte des patients receveurs en transplantation pulmonaire.

A. Stratification du groupe de patients receveurs par grade de développement de la DPG, soit un grade moyen (Grade 2), sévère (Grade 3) ou en l'absence de développement de la DPG (Grade 0/1). B. Caractérisation de la population de patients transplantés pulmonaires (sexe, âge, maladie pulmonaire ayant nécessité la transplantation). C. Répartition (en %) des receveurs pulmonaires ayant développé (Grade 2/3) ou non une DPG (Grade 0/1), une DPG en fonction de la pathologie pulmonaire des receveurs. D. Répartition en nombre (et % par rapport au nombre total) de la population totale des patients receveurs en greffe pulmonaire, toutes pathologies confondues, en fonction de la population présentant d'une forme d'hypertension pulmonaire, soit hypertension pulmonaire primaire (Ir) ou secondaire (IIr).

L'ensemble de notre cohorte comporte un nombre plus élevé d'hommes (n=106) que de femmes (n=66), l'âge moyen est de 48 années et l'âge médian est de 54 années (Fig. 36B).

4.3.1. Analyses de facteurs phénotypiques des receveurs et donneurs et des interventions sur le greffon pouvant affecter le développement d'une DPG

Les pathologies en phase terminale ayant nécessité la transplantation pulmonaire, au sein de notre cohorte de receveurs, ont été séparées en 6 groupes :

1) La fibrose pulmonaire (FP), composé de FP et de FP idiopathique (FPI), ainsi que des maladies pulmonaires interstitielles (MPI), la pneumonie interstitielle d'origine inconnue (groupe FP), sclérodermie, sarcoïdose, silicose et amiantose (comme regroupé selon l'Association Pulmonaire du Québec et l'Association Pulmonaire du Canada). La FP se caractérise par un remplacement progressif du tissu pulmonaire sain par un excès de tissu fibreux (n= 62) (84).

2) La fibrose kystique (FK), maladie génétique autosomique récessive avec des mutations sur le gène codant pour le canal CFTR (n=67) (85).

3) La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) qui se définit par l'obstruction progressive des voies aériennes et d'une destruction des alvéoles menant à l'emphysème (n= 26) (86).

4) L'emphysème (EMP), interface entre maladie interstitielle et obstructive, est la manifestation d'une destruction de l'intégrité des alvéoles et un élargissement de l'espace alvéolaire (n=6) (87).

5) L'hypertension pulmonaire primaire (HTAP) est caractérisée par une pression pulmonaire moyenne élevée (> 25 mmHg au repos) (n=3) (88).

6) «Autres» (n=8) (Fig. 36C).

Ce dernier regroupe des pathologies plus rares comme la bronchiolite 2^e Sjögren et la lymphangioléiomyomatose. Il est à noter que la proportion de patients atteints de FK dans notre cohorte est plus élevée que parmi l'ensemble de receveurs pulmonaires du CHUM. En effet, compte tenu des activités de recherche axées au laboratoire sur cette pathologie, seuls les patients FK avaient initialement été recrutés. Le recrutement de patients receveurs, étant affectés par d'autres maladies pulmonaires terminales, n'a ainsi débuté qu'en 2017. En

observant le développement d'une DPG par rapport aux pathologies des receveurs, le groupe FP semble présenter une plus grande incidence de DPG+, (23/62 receveurs DPG+ vs 39/62 DPG-), comparé par exemple au groupe FK (13/67 receveurs DPG+ vs 54/67 DPG-) ou EMP (1/6 receveurs DPG+ vs 5/6 DPG-) (Fig. 36C). Puisque le nombre de patients atteints d'HTAP est trop faible (n=3) dans notre reste trop faible pour en tirer des conclusions, nous avons donc effectué une sous-analyse en regroupant les receveurs souffrant d'HTPA primaire ou secondaire, l'HTAP secondaire pouvant se développer à un stade avancé des pathologies pulmonaires (60) (Fig. 36D). Nous avons pu observer que cette association démontrait un plus fort pourcentage de développement de DPG chez les receveurs présentant à la base une forme d'HTAP que parmi la cohorte générale.

Par la suite, nous avons voulu déterminer si les receveurs pour qui l'utilisation d'un support cardio-pulmonaire (SCP) avait été nécessaire durant la transplantation, présentaient, ou non, un plus haut taux de DPG (Fig. 37). Nous avons pu obtenir l'information concernant l'utilisation, ou non, de SCP de 172 patients de notre cohorte. Parmi ceux-ci, l'utilisation du SCP a été nécessaire dans 30 cas durant la greffe pulmonaire. Une proportion de 51% d'entre eux ont développé une DPG+ (Grade 2 ou Grade 3), en comparaison à la cohorte de patients n'ayant pas nécessité un SCP (26%). Ceci est corroboré dans la littérature (60).

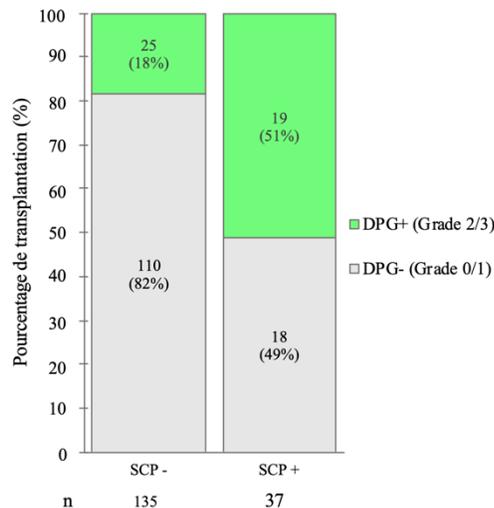


Figure 37 : Incidence de développement de la DPG en fonction de l'utilisation ou non d'un appareil de support cardiopulmonaire (SCP) durant les transplantations pulmonaires.

Nombre (et % par rapport au nombre total) de receveurs ayant développés une DPG (Grade 2/3), ou non (Grade 0/1), en fonction de l'utilisation de SCP (SCP+), ou non (SCP-), en salle d'opération. n = 172

Nous avons ensuite analysé la cohorte de patients donneurs pulmonaires, associés à nos receveurs (Fig. 38A).

A.

Sexe	n	Causes de décès		n
Homme	85	AVC/HC/HSA/RA*		76
Femme	87	Anoxie/Hypoxie		53
		Trauma crânien		39
		AMM*		4

Âge	Année
Moyen	44
Médian	45

Type de don	n
DDN*	146
DDC*	26

*DDN: don par décès neurologique
 *DDC: don par décès cardiocirculatoire
 *AVC/HC/HSA/RA: accident vasculaire cérébral/hémorragie cérébrale/hémorragie subarachnoïdienne/rupture d'anévrisme
 *AMM: aide médical à mourir

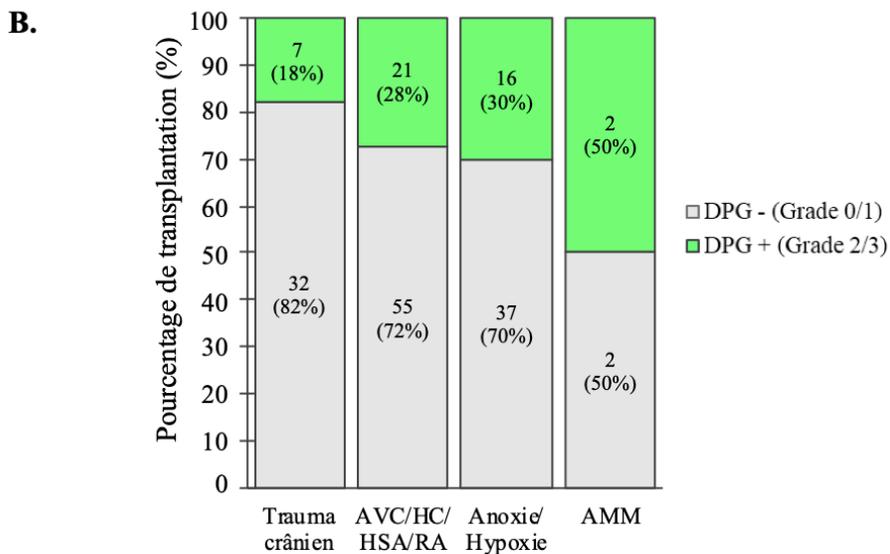


Figure 38: Présentation de la cohorte de donneurs en transplantation pulmonaire

A. Caractérisation de la population des patients donneurs pulmonaires (sexe, âge, type de don (soit un don par décès neurologique (DDN) ou cardiocirculatoire (DDC)) **B.** Nombre (et % par rapport au nombre total) de receveurs pulmonaires ayant développés une DPG (Grade 2/3), ou non (Grade 0/1), en fonction de la cause de décès de leur donneur.

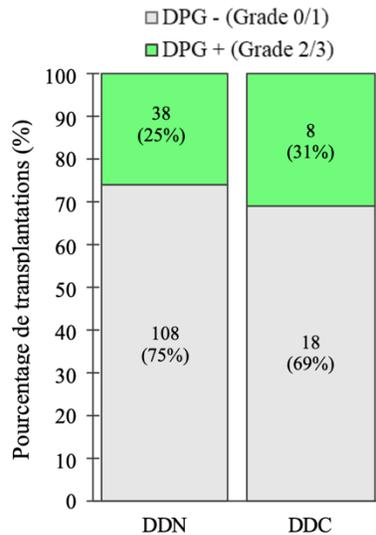
Nous avons classé les causes de décès de notre population de donneurs en 4 groupes : 1) les accidents vasculaires-cérébraux, les hémorragies cérébrales, les hémorragies subarachnoïdiennes et les ruptures d'anévrisme (AVC/HC/HSA/RA), 2) l'anoxie/hypoxie, 3) les traumatismes crâniens et 4) l'aide médicale à mourir (AMM). La seule tendance observée

est que les receveurs ayant reçu des greffons de donneurs décédés par traumatisme crânien semblent développer moins fréquemment une DPG (16% de DPG+ vs 26% DPG+ dans la cohorte totale) (Fig. 38B). La fréquence de DPG+ parmi les AMM semble plus importante, mais l'échantillonnage n'est pas suffisant pour un tirer des conclusions.

Lors d'un DDC, les organes subissent un temps d'ischémie chaude. Celui-ci commence lorsque la tension artérielle moyenne est inférieure à 50 mmHg et la saturation artérielle en O₂ inférieure à 75% jusqu'au moment de la perfusion de la solution de pneumoplégie froide, lors du prélèvement pulmonaire. Cette période d'ischémie a été proposée comme un potentiel facteur de risque pour le développement de la DPG. Nous avons donc posé l'hypothèse que les receveurs de greffons provenant de donneurs DDC (donc avec une période d'ischémie chaude) pourraient plus fréquemment développer une DPG. Or, d'après nos analyses préliminaires (notre nombre de DDC restant trop faible pour une analyse statistique), la proportion de receveurs développant une DPG (DPG+ Grade 2/3 est légèrement plus haute dans le type de don DDC (31% vs 25% pour les DPG+ ayant reçu un don DDN et 26% des DPG+ de la cohorte totale) (Fig. 39A).

Le temps d'I est défini à partir du moment où le greffon pulmonaire est perfusé avec la solution de pneumoplégie froide (solution de qualité de préservation) jusqu'au moment où il est greffé dans le receveur lors de la transplantation. Une étude de l'ISHLT a défini les temps d'I au-delà de 6H (soit 360 min) comme période d'I longue ou allongée et en-deçà de 6H comme période courte ou modérée (89). La période d'I longue est associée à une altération de la qualité des tissus (89) et à une mortalité post-transplantation plus importante. Il a donc été recommandé de limiter la période d'I à 6h, afin de préserver la qualité des greffons. Dans notre cohorte, le temps d'I peut donc varier à l'intérieur de cette fenêtre de 6H, d'une transplantation à l'autre. Nous avons calculé le temps d'I des greffons parmi les receveurs ayant développé, ou non, une DPG. Comme le montre la figure 39B, le temps d'ischémie froide des greffons était significativement ($p < 0.05$) plus long (266 min) parmi les receveurs ayant développé une DPG (DPG+ Grade 2/3) (n=44), comparé (233 min, $p < 0.05$) aux patients n'ayant pas développé une DPG (DPG- Grade 0/1) (n=126). Cette observation indique que même à l'intérieur d'une I courte-modérée (inférieure à 6H), celle-ci peut d'ores et déjà contribuer à une augmentation de l'incidence du développement de la DPG.

