

Université de Montréal

**Impact des NET dans la dysfonction primaire du greffon
post-transplantation pulmonaire chez l'humain**

Par
Steven Bonneau

Programme Sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention
du grade de Maîtrise en Sciences Biomédicales, Option Médecine expérimentale

Mai 2022

© Steven Bonneau, 2022

Université de Montréal

Département des sciences biomédicales, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Rôle des NET dans la dysfonction primaire du greffon
post-transplantation pulmonaire chez l'humain**

Présenté par

Steven Bonneau

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Nathalie Arbour

Présidente-rapporteure

Martin G. Sirois

Directeur de recherche

Nicolas Noiseux

Codirecteur

Martin Pelletier

Membre du jury

RÉSUMÉ

Introduction: La dysfonction primaire du greffon (DPG) pulmonaire se caractérise par des dommages alvéolaires et endothéliaux avec œdème pulmonaire et hypoxémie. La DPG sévère affecte ~30% des receveurs parmi lesquels le tiers vont en décéder. Des études animales suggèrent que les neutrophiles contribuent au processus via les pièges extracellulaires de neutrophiles (*neutrophil extracellular trap* - NET). Les NET sont des filaments d'ADN ornés de protéines inflammatoires pouvant mener à l'occlusion vasculaire. Notre objectif principal est de corréler la NETose avec l'évolution clinique des receveurs.

Méthodes: Des renseignements cliniques et des prélèvements veineux chez les donneurs et les receveurs (n=36) ont été collectés pré-, intra- et post-greffe (0 à 72h). Les cytokines induisant la NETose (interleukines [IL-6, CXCL8/IL-8], Protéine C Réactive [CRP]) et les marqueurs de NET (myéloperoxidase [MPO], *cell-free DNA* [cfDNA] et complexes MPO-ADN) ont été quantifiés par ELISA. Lorsque des biopsies de greffons pulmonaires étaient disponibles, la présence de neutrophiles activés et de NET a été évaluée par histologie, immunohistochimie et immunofluorescence.

Résultats: Les biopsies de greffons pulmonaires ont présenté des degrés variables d'occlusion vasculaire avec des neutrophiles en NETose. Chez les receveurs pendant et après la greffe, les niveaux sanguins d'interleukines (IL-6, CXCL8/IL-8) et les marqueurs de NET (MPO, cfDNA et MPO-ADN) sont jusqu'à quatre fois plus élevés chez les receveurs avec DPG3 que chez les non-DPG3 (p = 0.041 à 0.001).

Conclusions: Des élévations des NET sont associées à la DPG3. Ces biomarqueurs pourraient être mesurés pour cibler les receveurs à risque qui bénéficieraient de thérapies préventives.

Mots-clés: Transplantation pulmonaire, Dysfonction primaire du greffon, *Neutrophil extracellular traps*, Neutrophiles, Inflammation, Ischémie-reperfusion.

ABSTRACT

Background: Primary graft dysfunction (PGD) is characterized by alveolar epithelial and vascular endothelial damage and inflammation, lung edema and hypoxemia. Up to one-third of recipients develop the most severe form of PGD (Grade 3; PGD3). Animal studies suggest that neutrophils contribute to the inflammatory process through neutrophil extracellular traps (NETs) release (NETosis). NETs are composed of DNA filaments decorated with granular proteins contributing to vascular occlusion associated to PGD. The main objective was to correlate NETosis with recipient PGD3 development in a prospective exploratory study.

Methods: Clinical data and blood samples were collected from donors and recipients pre-, intra- and postoperatively (up to 72hrs). Inflammatory inducers of NETs' release (interleukins [IL-6, CXCL8/IL-8] and C-reactive protein [CRP]) and components (myeloperoxidase [MPO], MPO-DNA complexes, cell-free DNA [cfDNA]) were quantified by ELISA. When available, histology, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques were performed on lung biopsies from donor graft collected during the surgery to evaluate the presence of activated neutrophils and NETs.

Results: Lung biopsies from donor grafts collected during transplantation presented various degrees of vascular occlusion including neutrophils undergoing NETosis. Also, in recipients intra- and post-operatively, circulating inflammatory (IL-6, CXCL8/IL-8) and NETosis biomarkers (MPO-DNA, MPO, cfDNA) were up to 4-fold higher in PGD3 recipients compared to non-PGD3 ($p = 0.041$ to 0.001).

Conclusion: Perioperative elevation of NETosis biomarkers is associated with PGD3 following human lung transplantation. These biomarkers might serve to identify recipients at risk of PGD3 and initiate preventive therapies.

Keywords: Lung transplantation, Primary graft dysfunction, Neutrophil extracellular traps, Neutrophils, Inflammation, Ischemia-reperfusion.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	5
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	15
REMERCIEMENTS	21
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	23
1.1 Le poumon	25
Anatomie.....	25
Histologie.....	27
Physiologie.....	29
Survol de certaines pneumopathies chroniques	32
1.2 Transplantation pulmonaire	36
Sélection du donneur et du receveur.....	36
Déroulement d'une greffe pulmonaire.....	39
Complications chirurgicales.....	41
Autres complications	43
1.3 Dysfonction primaire du greffon	45
Définition	45
Incidence, mortalité et autres complications.....	46
Facteurs de risque	48
L'ischémie-reperfusion.....	50

Biomarqueurs pronostiques	53
Traitement.....	54
1.4 Neutrophiles.....	57
La cinétique des neutrophiles dans le sang.....	57
La migration tissulaire des neutrophiles	59
1.5 Pièges extracellulaires des neutrophiles (NET)	61
La synthèse et la libération des NET	62
Les NET dans l'inflammation vasculaire	64
Les NET dans le poumon.....	65
Les NET dans la transplantation d'organes solides	68
Dégradation des NET.....	70
1.6 Objectifs de recherche	71
CHAPITRE 2 : ARTICLE	73
2.1 Abstract	78
Résumé	79
2.2 Introduction	80
2.3 Material and methods	82
2.4 Results	86
2.5 Discussion.....	89
2.6 Declarations	93
<i>Disclosure statement</i>	<i>93</i>
<i>Authors' contributions.....</i>	<i>93</i>
<i>Acknowledgments</i>	<i>94</i>
2.7 Tables & Figures	95
2.8 References	102

CHAPITRE 3 : DISCUSSION	109
3.1 Résumé de nos principales observations	111
3.2 L'occlusion vasculaire des greffons	111
3.3 Les NET circulants et la DPG	112
3.4 Nouveaux biomarqueurs potentiels de DPG.....	115
3.5 Limitations	116
CHAPITRE 4 : CONCLUSION	119
4.1 Perspectives.....	121
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Complications chirurgicales de la greffe pulmonaire.....	42
Tableau 2. Définition de la dysfonction primaire du greffon (DPG).....	45
Tableau 3. Incidence et mortalité de la DPG.	47
Tableau 4. Facteurs de risque cliniques de la DPG.....	48

ARTICLE

Table 1. Preoperative characteristics of donors and recipients	95
Table 2. Intra- and postoperative characteristics of recipients.....	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structure du système respiratoire humain.	25
Figure 1.2. Structure et fonction de l'alvéole.	26
Figure 1.3. Les zones pulmonaires de West.	31
Figure 1.4. L'œdème alvéolaire.	52
Figure 1.5. Biomarqueurs associés à la DPG.	53
Figure 1.6. La diapédèse du neutrophile.	59
Figure 1.7. <i>Neutrophil extracellular traps</i>	61
Figure 1.8. Les voies de NETose.	62