A. Impact de l'ischémie chaude



B. Impact de l'ischémie froide

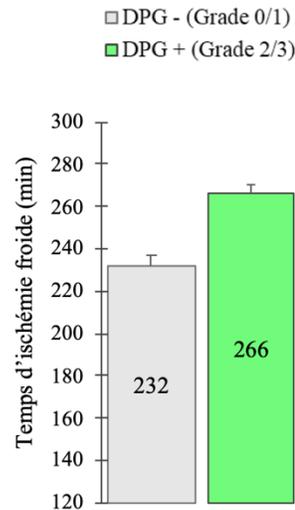


Figure 39: L'influence du type de dons et du temps d'ischémie froide sur le développement de la DPG.

A. Nombre (et % par rapport au nombre total) de receveurs pulmonaires ayant développés une DPG (Grade 2, Grade 3) ou non (Grade 0/1), en fonction du type de don (DDN, DDC) (n= 172). **B.** Temps d'ischémie du greffon donneurs parmi les receveurs ayant développés (Grade 2/3), ou non (Grade 0/1), une DPG. Test t paramétrique non paillé avec correction de Welch's. *, $p < 0,05$.

Finalement, nous avons analysé l'impact d'une pneumoréduction au moment de la transplantation sur la DPG. En effet, en présence d'une disparité entre le volume des greffons et la capacité de la cage thoracique du receveur, une pneumoréduction peut être nécessaire (Fig. 40A). Nous avons réussi à obtenir cette information (pneumoréduction ou non) pour 101 transplantations. Parmi elles, un total de 37 pneumoréductions ont dû être réalisées (Fig. 40B).

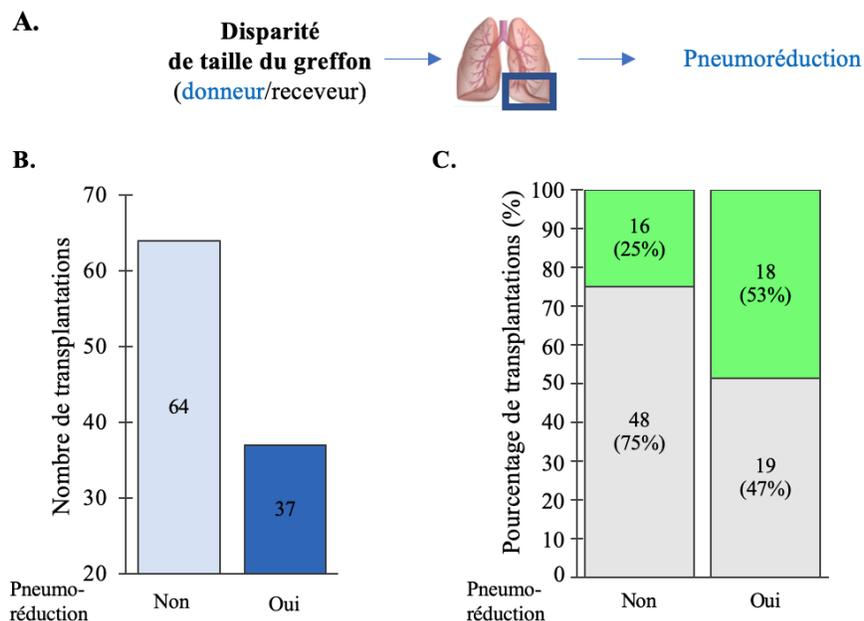


Figure 40: Relation entre la pneumoréduction et le développement de la DPG.

A. Lorsqu'il existe une disparité entre le volume des greffons pulmonaires et la capacité thoracique du patient receveur, une pneumoréduction est effectuée au niveau ceux-ci. **B.** Représentation graphique du nombre de pneumoréductions effectuées lors de 101 transplantations. **C.** Nombre (et % par rapport au nombre total) de receveurs pulmonaires ayant développés (Grade 2/3), ou non (Grade 0/1), une DPG, en fonction d'une réduction pulmonaire au moment de la transplantation.

Notre analyse semble indiquer que les receveurs chez qui cette procédure a été pratiquée, développent plus fréquemment une DPG (DPG+ Grade 2/3), en comparaison des receveurs où une pneumoréduction n'a pas été requise. L'échantillonnage n'est toutefois pas suffisant pour observer une différence significative (Fig. 40C).

4.3.2 Évaluation de l'altération épithéliale alvéolaire des GD en lien avec la DPG

Puisque dans nos modèles *in vitro* et *in vivo*, nous avons observé une atteinte de l'épithélium alvéolaire dans des conditions d'I/R, et que nos analyses de la fréquence de DPG montraient un impact significatif du temps d'ischémie froide sur la DPG, nous avons décidé d'effectuer des analyses histologiques et de marqueurs d'intégrité et fonctionnalité au sein de biopsie de GD. En effet, nous avons posé l'hypothèse que des altérations de l'épithélium alvéolaire pourraient être déjà présentes dans les GD transplantés chez des receveurs qui développent par la suite une DPG.

Des échantillons de parenchyme ont donc été collectés au moment de la transplantation et conservés dans la biobanque du CRCHUM pour analyse ultérieure (Fig. 41A). Une partie des tissus a été incluse en bloc de paraffine, coupée, colorée en HE et analysée histologiquement (Fig. 41B). Celles-ci démontrent que les GD chez qui les receveurs ont par la suite développé une DPG (DPG+, Grade 2/3), présentaient déjà une altération et une infiltration alvéolaire par rapport aux greffons associés aux receveurs n'ayant pas développé de DPG (DPG-, Grade 0/1).

En observant l'analyse d'IHC en IF de ZO-1 par microscopie confocale (Fig. 41C), on remarque que dans les GD associés aux receveurs ayant développé une DPG (DPG+, Grade 2/3), son niveau d'expression membranaire est diminué et sa localisation est principalement intracytoplasmique (« formation en points » au niveau des membranes) par rapport aux analyses des greffons des receveurs n'ayant pas développé de DPG (DPG- Grade 0/1) où la localisation est principalement membranaire (« formation de traits » jonctionnels intercellulaires).

À la toute fin de la transplantation, un lavage bronchoalvéolaire (BAL) a été effectué et un échantillon a été collecté, dans le cadre de quelques transplantations. Nous avons pu ainsi évaluer la présence et mesurer les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, MCP-1) et anti-inflammatoire (IL-10) par méthode ELISA (Fig. 41D), entre les groupes DPG+ (Grade 2/3) et DPG- (Grade 0/1). Nos analyses préliminaires semblent indiquer une tendance à des niveaux plus élevés des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 : $1061,0 \pm 189,3$ (DPG+) vs $616,9 \pm 117,8$ (DPG-) pg/ml; MCP-1 : $590,7 \pm 137,8$ vs $353,9 \pm 57,0$ pg/ml) et une augmentation statistiquement significative de la concentration de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ($32,0 \pm 9,0$ vs $5,1 \pm 1,5$ pg/ml) dans les BAL des greffons de receveurs ayant développés une DPG (DPG +), en comparaison des DPG-.

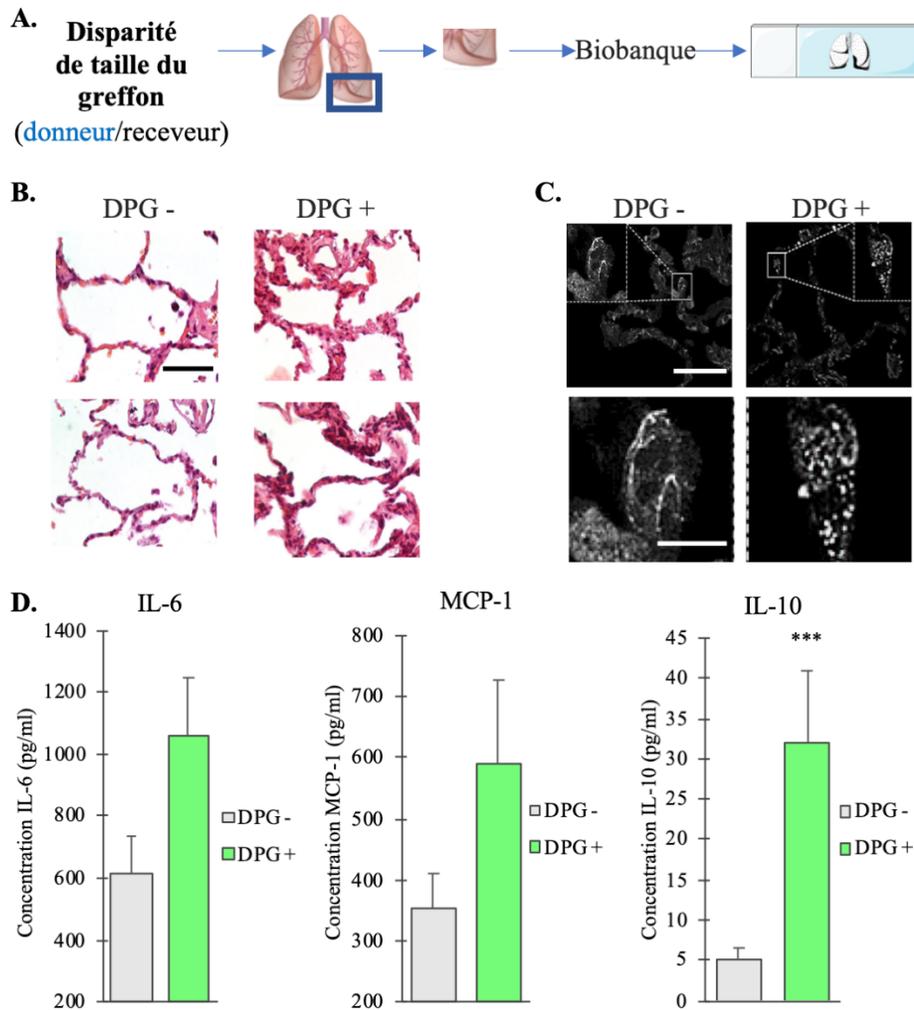


Figure 41: Intégrité de l'épithélium alvéolaire des greffons donneur (GD) et niveaux de cytokines dans les lavages bronchoalvéolaires (BAL), effectués durant les transplantations pulmonaires.

Suite à une pneumoréduction, les tissus de parenchymes des GD ont été inclus en bloc de paraffine, des coupes ont été effectuées (A), puis une analyse histologique a été réalisée (suite à une coloration HE) et comparée entre les groupes de receveurs ayant développés (DPG+, Grade 2/3), ou non (DPG-, Grade 0/1), une DPG Grossissement X200. Échelle de 20 μ m (B). Immunomarquage de la protéine d'intégrité ZO-1 en IHC en fluorescence, sur ces greffons associés aux patients ayant développé (DPG +), ou non (DPG-), une DPG. C. Observation au microscope confocal au grossissement X1000. Échelle de 5 μ m. D. Une évaluation de l'état inflammatoire des greffons a été réalisée en mesurant les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, MCP-1) et anti-inflammatoire (IL-10) dans les BAL recueillis à la fin de la transplantation, chez des receveurs ayant par la suite développés (DPG+, Grade 2/3), ou non (DPG, Grade 0/1), une DPG. Test non paramétrique non paillé (Mann-Whitney) ***: $p < 0.001$.

Ces résultats démontrent donc la présence d'une altération de l'intégrité épithéliale dans les GD avant même d'être transplantés chez les receveurs ayant développé ensuite une DPG.

4.3.3 Interrelations entre le temps d'ischémie froide du greffon donneur, les marqueurs de fonctionnalité et le développement de la DPG

Lors des collectes de résections de parenchyme issus des GD, une partie de ce tissu a pu être utilisé afin d'en isoler des cellules épithéliales alvéolaires. Ceci concerne 25 pneumoréductions. Nous avons d'abord vérifié, si, parmi ces 25 transplantations, le temps d'ischémie froide des GD transplantés chez les receveurs ayant développé une DPG, était allongé. En effet, nous observons, parmi ces 25 transplantations avec pneumoréduction et collecte de tissus, un temps d'ischémie froide significativement plus long chez les receveurs DPG+ (285 min) en comparaison des DPG- (216 min) (Fig. 42), en accord avec les résultats obtenus dans l'ensemble de notre cohorte montrant une incidence néfaste de l'I.

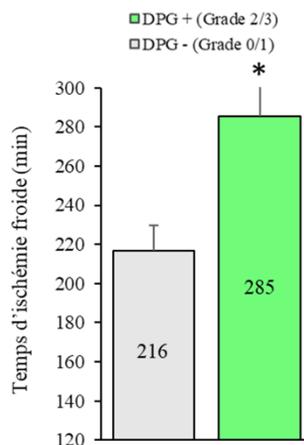


Figure 42: Impact de l'ischémie froide sur le développement de la DPG dans la cohorte des GD avec pneumoréduction.

Temps d'ischémie du froide des GD parmi les receveurs ayant développés (Grade 2/3, n=11), ou non (Grade 0/1, n=14), une DPG. Test non paramétrique non pairé (Mann-Whitney), * $p < 0,05$.

Pour résumer les résultats de l'étude translationnelle chez l'humain, obtenus avec une cohorte insuffisante pour le moment pour faire des tests statistiques sur l'ensemble des paramètres étudiés, nous avons observé certaines tendances où l'incidence de développement de la DPG était augmentée pour certains facteurs phénotypiques, provenant soit du donneur d'organe, de ses greffons ou du receveur transplanté (Tableau V, p. 115). En effet, ceci a été observé pour

l'âge du donneur (Fig. 38A), la disparité entre le volume des greffons et la capacité de la cage thoracique du receveur (pneumoréduction nécessaire) (Fig. 40C), la pathologie HTAP (primaire et secondaire) (Fig. 36C-D) et l'utilisation d'un support cardiopulmonaire (Fig. 37). Nous avons toutefois démontré que le temps d'ischémie froide, même inférieur au temps limite reconnu pour la bonne préservation des organes, est significativement plus élevé pour des GD parmi les receveurs développant par la suite une DPG (Fig. 39B). C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à une éventuelle association entre l'ischémie froide et l'expression des différents marqueurs épithéliaux alvéolaires étudiés. Nous avons voulu définir si l'expression des canaux ioniques ENaC et CFTR était également altérée, comme cela pouvait être observé dans nos modèles d'ischémie froide ou ischémie/reperfusion *in vitro* et *in vivo*.

Lors des isolations des cellules à partir des tissus de parenchyme des greffons, des tests d'immunomarquages ont été préalablement effectués pour confirmer la composition majoritaire de cellules épithéliales alvéolaires: un immunomarquage de pro-SPC (pour identifier les cellules ATII) et un immunomarquage de podoplanine et aquaporine-5 (pour identifier les ATI) (Fig. 22). Nous avons ensuite comparé les niveaux d'expression des biomarqueurs dans les cellules alvéolaires provenant des GD transplantés chez les receveurs ayant ensuite développé, ou non, une DPG. Ces niveaux d'expression dans les cellules épithéliales alvéolaires isolées ont été évalués qualitativement à l'aide d'un score établi en observant quatre paramètres tels que décrits dans la section Matériels et Méthodes 3.4.3. (Fig. 22).

	Paramètres étudiés		DPG-	DPG+	Valeur <i>p</i>	
Donneurs	Sexe	Homme	62 (49%)	23 (51%)	ns	
		Femme	65 (51%)	21 (49%)		
	Âge (ans)	Moyen	43	47	ns	
		Médian	44	49		
	Causes du décès	AVC/HC/HSA/RA*		55 (72%)	21 (28%)	ns
Anoxie/Hypoxie		37 (70%)	16 (30%)			
Trauma crânien		32 (82%)	7 (18%)			
AMM*		2 (50%)	2 (50%)			
Type de don	DDN*		108 (75%)	38 (25%)	ns	
	DDC*		18 (69%)	8 (31%)		
Greffons donneurs	Pneumoréduction †	non	48 (75%)	16 (25%)	ns	
		oui	19 (47%)	18 (53%)		
	Temps d'ischémie froide (min)	Moyen	232	267	<i>p</i> <0,05	
		SEM	5	14		
Receveurs	Sexe	Homme	80 (75%)	26 (25%)	ns	
		Femme	47 (71%)	19 (29%)		
	Âge	Moyen	47	49	ns	
		Médian	51	54		
	Pathologies	*Fibrose pulmonaire (FP)		39 (63%)	23 (37%)	ns
		Fibrose kystique (FK)		54 (81%)	13 (19%)	
		Maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC)		23 (88%)	3 (12%)	
Emphysème (EMP)		5 (83%)	1 (17%)			
Hypertension pulmonaire (HTAP)		1 (33%)	2 (67%)			
Autres		5 (62%)	3 (38%)			
Support cardiopulmonaire	non		110 (82%)	25 (18%)	ns	
	oui		18 (49%)	19 (51%)		

†: cohorte de 101 patients

*FP: FP idiopathique; Maladie pulmonaire interstitielle; Sclérodermie; Silicose; Amiantose

*: AVC/HC/HSA/RA: accident vasculaire cérébral/hémorragie cérébrale/hémorragie sous-arachnoïdienne/rupture d'anévrisme; AMM: aide médicale à mourir; DDN: don par décès neurologique;

*DDC: Don par décès cardiocirculatoire

Tableau V : Tableau illustrant les différents paramètres étudiés (données démographiques et cliniques) dans notre cohorte de patients donneurs/receveurs et la gestion des greffons donneur en relation avec l'absence (DPG-) ou la présence (DPG+) du développement d'une DPG suite à une transplantation pulmonaire.

Pour établir s'il existe une association entre l'I et le niveau d'expression des canaux ioniques, nous avons étudié l'expression de ces marqueurs sur des coupes de parenchyme pulmonaire de GD (Fig. 43A, 44A et 46A) et dans les cellules épithéliales alvéolaires isolées à partir de ces mêmes greffons (Fig. 43,44,46 B-C et 45 A-B).

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés au canal ENaC, canal primordial dans la résorption liquidienne (Fig. 43A-C). Une expression réduite des canaux ENaC est associée avec un temps d'I plus long des GD ($283,5 \pm 19,2$ min d'I (en cas d'expression altérée) vs $229,7 \pm 16,8$ min (en cas d'expression normale)) (Fig. 43D). De plus, ceci peut être mis en relation avec une forte proportion des receveurs ayant développé une DPG ($87,5\%$ de DPG+ dans les échantillons avec expression altérée vs $12,5\%$ de DPG- dans les échantillons avec expression normale (Fig. 43A--D)). En revanche, les cellules alvéolaires des GD transplantés chez les receveurs DPG- présentent majoritairement un niveau d'expression d'ENaC normal (Fig. 43A-D). Les analyses quantitatives d'intensité de fluorescence d'ENaC indiquent une altération significative d'expression totale des canaux ENaC dans les cellules alvéolaires des GD parmi les receveurs qui développent une DPG (Fig 43E).

Nous avons observé des résultats similaires pour le canal CFTR mais moins prononcé que dans le cas d'ENaC (Fig. 44B-D). Une expression réduite des canaux CFTR est associée avec un temps d'I plus long des GD ($267,5 \pm 24,0$ min (expression altérée de CFTR) vs $246,7 \pm 18,0$ min (expression normale de CFTR) (Fig. 44D)). Ces résultats ont pu également être mise en relation avec une forte proportion des receveurs ayant développé une DPG (expression altérée DPG+ : $83,3\%$ vs DPG- : $16,7\%$).

Le niveau d'expression des canaux K^+ KvLQT1 et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, impliqués dans le maintien du gradient ionique dans les cellules alvéolaires et de la clairance liquidienne, ont également été analysés (Fig. 45A-C et Fig. 46B-D, respectivement). Aucune altération de leur expression n'a été notée dans les cellules alvéolaires des GD transplantés chez des receveurs ayant développé, ou non, une DPG. Plus de 80% des différents greffons donneurs des deux groupes (DPG- et DPG+) exprimaient fortement les canaux KvLQT1 (Fig. 46D) et ce au niveau de la membrane des cellules alvéolaires.

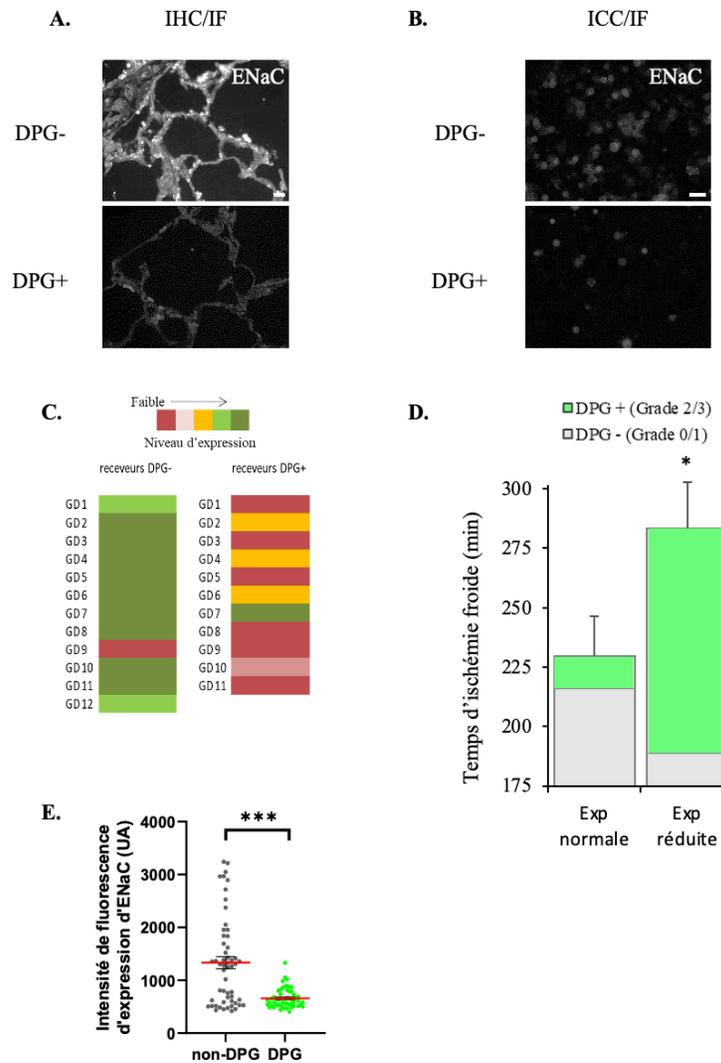


Figure 43: L'expression des canaux ENaC dans les biopsies de parenchymes de GD et les cellules alvéolaires isolées de ces biopsies parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG

Photographies au microscope à épifluorescence illustrant l'expression des canaux ENaC dans le parenchyme alvéolaire (A, grossissement X200) ou au niveau de cellules épithéliales alvéolaires isolées (B, grossissement X400) des GD parmi les receveurs ayant développé (DPG+) ou non (DPG-) une DPG. Échelles 20 μ m. C. Un index d'expression de ce marqueur est donné pour les cellules alvéolaires isolées des GD en fonction des paramètres d'intensité, de la localisation membranaire continue, du pourcentage de cellules positives et de l'homogénéité du marquage. D. Interrelations entre le niveau d'expression des canaux ENaC et le temps d'ischémie froide chez le greffon donneur et le statut DPG du receveur (DPG+ : n=11; DPG-, n=12). E. Analyses quantitatives par Icy de l'intensité de fluorescence (en UA) du marquage protéique totale des canaux ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires, issues des greffons donneurs réséqués avant la transplantation chez le patient receveur. Cette analyse est faite sur 20 photos/n (10 marquages DAPI et 10 ENaC) d'environ 100 cellules/photo (n=10 : 5 GD où receveurs DPG- et 5 DPG+). Test non paramétrique non païré (Mann-Whitney), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