ARTICLE

Figure 1. Neutrophil and NETs-mediated vessel occlusion in grafts prior to transplant.	97
Figure 2. Neutrophil-platelet and NETs endothelium interactions in a lung graft prior to transplant in a recipient who subsequently developed PGD3.	98
Figure 3. Pre-, intra- and postoperative serum levels of NETosis (<i>A, B, C</i>) and inflammatory (<i>D, E, F</i>) biomarkers in donors (<i>n</i> = 25) and recipients (<i>n</i> = 36).	99
Figure 4. Pre- and postoperative circulating neutrophils (<i>A</i>), lymphocytes (<i>B</i>) and platelets (<i>C</i>) in recipients (<i>n</i> = 36).	100
Figure 5. Prediction of PGD3 onset based on early postoperative (3hrs) values of NETosis biomarkers and inflammatory cytokines inducing NETosis.	101

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ALT	Alanine aminotransferase
AMM	Aide médicale à mourir
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARDS	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
BAL	Lavage broncho-alvéolaire
BOS	Syndrome de bronchiolite oblitérante
CD	Cluster de différenciation
CEC	Circulation extracorporelle
cfDNA	ADN libre
CHUM	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CitH3	Histone citrullinée H3
CLAD	Dysfonction chronique du greffon pulmonaire
COVID-19	Maladie à coronavirus 2019
CR	Protéine réceptrice de complément
CRCHUM	Centre de Recherche – Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CRP	Protéine C réactive
CXCL	Ligand du motif C-X-C
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DDC	Don d'organes après un décès cardiocirculatoire
DDN	Don d'organes après un décès neurologique
DNAse	Désoxyribonucléase
dsDNA	ADN double-brin
DPG	Dysfonction primaire du greffon
ECMO	Oxygénation par membrane extracorporelle
ELISA	Technique d'immunoabsorption par enzyme liée
ENaC	Canal sodique épithélial
EVLP	Perfusion <i>ex-vivo</i> des poumons
FiO ₂	Fraction inspirée en O ₂

FK	Fibrose kystique
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
G-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies des granulocytes et des macrophages
HDN	Neutrophile à haute densité
HPS	Hématoxyline, Phloxine, Safran
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
ICAM-1	Molécule d'adhérence intercellulaire-1
IL	Interleukine
IP	Intrapéritonéal
IRI	Lésion d'ischémie-reperfusion
I/R	Ischémie-reperfusion
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>
IV	Intraveineuse
LDN	Neutrophile à faible densité
LFA-1	Antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leucotriène B ₄
LTx	Transplantation pulmonaire
Mac-1	Antigène macrophage-1
MHI	Institut de cardiologie de Montréal
MPI	Maladie pulmonaire interstitielle
MPO	Myéloperoxidase
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
NE	Élastase neutrophilique
NET	Pièges extracellulaires des neutrophiles
PAD4	Protéine arginine désiminase 4
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur de plasminogène 1
PaCO ₂	Pression partielle en CO ₂
PaO ₂	Pression partielle en O ₂

PAP	Pression artérielle pulmonaire
PBS	Tampon phosphate salin
PECAM-1	Molécule d'adhésion plaquette-cellule endothéliale 1
PEEP	Pression expiratoire positive
PGD	Dysfonction primaire du greffon
PGE ₁	Prostaglandine E ₁
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
PSGL-1	Glycoprotéine de la P-sélectine ligand 1
pTLC	Capacité pulmonaire totale prédite
RAGE	Récepteur spécifique du produit final de glycosylation avancée
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
TF	Facteur tissulaire
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRALI	Syndrome respiratoire aigu post-transfusionnel
VALI	Lésion pulmonaire induite par la ventilation
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
V/Q	Ventilation/perfusion
vWF	Facteur de von Willebrand

À mes parents,

Qui peuvent dire mission réussie

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier plusieurs acteurs significatifs qui ont, tous à leur manière, contribué à mon parcours académique et à ce travail. Pour la correction de ce mémoire, je tiens à remercier les Drs Martin Pelletier et Nathalie Arbour. Je remercie l'Université de Montréal, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) pour leurs supports financiers. Une pensée spéciale pour tous les donateurs et leurs familles, aux équipes de transplantation, à Transplant Québec et à tous les receveurs pour leur contribution à l'avancement des connaissances.

Je remercie ma famille, ma conjointe et mes amis qui, depuis plusieurs années, sont des piliers à ma réussite scolaire. Pour votre accueil chaleureux, merci aux membres du laboratoire Sirois, Dr Paul-Eduard Neagoe, Marie-Élaine Clavet-Lanthier, Benjamin Dumont, Elcha Charles et Ariane Dasilva. Merci pour votre patience et votre soutien ayant permis mon apprentissage des techniques de laboratoire. Par la pause-café quotidienne et la pizza succulente du vendredi, j'en retire l'importance des « petits » moments pour le maintien d'une équipe unie et heureuse. Merci à l'équipe de transplantation du CHUM et aux laboratoires des Drs Emmanuelle Brochiero et Pasquale Ferraro pour mon introduction au merveilleux monde de la transplantation pulmonaire. Vous avez entretenu ma curiosité et enrichi mes connaissances cliniques en dons d'organes, chirurgie et soins intensifs. Un merci spécial à Caroline Landry, ma chère amie, qui a significativement marqué mon parcours par son optimisme et ses rires contagieux, et ce même lors des nombreuses greffes aux petites heures du matin.

Je remercie mon codirecteur, Dr Nicolas Noiseux, qui a contribué à mes succès académiques grâce à son mentorat fort apprécié. Par votre dynamisme unique et votre humour sans pareil, il ne fait aucun doute que votre passage a enjolivé mon parcours avec des rencontres toujours plus agréables les unes après les autres.

Finalement, je souhaite remercier mon directeur de recherche, Dr Martin Sirois. Dans le projet, vous m'avez impliqué dans toutes les étapes sans exception. Votre générosité et votre patience dans la rédaction scientifique ont été inestimables à mes prix et bourses. Par les fameuses pratiques de présentations orales du dimanche matin, vous m'avez enseigné des valeurs

en or que j'intégrerai pour passer au prochain. À tous les niveaux, vous avez contribué à ma progression académique, scientifique et personnelle. C'est un sincère honneur et une chance inouïe de vous avoir côtoyé et, pour cela, je vous en serai éternellement reconnaissant.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Le poumon

Le poumon est un organe essentiel à l'être humain. Il est responsable d'incorporer l'O₂ dans le sang et d'éliminer le CO₂ de l'organisme. Pour y arriver, divers systèmes doivent travailler conjointement [1]. Le système nerveux régule la fréquence et le rythme respiratoire. Le système musculo-squelettique et le diaphragme modifient le volume intrathoracique et permettent les échanges d'air entre l'environnement et le poumon. Finalement, le système cardiovasculaire dirige le sang dans le poumon et distribue ensuite le sang oxygéné à tous les tissus du corps.

Anatomie

Avant d'arriver au poumon, l'air inspiré pénètre les voies respiratoires supérieures ([Figure 1.1](#)) [1, 3]. L'air entre par l'oropharynx ou le nasopharynx, traverse le larynx et pénètre dans la trachée. À ce niveau débutent les voies respiratoires inférieures et l'arbre trachéo-bronchique. L'air emprunte la trachée et pénètre la bronche souche droite ou la bronche souche gauche au niveau de la carène. Ces deux bronches principales délimitent les poumons droit et gauche. Les deux bronches souches se divisent en cinq bronches lobaires (trois bronches lobaires droites, deux bronches lobaires gauches) puis en dix-huit à vingt bronches segmentaires (dix bronches segmentaires droites, huit à dix bronches segmentaires gauches) qui délimitent respectivement les lobes pulmonaires et les segments broncho-pulmonaires. Les bronches segmentaires se divisent de 20 à 25 fois et aboutissent finalement en bronchioles terminales. Ces bronchioles terminales sont les plus étroites voies respiratoires conductrices qui ne participent pas aux échanges gazeux. Elles s'ouvrent ensuite en bronchioles respiratoires qui fournissent chacune 2 à 11 canaux alvéolaires. Ces canaux alvéolaires donnent 5 à 6 sacs alvéolaires, chacun étant composé de nombreux amas d'alvéoles. Ces alvéoles

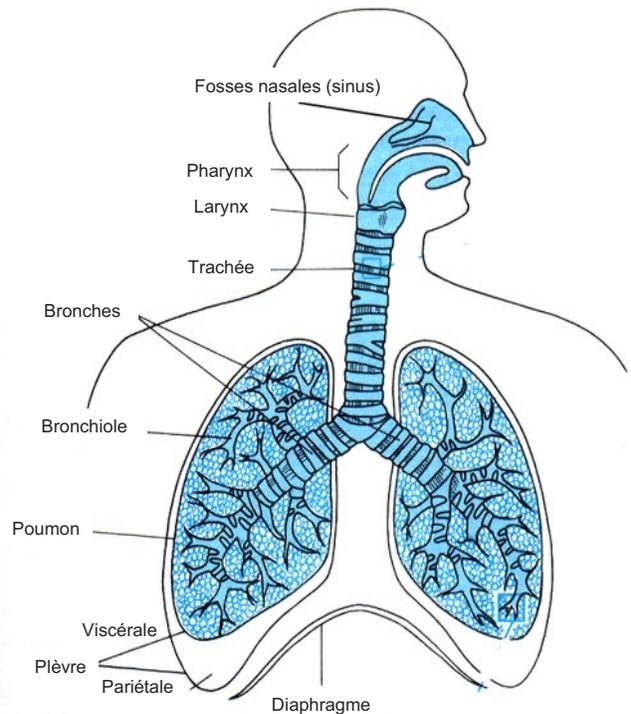


Figure 1.1. Structure du système respiratoire humain.
Figure adaptée de [2].

constituent l'unité structurelle fondamentale à l'appareil respiratoire (Figure 1.2). À ce niveau, l'air entre en contact avec les parois de l'alvéole et les capillaires alvéolaires se chargent en O_2 et se déchargent en CO_2 . Les alvéoles ont des surfaces extensives et des parois très minces, deux caractéristiques clés pour faciliter les échanges gazeux. Le nombre d'alvéoles augmente dans l'enfance et se stabilise à environ 300 millions à l'âge de 8 ans, ce qui fournit une surface d'échange comparable à un terrain de tennis. Par ailleurs, il est estimé que 87% du volume pulmonaire est alvéolaire [4].

Le sang arrive au poumon en provenance du ventricule droit par une artère pulmonaire et

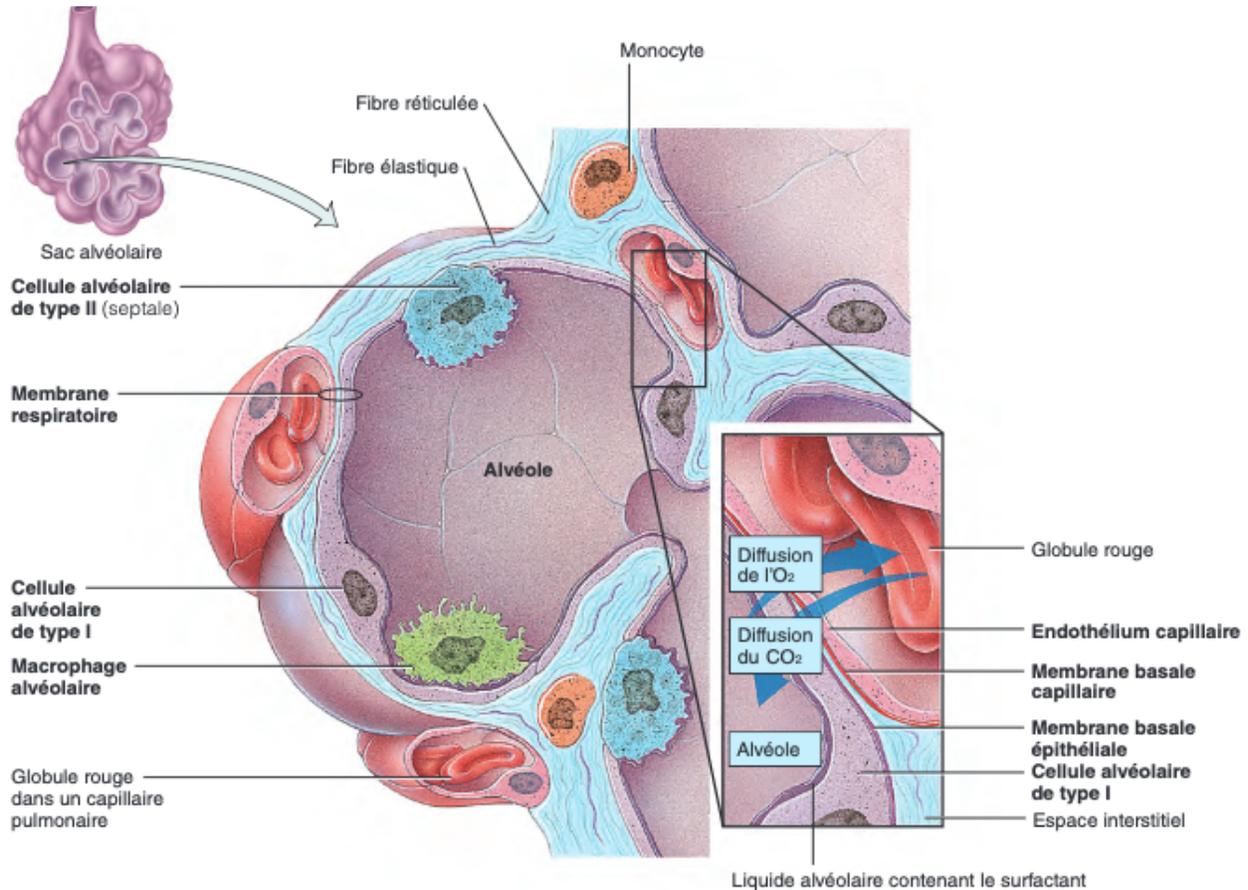


Figure 1.2. Structure et fonction de l'alvéole.

Les cellules alvéolaires de type II occupent 5% de la surface alvéolaire et modulent le transport liquidien et la sécrétion de surfactant [5, 6]. Les cellules alvéolaires de type I occupent 95% de la surface alvéolaire et participent aussi au transport des fluides. Les plus nombreux leucocytes retrouvés dans l'alvéole sont les macrophages résidents, mais on trouve aussi des mastocytes, lymphocytes et cellules dendritiques [6-8]. Les capillaires pulmonaires ont un diamètre approximatif de $6 \mu m$ et sont formés de cellules endothéliales unies par des jonctions adhérentes et serrées. Ensemble, les diverses composantes alvéolaires forment une paroi très mince ($0.4-0.5 \mu m$) qui permet la diffusion des gaz [5, 6]. Pour oxygéner le sang, l' O_2 doit diffuser à travers la barrière alvéolo-capillaire. Au contraire, le CO_2 doit traverser la barrière capilloalvéolaire pour être éliminé de l'organisme. Figure reproduite de [9].

quitte le poumon par deux veines pulmonaires pour se jeter dans l'oreillette gauche [1, 3]. Comme pour l'arbre bronchique, chaque lobe comprend une artère lobaire qui se divise ensuite en artères segmentaires puis en multiples artères sous-segmentaires et artérioles. Ce réseau artériel aboutit au vaste réseau de capillaires imbriqués dans les parois alvéolaires où ont lieu les échanges gazeux. Ensuite, les veinules puis les veines s'unissent entre elles pour former des veines de plus en plus grosses qui cheminent indépendamment des bronches et artères. Par ailleurs, outre ce réseau vasculaire propre au parenchyme pulmonaire, il existe un réseau vasculaire systémique en provenance de l'aorte qui irrigue les bronches et les plèvres avec du sang riche en O₂. Les veines propres à ce réseau bronchique rejoignent alors les veines pulmonaires ou le réseau azygos. Au niveau lymphatique, le poumon a un réseau très développé. Les plexus lymphatiques superficiels et profonds drainent la lymphe dans les nœuds trachéo-bronchiques supérieurs et inférieurs puis dans les troncs broncho-médiastinaux. Finalement, des efférences sympathiques et parasymphatiques (nerf crânien X) régulent les tonus bronchiques et vasculaires en plus de réguler les sécrétions. Des fibres afférentes communiquent aussi les stimuli irritants ou nocifs en plus de transmettre l'information des barorécepteurs et chimiorécepteurs.