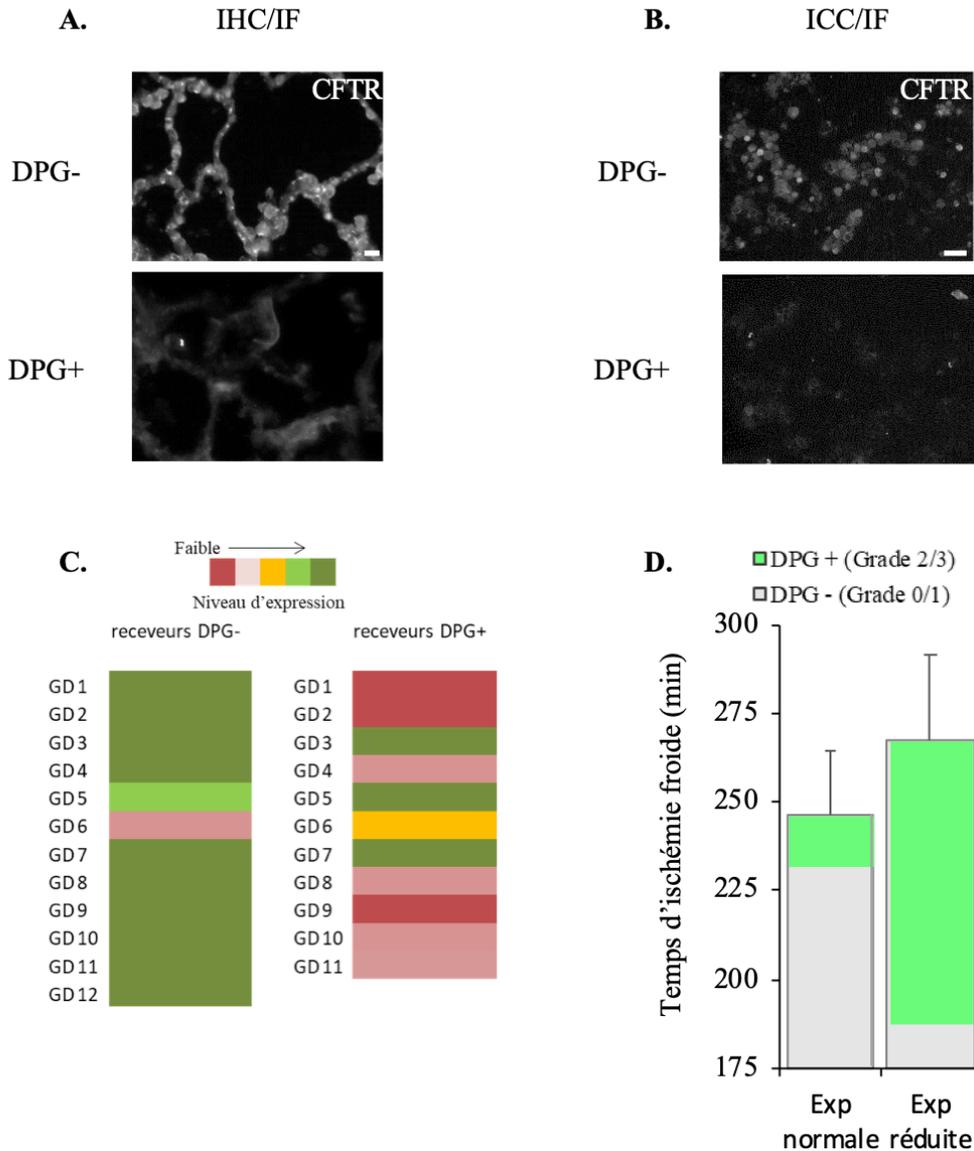


Figure 44: L'expression des canaux CFTR dans les biopsies de parenchymes de GD et les cellules alvéolaires isolées de ces biopsies parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.

Photographies au microscope à épifluorescence illustrant l'expression des canaux CFTR dans le parenchyme alvéolaire (A, grossissement X200) ou au niveau de cellules épithéliales alvéolaires isolées (B, grossissement X400) des GD parmi les receveurs ayant développé (DPG+) ou non (DPG-) une DPG. Échelles 20 µm. C. Un index d'expression de ce marqueur est donné pour les cellules alvéolaires isolées des GD en fonction des paramètres d'intensité, de la localisation membranaire continue, du pourcentage de cellules positives et de l'homogénéité du marquage. D. Interrelations entre le niveau d'expression des canaux CFTR et le temps d'ischémie froide chez le greffon donneur et le statut DPG du receveur (DPG+ : n=11; DPG-, n=12).

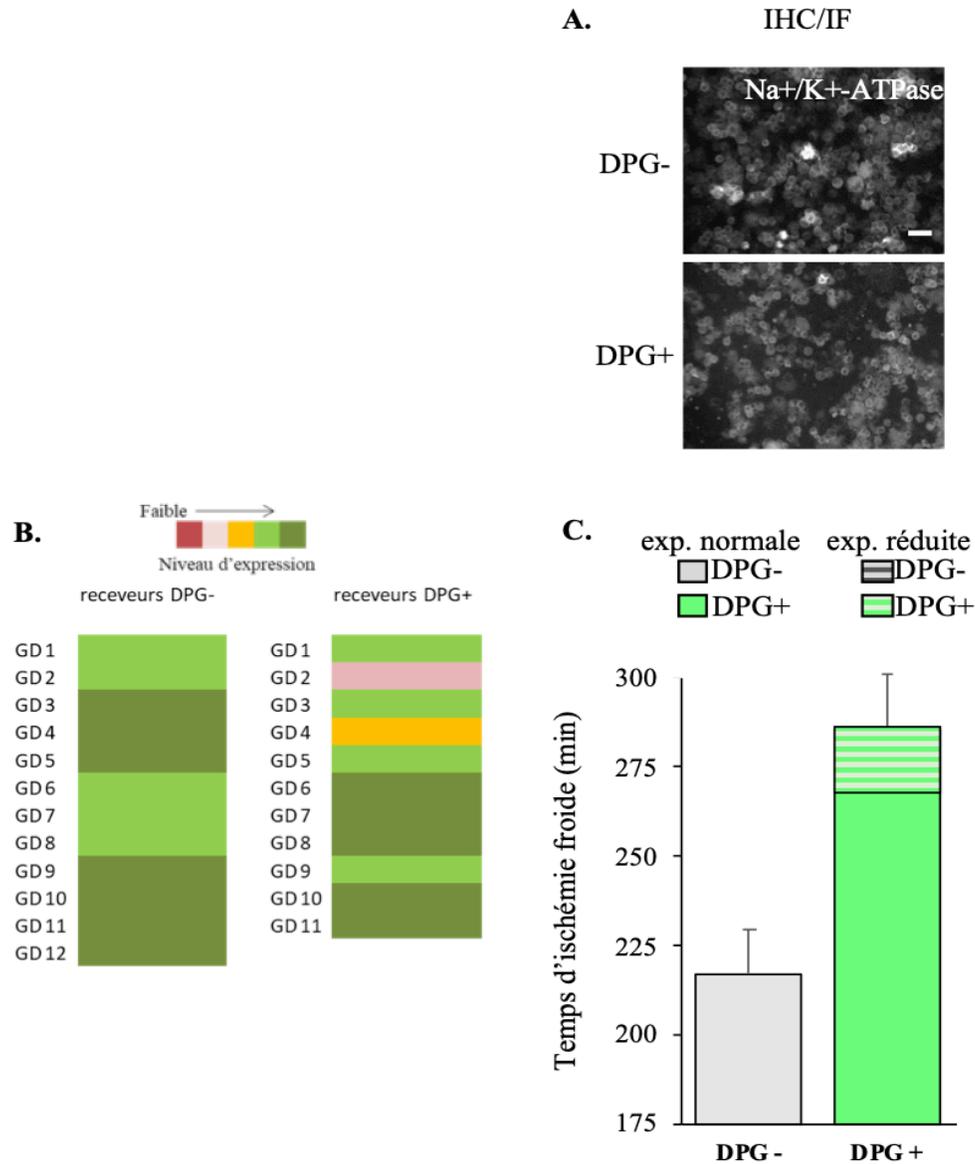


Figure 45 : L'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans les cellules alvéolaires isolées de biopsies de parenchymes de GD parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.

Photographies au microscope à épifluorescence illustrant l'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase au niveau de cellules épithéliales alvéolaires isolées (A, grossissement X400) des GD parmi les receveurs ayant développé (DPG+) ou non (DPG-) une DPG. Échelles 20 μm . B. Un index d'expression de ce marqueur est donné pour les cellules alvéolaires isolées des GD en fonction des paramètres d'intensité, de la localisation membranaire continue, du pourcentage de cellules positives et de l'homogénéité du marquage (DPG+ : n=11; DPG-, n=12). C. Aucune relation entre le niveau d'expression (exp.) de la pompe Na^+/K^+ -ATPase et le temps d'ischémie froide chez le greffon donneur et le statut DPG du receveur (DPG+ : n=11; DPG-, n=12).

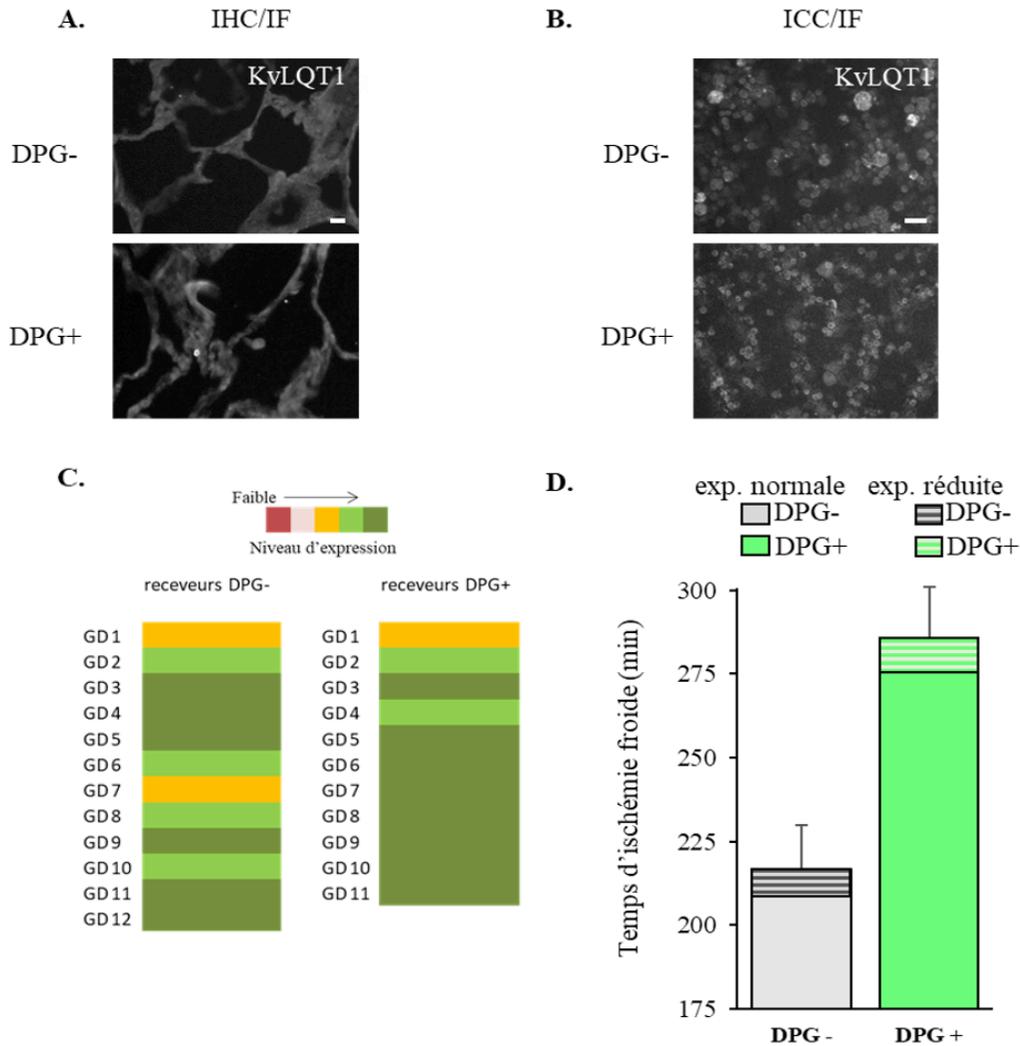


Figure 46: L'expression des canaux KvLQT1 dans les biopsies de parenchymes de GD et les cellules alvéolaires isolées de ces biopsies parmi les receveurs ayant développé ou non une DPG.

Photographies au microscope à épifluorescence illustrant l'expression des canaux KvLQT1 dans le parenchyme alvéolaire (**A**, grossissement X200) ou au niveau de cellules épithéliales alvéolaires isolées (**B**, grossissement X400) des GD parmi les receveurs ayant développé (DPG+) ou non (DPG-) une DPG. Échelles 20 μ m. **C.** Un index d'expression est donné pour les cellules alvéolaires isolées des GD en fonction des paramètres d'intensité, de la localisation membranaire continu, du pourcentage de cellules positives et de l'homogénéité du marquage (DPG+ : n=11; DPG-, n=12). **D.** Aucune relation entre le niveau d'expression des canaux KvLQT1 et le temps d'ischémie froide chez le greffon donneur et le statut DPG du receveur (DPG+ : n=11; DPG-, n=12).

5. DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos données, obtenues grâce à nos modèles cellulaires et animaux ainsi qu'un volet expérimental translationnel à partir d'échantillons humains collectés lors des transplantations, sont en accord avec notre hypothèse suivant laquelle une altération de l'épithélium alvéolaire du greffon donneur induite par l'I/R, jouerait un rôle majeur dans le développement de la dysfonction primaire du greffon chez le patient receveur suite à une transplantation pulmonaire. Ces résultats seront discutés et mis en relation avec les données de la littérature dans les sections de 5.2 à 5.7. Toutefois, les limitations de nos différents volets d'études seront d'abord abordées.

5.1. Limites expérimentales

5.1.1. Protocole I/R dans le modèle *in vitro* de culture cellulaire épithéliale alvéolaire

Le premier modèle choisi pour ce projet est un modèle *in vitro* de culture cellulaire d'ATII de rats soumis à un protocole mimant l'I/R en hyperoxie (68). Nos résultats suggèrent que ce protocole altère l'intégrité de l'épithélium alvéolaire, sa capacité de réparation ainsi que l'expression des canaux ENaC et CFTR, tandis que l'activation du KvLQT1 permet de contrecarrer en partie l'effet délétère de l'I/R. Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec précaution car le modèle, bien que reconnu (68) comporte plusieurs limitations.

L'I est mimée en conservant les cultures cellulaires à 4 °C, dans une solution de pneumoplégie (sans FBS), comme lors d'une transplantation. Toutefois, les cultures sont également placées en atmosphère 100% d'O₂. Bien qu'un tel pourcentage d'O₂ pourrait sembler excessif, une FiO₂ de 100% a été pendant longtemps utilisée pendant les transplantations pulmonaires. Ce n'est qu'en 2005 que l'ISHLT a recommandé une FiO₂ de 30 à 50% lors de prélèvements pulmonaires (62). En effet, une forte production de ROS, lors d'I à haute FiO₂, jouerait un rôle délétère particulièrement à l'étape de la reperfusion (31).

La reperfusion est mimée par un changement de milieu de culture, contenant du FBS, et une période d'incubation à 37 °C. Bien sûr, en transplantation pulmonaire, la reperfusion est plus complexe : les greffons subissent une ventilation mécanique après une période d'I, une réintroduction d'un flot d'air (mélange gazeux) dans les voies aériennes et un étirement mécanique affectant les cellules du parenchyme. Une force de cisaillement et l'étirement des vaisseaux induits par le rétablissement du flot sanguin pourraient altérer les fonctions des cellules endothéliales et musculaires lisses (65). Il pourrait aussi y avoir une communication intercellulaire par sécrétion de chimiokines/cytokines dans les greffons lors de transplantations (68). Ainsi, ce modèle cellulaire mimant l'I/R pourrait être amélioré en y ajoutant des stress mécaniques ou de cisaillement. Les cellules primaires alvéolaires sont mises en culture dans un socle de silicone (chambre d'étirement) et sont soumises par la suite à des stress mécaniques (90).

De plus, nous avons réalisé les expériences sur une monoculture de cellules alvéolaires seulement. L'ajout d'autres types cellulaires présents dans l'environnement péri-alvéolaire (cellules endothéliales) auraient permis de mieux mimer la structure complexe retrouvée *in vivo*. Nous pourrions utiliser des modèles de co-culture (bi- ou tri-), de différents types cellulaires. Par exemple, une culture de cellules alvéolaires du côté apical d'un filtre, une culture cellulaire de fibroblastes sous ce filtre et une culture de cellules endothéliales dans le fond du puits. Ce modèle nous permettrait d'étudier l'interaction entre les différentes populations cellulaires, mais également la fonction des différents canaux ioniques en mesurant le transport des ions par Ussing, en faisant différents marquages d'ICC/IF pour étudier l'expression de différents canaux ioniques. Cette méthode nous permettrait aussi de créer un modèle cellulaire inflammatoire par l'ajout de cytokines au milieu de culture et même un environnement infectieux (91). L'ajout de BAL de patients ayant développé ou non une DPG, dans des milieux de cultures cellulaires, serait également une option intéressante afin d'étudier l'impact de l'environnement inflammatoire sur la viabilité des cellules en culture, leur capacité à se réparer suite à des lésions mécaniques, leur intégrité et leur fonctionnalité. Nous mettons ainsi actuellement en place la collecte de BAL de patients ARDS, aux soins intensifs, afin d'initier ces expériences.

5.1.2. Modèles *in vivo* et *ex vivo* chez le porc

La plupart des modèles *in vivo* en recherche, utilisent les rongeurs : il existe une grande variété de rongeurs avec mutations variées, des techniques ainsi que des protocoles bien établis. Par contre, ces modèles murins présentent une disparité entre le développement, l'activation et la réponse inflammatoire suite à une insulte (92) par rapport à l'humain. En effet, une corrélation inférieure à 10% existe entre le système immunitaire murin et celui de l'Homme, tandis que le système immunitaire du porc est comparable à plus de 80%. De plus, le porc possède, tout comme l'Homme, un système immunitaire inné et adaptatif, ce qui en fait un bon modèle de transposition en recherche translationnelle (92) ainsi qu'un bon choix pour l'étude de la réponse inflammatoire suite à l'infusion de LPS. D'autre part, le porc est l'animal le plus semblable à l'homme en termes de génome et de séquences protéiques, hormis les animaux faisant partie de l'Ordre des Primates dans l'arbre phylogénique. Finalement, son anatomie et la structure du système respiratoire sont comparables à celui de l'Homme. Toutefois, le modèle porcin présente des inconvénients par rapport au modèle murin. Étant beaucoup plus onéreux et requérant une équipe multidisciplinaire qualifiée lors des journées expérimentales sur les porcs, l'échantillonnage possible (nombre de n) est donc réduit. De plus, il est moins facile d'étudier le rôle spécifique d'une protéine cible, comme c'est possible avec les modèles murins transgéniques.

Il était important de tester des modèles d'infection/inflammation chez l'animal dans notre projet afin de déterminer leur impact au niveau de l'intégrité et de la fonctionnalité l'épithélium alvéolaire, et ultimement de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des modèles d'insultes et de SDRA autres que le LPS, existent et auraient pu être utilisés dans notre étude sur l'épithélium alvéolaire. Parmi ceux-là, l'aspiration de liquide gastrique (46, 92) est reconnue comme un important facteur de risque de développement de SDRA. L'hyperoxie, stimulant des médiateurs pro-inflammatoires via la voie de signalisation de NF- κ B, est également utilisée (94). D'autres études se sont aussi penchées sur les effets d'une déplétion de surfactant par des lavages avec de la saline (93). En effet, chez un patient présentant un SDRA, les protéines de surfactant sont dysfonctionnelles, ce qui occasionne de l'atélectasie par affaissement du parenchyme pulmonaire (46, 14).

La transplantation unilatérale chez le porc pourrait constituer une limitation du modèle comparé aux transplantations pulmonaires chez l'Humain, qui sont de nos jours la plupart du temps bilatérales. En effet, dans notre cohorte de 172 patients transplantés, 2 seulement ont subi une transplantation unilatérale. En clinique, à l'exception des patients souffrant de MPOC et EMP, chez qui une transplantation unilatérale peut être envisagée, pour la plupart des autres pathologies (particulièrement FPI, HTAP Ir et IIR) une transplantation bilatérale est requise. Cette approche est préconisée puisqu'une diminution de l'espérance de vie a été observée lorsqu'une transplantation unilatérale était pratiquée dans la population HTAP IIR (95). De plus, le poumon natif pourrait difficilement supporter un greffon en présence d'un développement d'une DPG suite à une lésion d'I/R.

5.1.3. Limitation du volet translationnel chez l'humain

Notre cohorte de greffés pulmonaires comprend 172 patients (et leurs donneurs associés). Bien que cet échantillonnage commence à être conséquent, il ne contient pas un nombre suffisant pour pouvoir réaliser des analyses statistiques poussées de multivariations dans un modèle linéaire généralisé afin d'identifier des facteurs de risque indépendants. De plus, nos analyses expérimentales de biomarqueurs sur les échantillons humains étaient limitées aux transplantations pour lesquelles une pneumoréduction a dû être réalisées. Nous avons ainsi pu collecter des biopsies de 25 greffons différents. Nos analyses ont quand même permis de mettre en évidence certaines tendances qui pourront être confirmées lorsque l'échantillonnage sera augmenté. Des échantillons de parenchyme avant l'I obtenus par la méthode de biopsie transbronchiques nous permettrait de déterminer l'état du greffon avant la période d'I. et d'obtenir des informations sur les niveaux d'expression des protéines d'intégrité et de fonctionnalité épithéliales alvéolaires. Pour pallier le faible nombre d'échantillons obtenus par pneumoréduction durant les transplantations, des biopsies de parenchyme pourraient être faites en salle d'opération. La différence entre les biopsies et les échantillons de pneumoréduction serait la quantité de cellules recueillies.

Les résultats de nos expériences indiquent qu'une altération structurale et fonctionnelle des GD pourraient être préexistantes avant la transplantation chez les receveurs développant ensuite une DPG. Pour l'instant, nous ignorons quels sont les facteurs responsables de cette atteinte, bien

que le temps d'I puisse être impliqué. D'autres paramètres pourraient toutefois jouer un rôle. Malheureusement, les informations dont nous disposons concernant le donneur via Transplant7 sont limitées. Pour cette raison, nous avons proposé, et obtenu l'approbation du comité d'éthique, de recueillir de plus amples données épidémiologiques et cliniques des donneurs. Compte-tenu de la quantité de données que cela impliquera, nous nous sommes assurés de la collaboration du centre d'intégration et d'analyses médicales (CITADEL) du CHUM (dirigé par le Dr Michaël Chassé). Finalement, l'analyse d'échantillons (BAL et sang) collectés chez le donneur avant le prélèvement d'organe serait une valeur ajoutée à notre étude.

5.2. Altération de l'intégrité alvéolaire par l'ischémie reperfusion

Nos résultats indiquent que l'I entraîne une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire, que ce soit aux vues des analyses histologiques (modèle *in vivo* de transplantation chez le porc et dans les spécimens de greffons humain), démontrant un épaissement et une infiltration des parois alvéolaires ainsi qu'une baisse d'expression de la protéine d'intégrité ZO-1 observée lors des essais d'immunomarquage (dans nos 3 modèles).

La protéine ZO-1, dite « d'échafaudage » lie la myosine et l'actine à l'intérieur de la cellule, faisant partie d'un complexe protéique, incluant les protéines transmembranaires occludines et claudines, formant les jonctions serrées. Leurs rôles sont le maintien de l'intégrité intercellulaire de l'épithélium, de la voie paracellulaire et de la polarité des cellules épithéliales alvéolaires (36). Les conséquences de l'I et de l'hypoxie au niveau cellulaire (incluant une importante production de ROS, une déplétion d'ATP et une grande concentration de calcium intracellulaire) pourraient intervenir au niveau de l'interaction de ZO-1 avec ses liens avec le cytosquelette de la cellule et ainsi altérer l'intégrité de la barrière épithéliale (95, 31).

Une altération nettement plus marquée a été observée suite au protocole mimant l'I/R (comparé à l'ischémie seule) dans notre modèle *in vitro*. Des résultats plus hétérogènes ont été observés dans le modèle de transplantation chez le porc en post-reperfusion. Il a été démontré dans la littérature que la reperfusion augmente la production de ROS, le stress oxydatif, la mort cellulaire par apoptose ou nécrose ainsi que la libération de modulateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , IL-6 et TNF- α (31, 36). Les cytokines auraient un effet de remodelage au niveau des filaments d'actine et modifieraient la structure de ZO-1 et ainsi augmenteraient la

perméabilité de l'épithélium (97). Il a été observé qu'en condition de SDRA, la présence de neutrophiles dans l'espace alvéolaire modulerait l'assemblage des jonctions serrées contribuant à l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale (96). L'expression des claudines et les occludines serait également modifiée par la présence de cytokines et de facteurs de croissance (97). Dans nos expériences, nous nous sommes focalisés sur l'expression de ZO-1 mais des analyses complémentaires des claudines et occludines sont initiées.

Il a été démontré, dans certains cancers du poumon et du sein, que la relocalisation de ZO-1 dans l'espace cyto-nucléaire, lui confère un rôle de second messenger activant la voie nucléaire NF- κ B en phosphorylant les sous-unités I κ B α et p65, qui induisent l'expression de CXCL8/IL--8 (98). La voie NF- κ B est aussi impliquée dans l'expression des cytokines TNF-- α , interféron- γ (IFN- γ) et IL-1 β (93). De plus, un stress peut induire une relocalisation de la membrane vers le cytoplasme de la protéine ZO-1 et induire la voie de NF- κ B. Est-ce que l'I/R serait un stress suffisant pour induire cette voie? La réalisation de nouvelles expériences, en utilisant un modèle *in vitro* d'I/R à différents temps, seraient ainsi pertinentes. De plus, nous pourrions localiser ZO-1 avec un co-marquage WGA (marquage membranaire) afin de raffiner nos analyses. Un dosage de ZO-1 par immunobuvardage, dans la fraction purifiée de protéines membranaires, permettrait aussi d'évaluer son niveau d'expression membranaire vs cytoplasmique. Il serait également intéressant de mettre en évidence les composantes de la voie activée de NF- κ B en IHC.