Histologie

La bronche est composée de trois couches : la muqueuse, la sous-muqueuse et le cartilage [6]. La muqueuse est composée d'un épithélium pseudo-stratifié et du chorion. Les cellules ciliées sont les principales composantes de l'épithélium pseudo-stratifié et elles ont 200 à 250 cils en plus de microvillis [10, 11]. Leur rôle est de contribuer au mouvement vertical des sécrétions, de participer au transport transépithélial des fluides et des électrolytes et d'assurer une barrière physique imperméable [11, 12]. Les cellules à gobelets forment environ 25% des épithéliocytes des voies respiratoires proximales et sécrètent du mucus [10, 13]. Les cellules basales sont de rares cellules triangulaires présentes dans l'épithélium qui permettent de régénérer la couche épithéliale, lorsqu'endommagée [14, 15]. Les cellules neuroendocrines constituent moins de 1% des épithéliocytes chez l'adulte et sécrètent divers peptides (bombésine, endothéline, calcitonine, et autres) sur la face basale pour obtenir des effets locaux [16, 17]. Finalement, des macrophages, mastocytes, dendrocytes, cellules de Langerhans et lymphocytes se retrouvent dans l'épithélium bronchique [18-21]. Le chorion comprend la membrane basale, un riche réseau capillaire, des fibres nerveuses et des fibres de réticuline et d'élastine. Pour sa part, la sous-muqueuse comprend de nombreuses glandes, des fibres musculaires, du cartilage, des amas lymphocytaires et d'autres

tissus conjonctifs. Les glandes comprises sont majoritairement présentes dans les voies proximales et, avec l'aide de cellules myoépithéliales, déversent leur contenu (lysosyme, lactoferrine, transferrine, inhibiteur de protéase, et autres) dans la lumière bronchique par des canaux collecteurs [22, 23]. Au fur et à mesure que les bronches diminuent en taille, la paroi bronchique change. Le cartilage et les glandes sous-muqueuses disparaissent [23]. Les fibres musculaires migrent entre la muqueuse et la sous-muqueuse pour former la *muscularis mucosae* [24]. De même pour l'épithélium, les cellules basales, les cellules à gobelets et les cellules de Langerhans deviennent quasi inexistantes [14, 15, 21, 25].

Les bronchioles sont définies par l'absence de cartilage [6]. Nous distinguons les bronchioles membraneuses des bronchioles respiratoires, car ces dernières participent aux échanges gazeux. L'épithélium bronchiolaire membraneux comprend les cellules ciliées auxquelles s'ajoutent les cellules club. Ce sont des cellules cuboïdes qui sécrètent des protéines avec diverses fonctions régulatrices [26-28] et qui agissent à titre de cellules progénitrices [29]. Au niveau des bronchioles respiratoires, nous observons une disparition graduelle du chorion et de l'épithélium bronchiolaire [30]. Les fibres musculaires et les fibres d'élastine deviennent discontinues, mais recouvrent tout de même les canaux alvéolaires puis les alvéoles [30].

Dans les alvéoles, les pneumocytes de type I occupent 95% de la surface alvéolaire ([Figure 1.2](#)) [5, 6]. Ces cellules sont très minces et étalées (50 μm de longueur x 0,3 μm d'épaisseur), ce qui favorise les échanges gazeux. Les pneumocytes de type II, pour leur part, occupent 5% de la surface résiduelle. Elles ont des rôles divers : sécrétion du surfactant, différenciation en pneumocytes de type I, sécrétion de molécules pour la défense innée (ex. : α -antitrypsine, fibronectine) et régulation de l'inflammation [31, 32]. Les deux types de pneumocytes régulent le transport des fluides et participent à la clairance de l'œdème alvéolaire, si présent. Pour y arriver, ces cellules modulent leur expression d'aquaporines et de certains canaux ioniques à Na^+ , K^+ et Cl^- [33]. Certaines zones alvéolaires plus épaisses comportent des espaces interstitiels avec collagène, élastine et myofibroblastes. Ces cellules participent à la régulation locale du ratio ventilation/perfusion (V/Q), à la régulation des fluides interstitiels et à la production de tissus conjonctifs [34, 35]. Des macrophages résidents sont situés dans l'interstitium et la lumière alvéolaire [6]. Nonobstant les cellules épithéliales, les macrophages sont les principales cellules dans le parenchyme pulmonaire. Ils composent 95% des cellules identifiées dans un lavage

broncho-alvéolaire (BAL) sain [8]. Des mastocytes, lymphocytes et cellules dendritiques sont aussi trouvés dans l'interstitium alvéolaire [7, 8]. Finalement, les capillaires pulmonaires ont un diamètre luminal moyen de 6 μm et une longueur moyenne qui varie entre 250 et 820 μm [36]. Les endothéliocytes adjacents sont unis entre eux grâce à des jonctions adhérentes et serrées [37, 38].

Physiologie

Le rôle principal du poumon est d'oxygéner le sang et de décharger le CO_2 pour maintenir la viabilité des cellules [1]. Pour y arriver, l'organisme ajuste l'entrée et la sortie d'air en contrôlant les paramètres ventilatoires. Lors d'une inspiration normale, l'homme moyen respire 500 mL et la femme moyenne respire 400 mL. Ces volumes respectifs correspondent au volume courant. Au repos, l'humain respire à une fréquence d'environ 12 à 16 respirations/minutes, ce qui fournit un débit ventilatoire de 6 à 8 L/min. Les quantités d'air inspirées ne participent que partiellement aux échanges gazeux puisqu'il existe des espaces morts. Ces espaces morts correspondent à des régions où est entreposé l'air sans participer aux échanges gazeux. Nous distinguons l'espace mort anatomique, qui correspond à l'air contenu dans le larynx, la trachée, les bronches et certaines bronchioles, de l'espace mort pathologique, qui correspond à des régions non perfusées. Un exemple typique d'espace mort pathologique correspond à l'embolie pulmonaire massive d'une artère pulmonaire. Le poumon atteint sera ventilé, mais non perfusé, et l'air ne pourra donc pas participer aux échanges gazeux. Dans le poumon sain, environ 30% du volume courant est perdu dans ces espaces morts et le réel volume utilisé pour les échanges gazeux est d'environ 350 mL par inspiration, correspondant au volume alvéolaire. Il est donc possible d'en déduire que la ventilation alvéolaire, d'environ 4 à 5 L/min au repos, est la résultante de la fréquence respiratoire multipliée par ce volume alvéolaire. Cette ventilation alvéolaire est cruciale dans l'homéostasie du CO_2 , puisque la pression partielle en CO_2 (PaCO_2) est inversement proportionnelle à la ventilation alvéolaire. Si la ventilation alvéolaire augmente, comme dans le cas d'une hyperventilation avec crise de panique, la PaCO_2 diminue et une alcalose respiratoire peut s'installer. Si la ventilation alvéolaire diminue, comme dans le cas d'une obstruction bronchique par un corps étranger, la PaCO_2 augmente et une acidose respiratoire peut s'installer. Heureusement, des mécanismes compensatoires s'activent en réponse à ces stimuli chimiques et permettent de maintenir les valeurs de PaCO_2 et de pH dans les normes physiologiques. Finalement, il est utile de déterminer la quantité d'oxygène qui se rend à l'alvéole. Comme la