Il a été montré que les jonctions d'ancrage, les jonctions *Zonula adherens* sont également altérées en présence du médiateur pro-inflammatoire TNF- α , tout comme pour ZO-1. De plus, l'augmentation de perméabilité de la barrière épithéliale et endothéliale serait exacerbée en présence de IFN- γ (96). Des analyses de ces protéines de jonctions d'ancrage auraient donc également pu être réalisées dans notre étude.

L'intégrité alvéolaire a également pu être évaluée, dans le modèle de culture cellulaire *in vitro*, par les mesures de RTE. Nos résultats montrent que celles-ci étaient abaissées dans le groupe I/R par rapport au groupe CTRL. La capacité de réparation des cultures cellulaires alvéolaires du groupe I/R s'est avérée également fortement altérée en comparaison au groupe CTRL. Nous avons pu ensuite confirmer qu'un traitement pharmacologique avec un activateur du canal KvLQT1 permettait d'augmenter la vitesse de réparation dans groupe CTRL, comme

précédemment démontré par le laboratoire (76). Nous avons ensuite pu démontrer que ce traitement était également bénéfique en condition I/R.

Tous nos résultats en I et I/R semblent indiquer une altération au niveau de l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire. D'autres études seraient intéressantes pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perte de l'étanchéité de l'épithélium alvéolaire suite à l'I.

De plus, il pourrait être intéressant de quantifier l'apoptose-nécrose cellulaire survenue suite à l'I/R, soit par les colorants fluorescents intercalant d'ADN Hoechst/iodure de propidium (99) ou à l'aide de biomarqueurs sériques indicateurs de mort cellulaire. En effet, le groupe Hashimoto (100) a identifié des biomarqueurs sériques de mort cellulaire en relation avec le développement de la DPG suite à une transplantation pulmonaire.

Ces chercheurs ont observé une relation entre les concentrations sériques de la molécules M30 associée à l'apoptose des cellules épithéliales, et M65, associée à l'apoptose et également à la nécrose des cellules épithéliales, et le degré de sévérité de la DPG. Effectivement, une concentration sérique élevée de ces biomarqueurs semblait associée à un développement de DPG de grade sévère (grade 3) de même qu'une survie à long terme diminuée chez les patients transplantés pulmonaires (100).

5.3. Altération de marqueurs de fonctionnalité par l'ischémie reperfusion

Les marqueurs de fonctionnalité de l'épithélium alvéolaire ont également été étudiés dans nos modèles. Nos analyses qualitatives et quantitatives nous ont permis de démontrer que l'expression totale des canaux ENaC est significativement altérée suite à l'I et l'I/R dans les cultures primaires alvéolaires. De plus, nous avons observé les mêmes tendances pour les canaux CFTR. De façon intéressante, l'utilisation d'un activateur du canal KvLQT1, le R-L3, semble augmenter non seulement le niveau d'expression de ZO-1 mais également des canaux ENaC et CFTR tout comme précédemment démontré au laboratoire dans des conditions physiologiques de bas (40, 24).

De façon similaire, et ce malgré l'hétérogénéité, une baisse d'ENaC et de CFTR a été observée *in vivo* suite à la transplantation ou par l'induction d'un stress inflammatoire par infusion de LPS.

En accord avec les observations des deux modèles, nous notons finalement une atteinte de l'intégrité alvéolaire présente les GD de receveurs ayant par la suite développé une DPG. En effet, nos analyses qualitatives et quantitatives ont permis d'observer une diminution importante de l'expression protéique totale de l'expression d'ENaC dans ces greffons. De plus les analyses qualitatives ont indiqué que l'expression des canaux CFTR et de la protéine ZO-1 semblaient être aussi diminuées. Il est à noter que la réduction d'ENaC et CFTR était associée également aux greffons ayant subi un temps d'I plus long, bien que de la limite de 6 heures recommandée ait été respectée (98, 88).

Les résultats obtenus semblent indiquer que l'I seule, et/ou l'I/R et un stress inflammatoire, ont un effet délétère sur l'expression totale protéique des canaux ioniques. Tout comme pour ENaC, des analyses quantitatives pourraient être effectuées sur ZO-1, CFTR et KvLQT1. L'utilisation d'un marquage membranaire, tel WGA, permettrait de discriminer la localisation de la protéine (membranaire *vs* cytoplasmique). Il serait intéressant de discriminer ce qui peut être lié à l'inflammation et/ou l'I et/ou l'I/R afin de développer des stratégies spécifiques pour contrecarrer ces effets délétères. Poursuivre l'étude de biomarqueurs tissulaires et circulants permettrait l'identification de biomarqueurs prédictifs du développement de la DPG.

5.4 Impact de l'inflammation sur l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium alvéolaire

Les analyses histologiques de spécimens de porcs et d'échantillons de greffons de donneurs parmi lesquels les receveurs ont développé une DPG indiquent la présence d'une infiltration neutrophilique. De plus, une hausse de cytokines/chimiokines a été mesurée aussi bien dans nos modèles animaux que dans les BAL de patients transplantés DPG (l'échantillonnage n'était toutefois pas suffisant pour déterminer si la hausse était statistiquement significative). Ces résultats indiquent la présence d'une réponse inflammatoire en lien avec la DPG tel que précédemment décrit dans la littérature. En effet, une infiltration neutrophilique, une présence de neutrophil extracellular traps (NETs) ou « NETosis », un œdème alvéolaire et une

perméabilité de la barrière alvéo-capillaire ont été rapportés lors du développement d'une DPG (61). Ainsi, la DPG induit une réaction inflammatoire importante, un développement d'une auto-immunité, pouvant mener à une dysfonction des greffons tardive (61).

Dans un modèle de transplantation chez le rat, il a été observé que les lymphocytes T CD4⁺ s'accumulent dans les greffons au moment de la reperfusion et qu'ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires : la présence de ces lymphocytes dans les greffons pourrait être impliquée dans les réactions de rejets aigus ou chroniques suivant la transplantation (102).

5.5. EVLP

Compte-tenu de l'effet délétère de l'I/R et de l'inflammation, nous avons voulu évaluer si une procédure de perfusion *ex vivo* du poumon (EVLP) dans notre modèle animal pouvait améliorer la condition de l'épithélium alvéolaire et restaurer l'expression des protéines clés à sa fonction. Nos observations indiquent une légère amélioration de l'expression membranaire de ZO-1, ENaC et CFTR en post-EVLP en condition de base ou LPS, sans toutefois que leurs niveaux n'atteignent ceux mesurés avant l'I.

Plusieurs études ont évalué l'efficacité de l'EVLP. Par exemple, Wong *et al.* ont étudié plusieurs voies dans l'inflammation et démontré que les voies de fonction leucocytaire ont diminué pendant toute la durée où les greffons étaient ventilés et perfusés par l'EVLP (102). Outre la possibilité de reconditionnement de greffons qualifiés de marginaux grâce à l'EVLP, cette procédure pourrait offrir également l'opportunité de devenir une plateforme pharmacologique/thérapeutique pour améliorer la qualité des greffons pré-transplantation pulmonaire et ainsi améliorer la survie du patient receveur (102). Par exemple, la réponse inflammatoire et la mort cellulaire apoptotique retrouvés en I/R pourraient devenir des cibles thérapeutiques intéressantes durant l'EVLP. Nos résultats indiquant une restauration partielle par l'EVLP seule renforcent ainsi l'idée que des approches combinées (EVLP + traitement pharmacologique) seraient bénéfiques pour la qualité du greffon. En effet ajouter des molécules anti-inflammatoires, pro-réparatrices et modulatrices des canaux CFTR et ENaC, pourraient avoir des effets bénéfiques-synergiques pendant la procédure d'EVLP afin d'améliorer la

qualité du GD. Nous proposons l'hypothèse que cet éventuel traitement puisse mener à une diminution du développement de la DPG chez le receveur donc, *in fine*, à une diminution du rejet chronique et une augmentation du taux de survie des patients post-transplantation.

5.6. Étude des facteurs et paramètres pouvant influencer le développement de la DPG

Notre cohorte de patients transplantés pulmonaires présente un taux de développement de DPG de 26% (46 sur 172), ce qui se situe dans les proportions rapportées par l'ISHLT, soit entre 10 et 30%. Parmi eux, nous avons essayé de définir quels facteurs phénotypiques du receveur ou du donneur ainsi que les procédures sur le greffon et opératoires pourraient influencer le développement d'altérations alvéolaires et de la DPG.

5.6.1. Facteurs phénotypiques et procédures réalisées chez le receveur

Dans notre cohorte, la grande majorité des pathologies des receveurs ayant nécessité une transplantation est répartie en trois groupes, 1) FP, 2) FK et 3) MPOC. Notre cohorte compte trois receveurs atteints d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) primaire (Ir) et neuf autres affectés d'une HTAP secondaire (IIr). Nos données suggèrent que l'HTAP (Ir et/ou IIr) augmente le risque de DPG (50% vs. 26% dans la cohorte générale). En accord avec notre observation, les données de la littérature indiquent qu'une pression artérielle pulmonaire moyenne élevée augmente le risque de développer une DPG (103). Diamond *et al.* l'ont ainsi identifié comme un risque de DPG indépendant quel que soit le diagnostic et l'utilisation ou non, de la circulation extracorporelle (CEC) (explications ci-dessous) (60). Cette même équipe suggère que le risque élevé de développer une DPG sévère de Grade 3, chez les patients receveurs atteints d'une HTAP IIr, serait attribué, entre autres, à des forces de cisaillement au niveau de l'endothélium et à des facteurs humoraux circulants (les protéines associées au complément, cytokines pro- et anti-inflammatoires) en lien avec une HTAP (60).

Les autres facteurs de risque importants dans le développement d'une DPG rapportés dans la littérature ont été associés aux patients receveurs ayant un index de masse corporelle élevé, un

diagnostic de sarcoïdose, fibrose pulmonaire ou d'HTAP, l'utilisation d'un support cardiopulmonaire (SCP : CEC ou extracorporel membrane oxygenation (ECMO)), une valeur de FiO_2 élevée au moment de la reperfusion des greffons, une transplantation pulmonaire unilatérale (60) ou encore des transfusions d'un grand volume de produits sanguins (104). Dans notre cohorte, nous avons voulu étudier la relation entre une SCP pendant la transplantation et le développement de la DPG chez les patients receveurs. Le nombre de greffes pour lesquelles un SCP est utilisé par rapport au nombre total de transplantations est faible, mais nous avons constaté une proportion importante (60%) de DPG suite à son utilisation. Il est décrit dans la littérature que l'utilisation de la CEC déclenche un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Le contact des éléments sanguins avec les composantes du circuit de la CEC active les cascades de coagulation et du complément. La reperfusion, suite à l'I, propage les ROS, les cytokines pro- et anti-inflammatoires menant à l'activation des leucocytes puis à une dysfonction multi-organes (102, 103).

Nos résultats préliminaires obtenus de l'étude des facteurs phénotypiques du receveur, semblent démontrer que l'HTAP, ainsi que l'utilisation d'un SCP, présentent une plus grande incidence de développement de DPG. Continuer cette étude en recueillant des données d'autres facteurs phénotypiques en relation avec le receveur (âge, sexe, index de masse corporelle, albumine) pourrait être envisager.

5.6.2 Facteurs phénotypiques du donneur et procédures sur le greffon

Des facteurs de risques provenant des patients donneurs ont également été identifiés dans la littérature tels que l'âge, soit entre 32 et 45 ans, le sexe féminin, les antécédents tabagiques, une pneumonie d'aspiration, infectieuse ou virale, une instabilité hémodynamique suivant la mort cérébrale, la durée du support de ventilation mécanique ou une grande consommation d'alcool (107). D'autres critères ont été identifiés, mais semblent avoir un moindre impact.

Nous avons analysé la fréquence de DPG en fonction de la cause du décès du donneur. D'après nos observations, la fréquence semble réduite suite à un décès par trauma crânien comparé par exemple à une AMM. Toutefois, le nombre de donneurs AMM étant très faible, nous ne pouvons confirmer par analyses statistiques que ceci est un facteur de risque.

Nos analyses en lien avec le type de don, soit DDN (avec I seulement) ou DDC (avec une I

chaude inférieure ou égale à une heure, suivie d'une I) indique un pourcentage de DPG respectivement de 25% et 31%. L'impact de l'I chaude a été discuté dans la littérature. En accord avec nos résultats, Valdivia *et al.* rapportaient une légère hausse de la DPG après un DDC sans que l'effet soit significatif. D'autre part, de précédentes études (96, 55) n'ont pas identifié de lien direct entre le type de don (DDN et DDC) et la présence de DPG chez le receveur. Ainsi, Levvey B *et al.* suggèrent que la période d'I chaude permise pourrait être allongée, en reconditionnant les greffons à l'aide de la technologie *ex-vivo* du poumons (55). Un article d'un groupe de Toronto (101) a étudié des marqueurs dans les deux types de dons dans un modèle animal *in vivo* chez le rat. D'après leurs résultats les mécanismes de dommage se manifesteraient de façons différentes. En effet, une augmentation de sécrétions de cytokines/chimiokines a été observée dans le groupe d'I ainsi qu'une baisse des niveaux d'ATP. D'un autre côté, une baisse plus marquée des réserves d'ATP ainsi qu'une dysfonction mitochondriale ont été observées dans le groupe d'I chaude.

Nos résultats ont démontré que les greffons des patients ayant développé une DPG avaient subi un temps d'I significativement plus long (bien qu'inférieure à la limite des 6H) que les patients sans DPG. Dans la littérature, les avis sont partagés quant à la relation entre l'I et la DPG (106, 107 vs 105). Contrairement à nos résultats, un groupe de cliniciens et de chercheurs associés à l'ISHLT, ont étudié et analysé des données recueillies dans 908 centres de transplantations pulmonaire et/ou cardiaque, n'a pu démontrer une relation entre le temps d'I et le développement subséquent d'une DPG. Dans la littérature, le lien de cause à effet entre l'I subie par les GD et le développement d'une DPG chez un receveur n'est pas complètement élucidé. En effet, Chambers *et al.* (111) n'a pas démontré de lien tandis que d'autres études l'ont fait (110). Dans notre projet, nous démontrons à partir de nos 2 modèles et la translation chez l'humain, une concordance avec la 2^e hypothèse.

Par contre, il semblait y avoir un lien entre l'I et des épisodes de rejets aigus qui ont pu être traités (89).

5.6.3 Relations entre nos biomarqueurs dans les GD, l'I/R et la DPG

Durant la transplantation pulmonaire, lors d'une disparité entre la taille des GD et la capacité de la cavité thoracique du patient receveur, une pneumoréduction doit être pratiquée. C'est à

partir de coupes de tissus de ces échantillons que nous avons pu réaliser des analyses histologiques et d'IHC, en IF, pour évaluer l'intégrité et la fonctionnalité de l'épithélium alvéolaire de ces greffons et de les comparer dans des groupes de receveurs ayant développé une DPG (DPG+, Grade 2/3) ou non (DPG-, Grade 0/1). Les altérations du niveau d'expression et de localisation membranaire des protéines ZO-1, ENaC et CFTR étaient presque exclusivement retrouvées dans les greffons des receveurs ayant développé une DPG.

L'altération de la barrière et des canaux ioniques impliqués dans la réabsorption liquidienne pourrait avoir un impact négatif sur la capacité de résolution de l'œdème pulmonaire. Or, un œdème alvéolaire, riche en protéines, est une manifestation du développement de la DPG (112). De plus, il a été montré que le liquide alvéolaire dans un contexte d'ARDS, induit une réduction autant au niveau de la transcription du gène qu'au niveau de la synthèse des protéines des canaux ioniques ENaC et CFTR ainsi que de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans les cellules épithéliales ATI (107). Dans un article publié en 1999, le groupe de Ware LB *et al.* (113) avait remarqué que la clairance liquidienne alvéolaire était conservée dans un groupe de patients receveurs ayant développé un œdème de R suite à la transplantation (113). La barrière épithéliale alvéolaire serait plus résistante aux insultes subies lors de la transplantation que celle de la barrière endothéliale. Ainsi, le maintien de la fonction alvéolaire aurait permis la résorption de l'œdème et un DPG transitoire.

Par contre, le groupe Sugita M. *et al.* (26) a démontré dans un modèle animal de transplantation pulmonaire unilatérale chez le chien une diminution significative de la clairance liquidienne alvéolaire associée avec une baisse des niveaux d'ARNm du canal ionique ENaC. L'expression de la pompe Na^+/K^+ ATP-ase n'était pas modifiée dans ce modèle, nous l'avons observé dans les greffons des patients DPG. Ces mêmes auteurs (26) ont toutefois suggéré qu'une relocalisation de la protéine Na^+/K^+ -ATPase pouvait avoir eu lieu. Cette hypothèse ne semble pas toutefois supportée par nos analyses sur les greffons illustrée à la fig. 44. Une expression normale de Na^+/K^+ -ATPase a été observée dans 21 des 23 des échantillons de GD.

Pour l'instant, nous ignorons les facteurs responsables de la régulation à la baisse d'ENaC et CFTR dans les greffons des receveurs DPG. Un environnement inflammatoire, par exemple, pourrait être impliqué. Le groupe du Dr Berthiaume a notamment rapporté de larges évidences de l'effet néfaste de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α sur l'expression d'ENaC (111, 29). D'après nos données, dans le groupe de patients ayant développé une DPG, les GD démontrant

une altération d'ENaC et CFTR avaient subi un temps d'I plus long que les greffons démontrant des niveaux ENaC et CFTR stables.

Dans notre étude, nous avons observé une baisse du niveau d'expression de CFTR chez plusieurs greffons pulmonaires (8 sur 11) avec développement de DPG. Nous n'avons pas pu déterminer si cette baisse d'expression perdurait au cours du temps après la transplantation. Ces expériences seraient importantes en particulier chez les receveurs atteints de FK. En effet, cette pathologie est causée par des mutations dans le gène codant pour la protéine CFTR. La transplantation d'un nouveau greffon avec expression altérée de CFTR serait potentiellement délétère chez ces patients.

De façon générale, l'étude longitudinale de l'expression de nos marqueurs d'intérêt (ZO-1, ENaC et CFTR) et de dommages/inflammation (RAGE, HMGB1 et cytokines pro-inflammatoires) en post-transplantation dans des biopsies ou des lavages broncho-alvéolaires seraient intéressantes pour déterminer s'il existe une association entre cette altération, la DPG et à plus à long terme un rejet chronique. En effet, la DPG est associée à un risque élevé de développement de la bronchiolite oblitérante (BOS), l'un des facteurs responsables d'une survie diminuée post-transplantation pulmonaire (108).

Une fois ces biomarqueurs et cibles thérapeutiques identifiées, il serait important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de contrer soit l'effet délétère de l'inflammation, de prévenir le développement des dommages alvéolaires et/ou endothéliaux, et/ou de contrer les altérations des canaux ENaC et CFTR. Basé sur nos travaux démontrant un effet pro-réparateur des activateurs des canaux potassiques (43, 42) ainsi que la présente étude), qui permettent également de stimuler l'absorption ionique et liquidienne (24, 27), l'utilisation de tels composés pourrait être envisagée.

Malgré le petit nombre d'échantillons dans nos modèles *in vivo*, *in vitro* et translationnel chez l'humain et l'impossibilité de réaliser des analyses statistiques sur tous les paramètres, nos résultats obtenus nous ont toutefois permis de révéler impact délétère de l'ischémie froide seule sur l'intégrité épithéliale alvéolaire et sur l'expression des canaux ioniques important pour la fonctionnalité de l'épithélium. Mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires

liés à cet effet néfaste, pourrait non seulement révéler des biomarqueurs prédictifs, mais également de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Mon étude a également permis de démontrer, pour la première fois, qu'une atteinte de l'épithélium alvéolaire des greffons donneurs étaient d'ores et déjà présente en période post--ischémie froide avant la transplantation pulmonaire parmi les receveurs qui développeront par la suite une dysfonction primaire du greffon. Une des futures perspectives seraient de déterminer si cette atteinte de l'expression de ces canaux ioniques, en particulier CFTR, perdure, à long terme, après la transplantation de ces greffons chez le patient receveur, notamment chez les patients FK chez qui le gène *Cftr* est muté ainsi que les patients MPOC dont il est aujourd'hui bien reconnu qu'ils ont un défaut de CFTR acquis (85).

La transplantation pulmonaire est complexe; plusieurs facteurs sont à prendre en compte : l'état du donneur, l'état des greffons, la transplantation en soit et l'état du receveur. Le développement d'une dysfonction primaire du greffon n'est pas seulement lié à l'ischémie froide mais peut-être causée par d'autres facteurs, il demeure donc essentiel d'étudier d'autres facteurs phénotypiques du donneur d'organes (cause du décès, état inflammatoire, traitement pharmacologique, comorbidités, état de santé *etc.*), liés au greffon et interventions pré-transplantation, liés à la transplantation (transfusions sanguines, utilisation de SCP *etc.*) et liés au receveur transplanté (données épidémiologiques, état inflammatoire et infectieux, temps de ventilation mécanique, temps d'hospitalisation aux soins intensifs *etc.*). Identifier tous ces facteurs responsables du développement d'une dysfonction primaire du greffon pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques contrecarrant ainsi le développement d'une dysfonction primaire du greffon le rejet chronique et, par le fait même, augmenterait la survie post-transplantation.

Notre but ultime est de développer de nouvelles stratégies pour restaurer l'intégrité et la fonctionnalité alvéolaire en ciblant ces mêmes protéines impliquées dans ces mécanismes et de prévenir, *in fine*, le développement d'une dysfonction primaire du greffon chez le patient transplanté pulmonaire.

6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ahya VN, Diamond JM. Lung Transplantation. *Med Clin N Am*. 2019;103:425–33.
2. Porteous MK, Diamond JM, Christie JD. Primary graft dysfunction: Lessons learned about the first 72h after lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(5):506–14.
3. Lumb AB. Chapter 1 - Functional Anatomy of the Respiratory Tract. In: Lumb ABBT-NARP (Eighth E, editor. *Nunn's Applied Respiratory Physiology (Eighth Edition)*. Elsevier; 2017. p. 3--16.e1.
4. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal drug delivery: How, why and what for? *J Pharm Pharm Sci*. 2009;12(3):288–311.
5. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*. 2018;560(7718):319–24.
6. Hamid Q, Shannon J, Martin J. Histology and gross anatomy of the respiratory tract. *Physiol Basis Respir*. 2005;1–14.
7. Widdicombe JH. Regulation of the depth and composition of airway surface liquid. *J Anat*. 2002;201(4):313–8.
8. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2003;445(4):495–8.
9. Aung HH, Sivakumar A, Gholami SK, Venkateswaran SP, Gorain B, Shadab. An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. Elsevier Inc.; 2019. 1–20 p.
10. Adam D, Perotin J-M, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. Regeneration of airway epithelium | Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Rev Mal Respir*. 2014;31(4):300–11.
11. McElroy MC, Kasper M. The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair. *Eur Respir J*. 2004;24(4):664–73.
12. Saumon G. L' 'épithélium alvéolaire lors des œdèmes pulmonaires. 1999;15(1):778–87.
13. Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, et al. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J*. 1995;8(1):127–49.
14. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: Defender of the alveolus revisited. *Respir Res*. 2001;2(1):33–46.
15. Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneaux PL. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*. 2020;160(2):171–82.
16. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008;1778(3):572–87.
17. BéruBé K, Prytherch Z, Job C, Hughes T. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*. 2010;278(3):311–8.
18. Goodenough D, Paul D. Gap Junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(1):1–19.
19. Koval M. Sharing signals: Connecting lung epithelial cells with gap junction channels. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:L875-93.
20. Trac PT, Thai TL, Linck V, Zou L, Greenlee M, Yue Q, et al. Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ α -ENaC channels and contribute to AFC. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2017;312(6):L797–811.