fraction inspirée d'oxygène (F_{iO_2}) dans l'air ambiant est de 21% et que la pression atmosphérique est de 760 mm Hg au niveau de la mer, la pression partielle en O_2 dans l'air inspiré s'approche à 160 mm Hg. Par l'humidification dans les voies respiratoires supérieures, cette pression partielle chute à environ 150 mm Hg à son arrivée dans les voies respiratoires inférieures. Cet air est finalement acheminé dans l'alvéole et s'équilibre avec les gaz locaux et riches en CO_2 . À terme, la pression partielle en O_2 dans l'alvéole s'approche donc à 100 mm Hg [1].

La diffusion des gaz est une composante importante de la physiologie pulmonaire et peut être réduite dans nombreuses pathologies [1]. La diffusion alvéolo-capillaire de l' O_2 est habituellement un processus rapide qui nécessite de traverser l'épithélium alvéolaire, la membrane basale, l'endothélium capillaire et la membrane du globule rouge. Ce passage est facilité par la nature très mince de la membrane alvéolo-capillaire qui est de 0.4-0.5 μm [5, 6]. En condition normale, le sang au niveau des capillaires se remplit en O_2 après seulement 0.25 seconde, ce qui équivaut au tiers du temps de transit régulier d'un érythrocyte dans le capillaire alvéolaire (0.75 seconde). Pendant ce court laps de temps, l'hémoglobine se sature en O_2 et la pression partielle en O_2 (P_{aO_2}) grimpe de 40 mm Hg à 100 mm Hg. Dans certaines pathologies où il y a un épaissement de la membrane alvéolo-capillaire (ex. : fibrose pulmonaire), la diffusion est ralentie et il est possible de quantifier cette atteinte par des épreuves respiratoires avec monoxyde de carbone [1].

La circulation sanguine pulmonaire est très distincte de la circulation systémique [1]. Les parois des artères pulmonaires sont beaucoup plus minces et confèrent une faible résistance vasculaire. Pour maintenir un débit approximatif de 5L/min au repos, le ventricule droit ne requiert donc que des pressions d'environ 15 mm Hg pour perfuser adéquatement le système vasculaire pulmonaire. Par ailleurs, la perfusion capillaire varie grandement d'une région du poumon à l'autre. En position debout, la base pulmonaire est mieux perfusée que l'apex, conséquence de la gravité qui résulte en une différence de pression de 25 mm Hg. Ce concept a d'ailleurs été approfondi et résumé par West qui a créé un modèle de perfusion pulmonaire [39]. Il a divisé le poumon en trois zones en fonction des pressions artérielles, veineuses et alvéolaires ([Figure 1.3](#)). Dans ce modèle, la zone I n'est quasiment pas perfusée puisque la pression alvéolaire surpasse la pression artérielle. Les vaisseaux fragiles sont collabés (affaissés) facilement. Dans la zone II, la pression artérielle surpasse la pression alvéolaire, mais cette

dernière est supérieure à la pression veineuse. Les extrémités veineuses des capillaires alvéolaires peuvent donc se collaber, ce qui limite la perfusion. Le gradient de perfusion correspond alors à la différence des pressions artérielles et alvéolaires. Finalement dans la zone III, la

perfusion n'est plus limitée par la pression alvéolaire et tous les vaisseaux sont perméables. Le gradient de pression correspond à la différence des pressions artérielles et veineuses. Lorsque le débit

cardiaque augmente, comme à l'exercice, les capillaires des zones I et II deviennent perméables et accueillent le débit en surplus. Dans certaines conditions pathologiques où il est impossible de recruter davantage de vaisseaux, les pressions artérielles pulmonaires augmentent et peuvent altérer la fonction cardiaque droite.

Le ratio ventilation/perfusion (V/Q) est une composante essentielle pour comprendre la physiologie pulmonaire [1]. Un ratio V/Q identique dans toutes les régions du poumon et permettant de bons échanges gazeux serait idéal. Or, telle que décrit plus tôt, la perfusion est très variable entre les régions d'un même poumon. Un constat similaire est également décrit avec la ventilation, où les bases pulmonaires sont légèrement mieux ventilées que les apex. En résultante, même dans le poumon sain, le ratio V/Q varie grandement en fonction des régions d'un même poumon. Les apex pulmonaires sont davantage ventilés (V) que perfusés (Q) (ratio V/Q d'environ 3,3) et les bases sont moins ventilées que perfusées (ratio V/Q d'environ 0,63) [1]. À l'échelle des deux poumons entiers, la composition gazeuse finale du sang veineux dans l'oreillette gauche résulte alors de la contribution de chacune des unités alvéolaires avec leurs ratios V/Q individuels. Cet équilibre peut néanmoins être perturbé dans certaines pathologies. Lors d'une embolie pulmonaire massive, un poumon entier peut avoir un ratio V/Q extrêmement élevé (ratio $V/Q \approx \infty$). Plus le ratio V/Q est élevé, plus la région agit comme un espace mort et il sera difficile d'évacuer le CO_2 . Au contraire, lors d'une obstruction bronchique par un corps

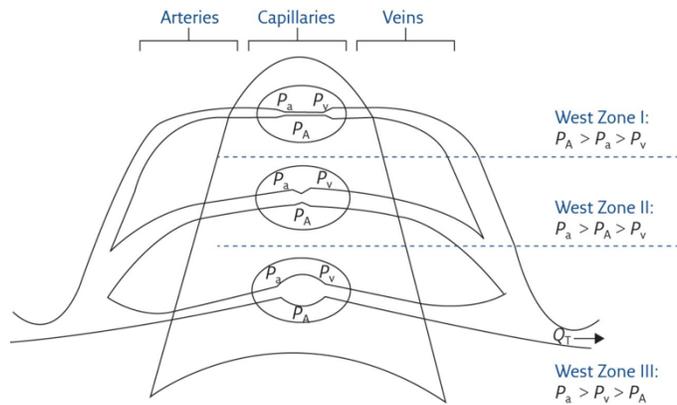


Figure 1.3. Les zones pulmonaires de West.

Le poumon est divisé en trois zones en fonction de la pression artérielle, veineuse et alvéolaire. Dans chacune des régions, il y a une différence dans la perfusion des microvaisseaux. P_A : pression alvéolaire; P_a : pression artérielle; P_v : pression veineuse. Figure reproduite de [40]. Concept original de [39].

étranger, un lobe pulmonaire complet peut avoir un ratio V/Q quasi nul (ratio V/Q \approx 0). Plus le ratio V/Q est faible, plus la région agit comme une communication anormale (shunt). Dans la région touchée, les pressions partielles entre l'alvéole et le sang s'équilibrent avec une pression partielle en CO₂ de 46 mm Hg et en O₂ de 40 mm Hg. Le sang résultant sera pauvrement saturé en O₂ et aura une pression partielle en O₂ de 40 mm Hg, mettant le patient à risque d'hypoxémie [1].

Survol de certaines pneumopathies chroniques

Plusieurs maladies chroniques touchent le système respiratoire et peuvent culminer en de l'insuffisance respiratoire terminale. Dans cette section, certaines pneumopathies communes seront abordées : asthme, maladie pulmonaire obstructive chronique, fibrose kystique, maladies pulmonaires interstitielles et hypertension pulmonaire.