21. Alexander S, Mathie A, Peters J. Guide to Receptors and Channels (GRAC). Vol. 3rd ed., Guide to Receptors and Channels (GRAC). 2008. 112–45 p.
22. Dagenais A, Boncoeur É, Berthiaume Y. Transport du Na⁺ dans les poumons. *Médecine/Sciences*. 2009;25(10):815–20.
23. Y B, Matthay M. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;159(3):350–9.
24. Leroy C, Privé A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(6):1207–19.
25. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2).
26. Sugita M, Ferraro P, Dagenais A, Clermont ME, Barbry P, Michel RP, et al. Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1440–50.
27. Bardou O, Privé A, Migneault F, Roy-Camille K, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2012;1818(7):1682–90.
28. Boncoeur É, Tardif V, Tessier MC, Morneau F, Lavoie J, Gendreau-Berthiaume E, et al. Modulation of epithelial sodium channel activity by lipopolysaccharide in alveolar type II cells: Involvement of purinergic signaling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(3):417–26.
29. Dagenais A, Fréchette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, et al. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF- α in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Feb;286(2 30-2).
30. Vadász I, Raviv S, Sznajder JI. Alveolar epithelium and Na,K-ATPase in acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2007;33(7):1243–51.
31. Gennai S, Pison C, Briot R. Lésions d'ischémie-reperfusion en transplantation pulmonaire. *Press Medicales*. 2014;43(9):921–30.
32. Adam D, Bilodeau C, Sognigbé L, Maillé É, Ruffin M, Brochiero E. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J Cyst Fibros*. 2018;17(6):705–14.
33. Trinh NTN, Bardou O, Privé A, Maillé E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J*. 2012;40(6):1390–400.
34. Hwang TC, Sheppard DN. Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol*. 2009;587(10):2151–61.
35. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:701–26.
36. Shen ZY, Zhang J, Song HL, Zheng WP. Bone-marrow mesenchymal stem cells reduce rat intestinal ischemia-reperfusion injury, ZO-1 downregulation and tight junction disruption via a TNF- α -regulated mechanism. *World J Gastroenterol*. 2013;19(23):3583–95.
37. Jin W, Song Y, Bai C, Jiang J. Novel role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in alveolar fluid clearance in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Respirology*. 2013;18(6):978–82.

38. Fang X, Song Y, Hirsch J, Galietta LJV, Pedemonte N, Zemans RL, et al. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(2):242–9.
39. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(1):93–115.
40. Bardou O, Ngan Trinh NT, Brochiero E. Canaux potassiques et physiologie de l'épithélium respiratoire. *Medecine/Sciences*. 2009;25(4):391–7.
41. Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: From gene to physiological function. *Physiology*. 2005;20(6):408–16.
42. Girault A, Brochiero E. Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2014;306(4).
43. Trinh NTN, Privé A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, et al. Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(4):870–82.
44. Zemans RL, Downey GP. Injury and Repair. Sixth Edit. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. Elsevier Inc.; 2016. 251-260.e9 p.
45. Selman M, Pardo A. The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal*. 2020;66(November 2019):1–12.
46. Matthay MA et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2019;5(18):1–22.
47. Meyer KC. Recent advances in lung transplantation. Vol. 7, F1000Research. NLM (Medline); 2018. p. 1–11.
48. 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 Hear Lung Transplant*. 2019;38(10):1042–55.
49. Cantu E, Diamond JM, Suzuki Y, Lasky J, Schaufler C, Lim B, et al. Quantitative evidence for revising the definition of primary graft dysfunction after lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(2):235–43.
50. Van Raemdonck D, Keshavjee S, Levvey B, Cherikh WS, Snell G, Erasmus M, et al. Donation after circulatory death in lung transplantation—five-year follow-up from ISHLT Registry. *J Hear Lung Transplant*. 2019 Dec 1;38(12):1235–45.
51. Jawitz OK, Raman V, Barac Y, Mulvihill MS, Moore C, Choi AY, et al. Impact of Donor Brain Death Duration on Outcomes After Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2019 Nov;108(5):1519–27.
52. Fakhro M, Ingemansson R, Algotsson L, Lindstedt S. ABO-Identical Matching Has No Superiority in Survival in Comparison to ABO-Compatible Matching in Lung Transplantation. *J Hear Lung Transplant*. 2017;36(4):S315.
53. Snyder L. Antribody desensitization therapy in highly sensitized lung transplant candidates. *Am J Transplant*. 2014;14(4):849–56.
54. Dick A, Humpe A, Kauke T. Impact, Screening, and Therapy of HLA Antibodies in Patients before and after Lung Transplantation. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019;46(5):337–46.
55. Levvey B, Keshavjee S, Cypel M, Robinson A, Erasmus M, Glanville A, et al. Influence of lung donor agonal and warm ischemic times on early mortality: Analyses from the ISHLT DCD Lung Transplant Registry. *J Hear Lung Transplant*. 2019;38(1):26–34.

56. Hwang SH, Lee JG, Kim TH, Paik HC, Park CH, Haam S. Hwang 2015 LTx TLC vs TLC by CT. 2016;57(4):963–7.
57. Padilla AM, Padilla JD. Lung Preservation: Current Practices. Arch Bronconeumol ((English Ed. 2004;40(2):86–93.
58. Nguyen DC, Loor G, Carrott P, Shafii A. Review of donor and recipient surgical procedures in lung transplantation. Vol. 11, Journal of Thoracic Disease. AME Publishing Company; 2019. p. S1810–6.
59. Snell GI, Yusen 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 Hear Lung Transpl. 2017;36:1097–103.
60. Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, Shah RJ, Localio AR, Bellamy SL, et al. Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187(5):527–34.
61. Bharat A, Kreisel D. Immunopathogenesis of Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation. Ann Thorac Surg. 2018;105(3):671–4.
62. De Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: Donor-related risk factors and markers. J Hear Lung Transplant. 2005;24(10):1460–7.
63. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167(4):490–511.
64. Iskender I, Cosgun T, Arni S, Trinkwitz M, Fehlings S, Yamada Y, et al. Cytokine filtration modulates pulmonary metabolism and edema formation during ex vivo lung perfusion. J Hear Lung Transplant. 2018;37(2):283–91.
65. Chatterjee S et al. Shear stress-related mechanosignaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014;(19).
66. Lunardi F, Rebusso A, Pezzuto F, Ferrigno P, Fortarezza F, Comacchio G, et al. Lung Transplantation after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Single-Centre Experience. J Hear Lung Transplant. 2020 Apr;39(4):S501.
67. Ali HA, Pavlisko EN, Snyder LD, Frank M, Palmer SM. Complement system in lung transplantation. Clin Transplant. 2018;32(4):1–13.
68. Cardella JA, Keshavjee S, Mourgeon E, Cassivi SD, Fischer S, Isowa N, et al. A novel cell culture model for studying ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. J Appl Physiol. 2000;89(4):1553–60.
69. Den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: A molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2010;299(5):H1283-99.
70. Porteous MK, Lee JC. Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation. Clin Chest Med. 2017;38(4):641–54.
71. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function in transepithelial transport of K ATP channels in alveolar epithelial cells. Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol. 2004;286(5 30-5):1027–37.
72. Feng ZP, Clark RB, Berthiaume Y. Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1993;9(3):248–54.

73. Gonçalves-Ferri WA, Jauregui A, Martins-Celini FP, Sansano I, Fabro AT, Sacramento EMF, et al. Analysis of different levels of positive end-expiratory pressure during lung retrieval for transplantation: an experimental study. *Brazilian J Med Biol Res.* 2019;52(7):1–7.
74. Mariscal A, Caldarone L, Tikkanen J, Nakajima D, Chen M, Yeung J, et al. Pig lung transplant survival model. *Nat Protoc.* 2018;13(8):1814–28.
75. D’Cunha H, Rojas M. Ex Vivo Lung Perfusion: Past, Present, and Future. *ASAIO J.* 2018;64:135–9.
76. Trinh NTN, Privé A, Maillé E, Noël J, Brochiero E. EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(5):L866–80.
77. Ruffin M, Bilodeau C, Maillé É, LaFayette SL, McKay GA, Trinh NTN, et al. Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair. *FASEB J.* 2016;30(9):3011–25.
78. Kuiper JW, Plötz FB, Groeneveld AJ, Haitisma JJ, Jothy S, Vaschetto R, et al. High tidal volume mechanical ventilation-induced lung injury in rats is greater after acid instillation than after sepsis-induced acute lung injury, but does not increase systemic inflammation: An experimental study. *BMC Anesthesiol.* 2011;11(26):1–10.
79. Barroca H. Cytospin technique. In: *Cytopathology.* Springer I. Springer International Publishing; 2017. p. 107–10.
80. Tarnowski B, FG S, JH N. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem.* 1991;66(6):296–302.
81. Palu’ G, Valisena S, Barcellona ML, Masotti L, Meloni GA. DAPI - pUC8 complex: A tool to investigate biological effects of nucleic acid-drug interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;145(1):40–5.
82. Frick AE, Verleden SE, Ordies S, Sacreas A, Vos R, Verleden GM, et al. Early protein expression profile in bronchoalveolar lavage fluid and clinical outcomes in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2020;58(2):379–88.
83. Hallsten J, Vigneswaran WT. Cytokine biomarkers as indicators of Primary Graft Dysfunction, Acute Rejection, and Chronic Lung Allograft Dysfunction in Lung Transplant recipients: a review. In: Vitin A (University of W, editor. *Perioperative care for organ transplant recipient.* IntechOpen; 2019. p. 1–10.
84. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2011;208(7):1339–50.
85. De Rose V, Molloy K, Gohy S, Pilette C, Greene CM. Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1–20.
86. Définitions, classification, facteurs pronostiques. *Rev Mal Respir.* 2010;27(2010):S11–8.
87. Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: What we know and what we need to know. *Int J COPD.* 2009;4(1):19–31.
88. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoepfer MM, Loyd JE, Manes A, et al. Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(1 SUPPL. 1):S55–66.
89. 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 Hear Lung Transplant.* 2017 Oct 1;36(10):1047–59.

90. Tan JJ, Boudreault F, Adam D, Brochiero E, Grygorczyk R. Type 2 secretory cells are primary source of ATP release in mechanically stretched lung alveolar cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2020;318(1):L49–58.
91. Dekali S, Gamez C, Kortulewski T, Blazy K, Rat P, Lacroix G. Assessment of an in vitro model of pulmonary barrier to study the translocation of nanoparticles. *Toxicol Reports*. 2014;1:157–71.
92. Dumigan A, Fitzgerald M, Santos JSPG, Hamid U, O’kane CM, McAuley DF, et al. A porcine ex vivo lung perfusion model to investigate bacterial pathogenesis. *MBio*. 2019;10(6):1–19.
93. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol -- Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L379-99.
94. Pierrakos. Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathophysiology and Therapeutic Options. *J Clin Med Res*. 2012;4(1):7–16.
95. Nasir BS, Mulvihill MS, Barac YD, Bishawi M, Cox ML, Megna DJ, et al. Single lung transplantation in patients with severe secondary pulmonary hypertension. *J Hear Lung Transplant*. 2019;38(9):939–48.
96. Herrero R, Sanchez G, Lorente JA. New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury. *Ann Transl Med*. 2018;6(2):32–32.
97. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta -- Biomembr*. 2009;1788(4):864–71.
98. Lesage J, Suarez-Carmona M, Neyrinck-Leglantier D, Grelet S, Blacher S, Hunziker W, et al. Zonula occludens-1/NF- κ B/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis. *FASEB J*. 2017 Apr;31(4):1678–88.
99. Cummings B, Wills L, Schnellmann R. Measurement of cell death in mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*. 2004;25(1):12.8.1-12.8.22.
100. Hashimoto K, Besla R, Zamel R, Juvet S, Kim H, Azad S, et al. Circulating cell death biomarkers may predict survival in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(1):97–105.
101. Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: Apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann Surg*. 2000;231(3):424–31.
102. Wong A, Zamel R, Yeung J, Bader GD, Dos Santos CC, Bai X, et al. Potential therapeutic targets for lung repair during human ex vivo lung perfusion. *Eur Respir J*. 2020;55(4):1–10.
103. Morrison MI, Pither TL, Fisher AJ. Pathophysiology and classification of primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Dis*. 2017;9(10):4084–97.
104. Shah RJ, Diamond JM, Cantu E, Lee JC, Lederer DJ, Lama VN, et al. Latent class analysis identifies distinct phenotypes of primary graft dysfunction after lung transplantation. *Chest*. 2013;144(2):616–22.
105. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: Pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2002;21(2):232–44.
106. Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PLB, Jawad N, Vincent C, et al. The Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Part 1-Mechanisms of Pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009;23(2):223–31.
107. Lee JC, Christie JD. Primary graft dysfunction. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(1):39–46.
108. Morrison MI, Pither TL, Fisher AJ. Pathophysiology and classification of primary graft

- dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2017;9(10):4084–97.
109. Grimm JC, Valero V, Kilic A, Magruder JT, Merlo CA, Shah PD, et al. Association between prolonged graft ischemia and primary graft failure or survival following lung transplantation. *JAMA Surg.* 2015;150(6):547–53.
 110. Fiser SM, Kron IL, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Cassada DC, et al. Influence of graft ischemic time on outcomes following lung transplantation. *J Hear Lung Transplant.* 2001;20(12):1291–6.
 111. 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 Hear Lung Transplant [Internet].* 2017;36(10):1047–59.
 112. Schreiber ML. Acute respiratory distress syndrome. *MEDSURG Nurs.* 2018;27(1):59-60,65.
 113. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(3):980–8.
 114. Dagenais A, Fréchette R, Clermont ME, Massé C, Privé A, Brochiero E, et al. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(6):1220–31.