L'asthme est une maladie inflammatoire du poumon caractérisée par une obstruction bronchique réversible [41]. En Amérique du Nord, 10% de la population est atteinte d'asthme [42]. La mortalité liée à l'asthme est très faible au Québec (1 décès par 100 000 habitants) mais cette maladie affecte considérablement la qualité de vie et requiert beaucoup de soins [43-45]. Des prédispositions génétiques d'atopie et des facteurs environnementaux sous-tendent le développement de l'asthme. Le diagnostic est habituellement posé par des tests de fonction respiratoire démontrant une atteinte obstructive et réversible ou une hyperréactivité bronchique à certains stimuli (méthacoline, exercice, hyperventilation, et autres). Chez l'enfant d'âge préscolaire, la complétion des épreuves respiratoires est difficile et un diagnostic présomptif est posé après deux crises répondant à la thérapie d'asthme. Différents sous-types communs d'asthme ont été identifiés : l'asthme allergique, l'asthme intrinsèque, l'asthme professionnel et l'asthme à l'exercice [41]. L'asthme allergique survient souvent dans l'enfance et peut se manifester lors des infections virales. Son pronostic est bon et la moitié des enfants n'auront plus de crises à l'adolescence [46]. L'asthme intrinsèque survient tardivement, chez l'adulte, et se manifeste par des crises plus sévères. La composante allergique est absente et les patients nécessitent souvent une corticothérapie à long terme. L'asthme professionnel est généralement induit par la sensibilisation à une substance au travail (ex. : poussières, ammoniac, isocyanates, et autres). Finalement, l'asthme à l'effort débute habituellement à l'adolescence et se caractérise par des symptômes légers [41]. Pour le traitement, le contrôle des facteurs déclenchants est

primordial. En matière de pharmacologie, une thérapie symptomatique par inhalation d'un agoniste β_2 à courte action est préconisée en présence d'asthme léger et de crises occasionnelles [1]. Pour diminuer l'inflammation, la corticothérapie par inhalation est le traitement de choix en phase de maintien et, dans le cas d'une détresse respiratoire, peut être administrée par voie orale. Parmi les thérapies de seconde ligne, on trouve entre autres un agoniste β_2 -adrénergique à longue action, un antagoniste du récepteur à leucotriène, un anticorps anti-IgE et un anticorps anti-interleukine (IL)-5 [1].

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), autrement nommée la bronchopneumopathie chronique obstructive, se caractérise par une obstruction bronchique partiellement réversible et progressive associée à une inflammation chronique [41]. Plus de 750 000 Canadiens sont atteints de la MPOC [41]. Cette maladie était la 3^e cause de mortalité aux États-Unis en 2011 [47]. Le principal facteur de risque est le tabagisme, et plus de 40% des fumeurs de 65 ans et plus souffriront de MPOC [41]. D'autres facteurs de risque sont l'exposition à certains irritants environnementaux et domestiques, et certaines anomalies génétiques dont la déficience en α_1 -antitrypsine [41]. Deux sous-types de MPOC ont été identifiés : la bronchite chronique et l'emphysème. La bronchite chronique est un diagnostic clinique qui se manifeste par des expectorations chroniques et des surinfections bronchiques à répétition. Cette entité est associée avec une hypoxémie et une hypercapnie précoce. L'emphysème, pour sa part, est un diagnostic pathologique caractérisé par une destruction irréversible des parois alvéolaires. L'imagerie par tomодensitométrie et la spirométrie peuvent fortement laisser suspecter un emphysème. La diffusion des gaz est réduite, mais le débalancement des gaz sanguins survient plus tardivement que dans la bronchite chronique. Pour traiter la MPOC, la cessation tabagique demeure la seule option qui freine la maladie [48, 49]. Les autres traitements visent principalement à diminuer la dyspnée et prévenir les exacerbations : corticothérapie inhalée, agonistes β_2 à longue action et anticholinergiques [41, 50, 51]. L'oxygène à domicile s'avère souvent nécessaire en cas d'hypoxémie réfractaire. En fin de course, la résection pulmonaire et ultimement la transplantation pulmonaire figurent parmi les options thérapeutiques disponibles pour certains patients [52].

La fibrose kystique (FK) est une maladie autosomique récessive secondaire à une mutation du gène *CFTR* qui affecte principalement le poumon et le tractus digestif [41]. Au Canada,

l'incidence de FK est d'une naissance sur 3600 et une personne sur 25 est porteuse d'une mutation du gène *CFTR* [53]. Au Québec, l'incidence de FK est encore plus grande avec 1 naissance sur 2500 [54]. Depuis plusieurs années, le taux mortalité est en déclin autant que la survie médiane est passée de 24 à 53 ans entre les années 1982 et 2017 [55]. Le canal CFTR participe directement au transport du Cl^- et du HCO_3^- et indirectement au transport de Na^+ . Une dysfonction du canal CFTR assèche le mucus et, au niveau pulmonaire, altère la clairance mucociliaire. La dysfonction du canal CFTR entraîne de surcroît une activité accrue du canal sodique épithélial (ENaC) qui assèche davantage le mucus [56, 57]. Ces anomalies favorisent la colonisation bactérienne et l'inflammation chronique dans les bronches, ce qui mène ultimement à un remodelage fibrotique avec bronchiectasies. À ce jour, plus de 2103 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées [58]. La plus fréquente est la mutation ΔF508 qui touche 90% des patients avec FK aux États-Unis [59]. Cette mutation mène à un défaut de conformation du canal CFTR dans le réticulum endoplasmique qui sera alors dégradé par le système ubiquitine-protéasome. Depuis 2018, tous les nouveau-nés québécois sont dépistés pour la FK dans le cadre du Programme québécois de dépistage néonatal sanguin. Le diagnostic est confirmé par un test standard à la sueur où une concentration de chlore de ≥ 60 mmol/L est diagnostique de FK [41]. Des tests génétiques sont ensuite conduits pour identifier la mutation causale et guider le traitement. Il n'existe aucune thérapie curative pour la FK. Des modulateurs spécifiques de CFTR ont été développés pour potentialiser (ex. : ivacaftor) et stabiliser (ex. : lumacaftor, tezacaftor, éléxacaftor) le canal CFTR et des travaux sont en cours pour accroître cet éventail thérapeutique. Récemment, une combinaison d'ivacaftor, de tezacaftor et d'éléxacaftor a été rendue disponible au Canada sous le nom de Trikafta [60]. Une étude canadienne a d'ailleurs prédit que d'ici 2030 ce médicament réduirait le nombre de décès de 15% en plus d'augmenter la survie médiane de 9 ans pour les enfants avec FK [60]. Autrement, des antibiotiques sont administrés pour les surinfections bronchiques tout comme des agents mucolytiques pour liquéfier les sécrétions et favoriser la clairance mucociliaire. En fin de parcours, la transplantation pulmonaire est disponible pour la majorité de ces patients.

Les maladies pulmonaires interstitielles (MPI) forment un ensemble de maladies hétérogènes dont la constante est une altération du parenchyme pulmonaire par les cellules inflammatoires et les fibroblastes [41, 61]. Ces pneumopathies interstitielles se caractérisent par une atteinte restrictive avec réduction des volumes pulmonaires. Il existe plus de 200 causes de MPIs qui

peuvent se classer en quatre groupes [62]. Le premier groupe correspond à des causes connues qui peuvent être environnementales (bois moisi, ferme laitière, pigeons, et autres), médicamenteuses (bléomycine, amiodarone, méthotrexate, et autres), secondaires à des vasculites, des maladies du tissu conjonctif (ex. : sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique) ou à l'irradiation, et autres. Le deuxième groupe correspond à des maladies interstitielles de causes inconnues, dites idiopathiques. La plus fréquente étant la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Le troisième groupe réfère à la sarcoïdose, et finalement, le quatrième groupe réfère à des pneumopathies très rares dont l'histiocytose à cellules de Langerhans, la lymphangioléiomyomatose, la pneumopathie à éosinophiles et autres. Parmi toutes les MPIs répertoriées, la FPI et la sarcoïdose sont les plus fréquentes [41, 63]. Les investigations de choix sont la tomodensitométrie et la spirométrie. Au besoin, le diagnostic peut être affiné grâce au BAL et à des biopsies. Le traitement est grandement variable selon l'étiologie [41]. Pour les MPIs du premier groupe, le retrait ou le contrôle de l'agent causal est primordial. Pour certaines pneumopathies, l'usage de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs peut être bénéfique. Par ailleurs, le pronostic est excessivement variable et la transplantation pulmonaire demeure une thérapie de dernier recours fréquente chez ces patients.

L'hypertension pulmonaire est définie par une pression de l'artère pulmonaire (PAP) de > 25 mm Hg au repos [41, 64]. À long terme, cette post-charge élevée cause une hypertrophie du ventricule droit qui s'avère très néfaste. Cette pathologie est suspectée en présence de dyspnée et d'intolérance à l'effort [41]. La PAP peut être estimée par échocardiographie et le diagnostic confirmé par cathétérisme cardiaque. Tout comme les maladies interstitielles, les causes d'hypertension pulmonaire sont multiples et peuvent être classées en cinq groupes [41, 65]. Dans le groupe 1, le réseau pulmonaire artériel est fautif et nous trouvons les conditions liées à une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Cette HTAP peut être d'origine génétique (*BMPR2*, *ALK1*), médicamenteuse, toxique, néonatale, et autres, ou être associée à des conditions sous-jacentes (ex. : VIH). La pathogenèse demeure mal comprise, mais des phénomènes de vasoconstriction, de remodelage vasculaire et de thrombose *in situ* sont observés [66]. Dans le groupe 2, l'hypertension pulmonaire est la conséquence d'une cardiopathie gauche. Dans le groupe 3, l'hypertension pulmonaire est secondaire à une maladie respiratoire (ex. : MPOC, MPI) ou à de l'hypoxémie chronique. Dans le groupe 4, l'hypertension pulmonaire est la conséquence d'une maladie thromboembolique. Finalement, le groupe 5 regroupe les étiologies dont les

mécanismes sont incertains ou multiples (ex. : syndrome myéloprolifératif, sarcoïdose, vasculite, dysthyroïdie). Comme pour la MPI, le traitement est hautement variable en fonction de l'étiologie [41]. Pour l'HTAP, des analogues des prostaglandines, des antagonistes de l'endothéline et des inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 peuvent être utilisés. L'HTAP idiopathique comprend le pronostic le plus réservé avec une survie médiane de 2,8 années [67]. En fin de course, la transplantation pulmonaire est donc une option thérapeutique valable chez de nombreux patients.

1.2 Transplantation pulmonaire

En 1963, Dr. James D. Hardy effectue la première transplantation de poumons chez l'humain [68, 69]. Le greffon, provenant d'un donneur décédé des suites d'un infarctus du myocarde, fut administré à un prisonnier avec carcinome pulmonaire. Bien que couronnée de succès à l'époque, cette première greffe chez l'humain s'est conclue avec le décès du receveur 18 jours après la chirurgie. Grâce aux travaux des 60 dernières années, la transplantation pulmonaire constitue aujourd'hui une modalité thérapeutique qui prolonge la survie chez la majorité des patients avec maladies respiratoires terminales.

Sélection du donneur et du receveur

Le Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) est l'unique centre de transplantation pulmonaire au Québec. Entre autres, son programme de transplantation pulmonaire est responsable d'inscrire les receveurs sur la liste d'attente et de déterminer leur statut. Transplant Québec, pour sa part, a le mandat de recevoir ces inscriptions, de gérer et mettre à jour la liste d'attente, et d'organiser les transplantations en fonction des donneurs potentiels. Au Québec, le don de poumon n'est possible qu'après le décès de donneur. Il peut s'effectuer après un décès neurologique (DDN), un décès cardiocirculatoire (DDC) ou un décès résultant de l'aide médicale à mourir. Dans les deux premiers cas, le donneur a subi des lésions cérébrales graves et irréversibles qui sont incompatibles avec la vie [70]. En 2019, le portrait des donneurs s'illustre comme suit au Québec [71]. Parmi les causes de décès se trouvent les accidents vasculaires cérébraux (43%), les anoxies (26%), les traumatismes crâniens par accidents de véhicules routiers (7%) ou non (11%), et autres (13%). La moyenne d'âge était de 52 ans et la médiane de 54 ans. Parmi les 820 références pour donneurs potentiels, 26% ont été refusées pour maladie préexistante ou actuelle, 25% ont été refusées par la famille, 18% ont été refusées pour une

instabilité clinique et 9% n'ont pas été transplantés pour d'autres motifs. Ainsi, seules 179 références (22%) ont mené à un don d'organe. Pour cette même année 2019, le Québec a enregistré son record du plus grand nombre annuel de greffes pulmonaires avec 70 transplantations effectuées. Aux termes de la même année, 59 patients attendaient toujours de recevoir des poumons sur la liste d'attente. L'attente moyenne pour obtenir une greffe pulmonaire était de 231 jours. Cette durée moyenne a augmenté de 33% en 2020 (323 jours), conséquence probable de la pandémie à coronavirus 2019 (COVID-19) [72]. Malheureusement, au Québec comme ailleurs dans le monde, environ 11% des receveurs en attente de poumons décèdent sur la liste d'attente [73]. En ce sens, malgré le nombre croissant de greffes effectuées, de plus en plus d'experts souhaitent élargir le lot de donneurs potentiels pour subvenir au manque d'organes.

Le recrutement du donneur débute par l'identification de donneurs potentiels par les centres hospitaliers. Un coordonnateur de Transplant Québec se déplace ensuite au site du donneur potentiel et relève l'histoire médicale et sociale avec les proches du patient et l'équipe médicale. Il dépiste pour des histoires de cancer, diabète, cardiopathie, hypertension, utilisation d'alcool/tabac/drogue et comportements à risque [74]. Parmi les tests sérologiques standards, il est usuel de dépister pour l'hépatite B, l'hépatite C, le VIH, le cytomégalovirus, le virus T-lymphotrope humain et la syphilis. Une formule sanguine complète, un gaz artériel, une radiographie pulmonaire (et/ou une tomodensitométrie du thorax) et une bronchoscopie figurent aussi dans les investigations d'un donneur pulmonaire potentiel. Des critères d'inclusion et d'exclusion très conservateurs ont été mis de l'avant à la fin des années 1990 [75, 76]. À noter, ces critères ont été choisis empiriquement. Parmi ces derniers se trouvent un âge de < 55 ans, une histoire tabagique inférieure à 20 paquets-années, une radiographie pulmonaire normale, une compatibilité ABO, une $Pa_{O_2} > 300$ mm Hg avec Fi_{O_2} à 100% et pression expiratoire positive (PEEP) de 5 mm Hg, et une évaluation macroscopique adéquate lors du prélèvement des poumons [75-77]. Les infections suivantes figurent parmi les contre-indications absolues au prélèvement d'organe : VIH, hépatite B active, virémie à l'herpès simplex, virémie à l'herpès zoster, virémie au cytomégalovirus et encéphalite au virus du Nil occidental [74, 76]. Certaines sérologies positives n'excluent pas le prélèvement du greffon. Par exemple, un receveur avec hépatite C chronique peut bénéficier d'un don chez un donneur avec sérologie positive à l'hépatite C [74]. Une colonisation bactérienne dans le poumon figure aussi parmi les contre-

indications d'étiologies infectieuses. Par ailleurs, une autre contre-indication absolue au prélèvement d'organe est la présence d'un cancer chez le donneur dans les cinq dernières années [74, 76]. Cela exclue les néoplasies dermatologiques non-mélanomes ainsi que les tumeurs primaires du système nerveux central non métastatiques. Aussi, le donneur est exclu d'emblée s'il a une histoire de mélanome ou de néoplasie hématologique, nonobstant le moment d'apparition du cancer. Finalement, un historique de trauma thoracique est également une contre-indication absolue au don [76].

Aux termes de ce qui précède, plusieurs cliniciens ont néanmoins choisi d'élargir les critères pour répondre au manque de poumons [78-80]. Un donneur qui ne répond pas à l'un ou plusieurs des critères standards décrits ci-haut est nommé donneur marginal. Le choix des critères élargis est très variable en fonction des milieux et des cliniciens. Par exemple, il est fréquent de recruter des donneurs de > 50 ans, avec une histoire tabagique de > 20 paquets-années, avec un ratio $Pa_{O_2}/Fi_{O_2} > 250$ mm Hg, avec des atélectasies sur la radiographie pulmonaire, avec une culture endobronchique positive à la coloration de Gram, avec une durée d'ischémie de > 6h, et autres. [77]. Au Québec en 2019, le donneur de poumons le plus âgé avait 85 ans [71]. Quatre autres méthodes récentes ont permis d'élargir substantiellement le lot de donneurs. Premièrement, l'utilisation des donneurs DDC a augmenté significativement dans les dernières années. La première greffe de poumons avec DDC au Québec s'est effectuée en 2012, et plus récemment en 2019, les DDC comptaient pour 20% des dons d'organe au Québec [71]. Deuxièmement, l'aide médicale à mourir (AMM) fut rendue possible en 2015 par l'entrée en vigueur de la *Loi concernant les soins de fin de vie*. En 2020, 6% des donneurs avaient fait usage de l'AMM [72]. Troisièmement, en 2001 eu lieu la première greffe pulmonaire assistée de l'appareillage *ex-vivo lung perfusion* (EVLP) [81]. L'EVLP est un système permettant de reconditionner et d'évaluer les poumons avant leur greffe chez le receveur. Son utilisation est prometteuse pour les greffons provenant de donneurs marginaux, à l'exception de ceux avec pneumonie ou pneumopathie irréversible [74]. À l'heure actuelle, l'EVLP n'est toutefois pas utilisée de façon routinière au Québec. Quatrièmement, des groupes américains [82, 83] et japonais [84] ont rapporté des bénéfices de procéder à la transplantation lobaire bilatérale. Cette méthode pourrait s'avérer particulièrement utile chez des receveurs de petite taille, mais de même, elle n'est toujours pas adoptée au Québec à l'heure actuelle.

Pour la sélection des receveurs, la société scientifique *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) a émis des critères indicatifs pour qu'un receveur soit éligible à une transplantation pulmonaire [74, 85]. Les receveurs sélectionnés doivent avoir une maladie pulmonaire terminale réfractaire à la thérapie médicale optimale. Ils doivent avoir une survie estimée à moins de deux à trois années ou avoir des symptômes significatifs, tels que décrits par des niveaux fonctionnels de III ou IV sur l'échelle du *New York Heart Association*. De plus, les receveurs doivent être suffisamment en bonne santé générale pour survivre à la procédure chirurgicale. L'ISHLT a également émis des contre-indications pour la greffe pulmonaire [74, 85]. Parmi ces dernières figurent des antécédents de néoplasie dans les deux dernières années, une dysfonction organique sévère et intraitable autre que pulmonaire, une infection extrapulmonaire chronique incurable (ex. : hépatite B, VIH), une déformation significative spinal ou thoracique, une inobservance documentée et/ou une incapacité à compléter le traitement médical ou le suivi, une maladie psychiatrique intraitable qui mine le traitement ou le suivi, une absence de réseau social et un trouble de consommation actif ou dans les derniers six mois. Il existe aussi des contre-indications relatives ouvertes à débat : âge supérieur à 65 ans, IMC ≥ 30 , maladie coronarienne athérosclérotique, diabète, reflux gastro-œsophagien, état critique ou instable, colonisation à des germes hautement résistants ou virulents, et ostéoporose sévère ou symptomatique [74]. Entre 1995 et 2013, l'ISHLT a recensé les principales indications des receveurs greffés. Par ordre décroissant, les indications étaient les suivantes : MPOC (38,2%), maladies parenchymateuses diffuses dont la FPI (28,2%), FK (16,4%), HTAP (3,8%), bronchiectasie (2,7%), nouvelle transplantation (2,7%), sarcoïdose (2,5%), maladies des tissus conjonctifs (1,4%) et autres [86].

Déroulement d'une greffe pulmonaire

Lors du prélèvement d'organe chez le donneur, les paramètres ventilatoires sont maintenus avec de faibles volumes courants (6 à 8 mL/kg), une FiO_2 à 50% et une PEEP entre 5 à 10 mm Hg [69, 87]. Une sternotomie médiane est effectuée et les espaces pleuraux sont examinés. Des manœuvres de recrutement (i.e. ventilation ayant pour but d'ouvrir les alvéoles) sont effectuées pour ventiler les zones d'atélectasie. Après les dissections chirurgicales complétées par les chirurgiens thoraciques et abdominaux (si prélèvement d'autres organes), le donneur est héparinisé pour au moins trois minutes. Une canule est insérée dans le tronc de l'artère pulmonaire, puis l'aorte est clampée (i.e. collabée transitoirement avec un instrument

chirurgical), la veine cave supérieure est ligaturée (i.e. occlue avec un fil), la veine cave inférieure est coupée et une ouverture est créée dans l'appendice auriculaire gauche afin de bien décompresser le coeur. Par la canule insérée dans le tronc pulmonaire, un lavage vasculaire antégrade de 4L est complété par gravité grâce à une solution de Perfadex® (i.e. solution physiologique mimant le liquide extracellulaire) suspendue à 30 cm du cœur (pression de perfusion physiologique). À ce moment, il est possible d'observer l'effluent pulmonaire s'écoulant de l'oreillette gauche ouverte pour la présence de thrombi ou débris. L'excision du cœur s'effectue par transsection du tronc pulmonaire, de l'aorte, de la veine cave supérieure ligaturée et de l'oreillette gauche. Un lavage vasculaire rétrograde est par la suite effectué où 1L est conduit dans les veines pulmonaires (250mL par veine pulmonaire). De même, des débris ou des thrombi peuvent être visualisés dans l'effluent provenant du tronc pulmonaire. La dissection se poursuit au niveau du médiastin et de l'œsophage. Les poumons sont recrutés avec une pression inspiratoire continue de 15 à 20 cm H₂O à FiO₂ de 50% pour obtenir une inflation correspondant à environ 75% de la capacité pulmonaire totale. La trachée proximale est agrafée pour laisser les poumons se remplir d'air, puis elle est coupée. Le bloc pulmonaire est alors retiré et une inspection morphologique est conduite avant le transport d'organe. Le bloc est introduit dans un sac de plastique triple contenant 2L de Perfadex®, le tout étant finalement déposé sur glace dans une glacière de transport. À noter que cette description simplifiée du prélèvement d'organe est adaptée par chaque équipe de transplantation pulmonaire. De même, quelques différences existent lors d'un prélèvement chez un donneur DDC [69, 87].

À l'arrivée du greffon dans la salle du receveur, le chirurgien divise les artères pulmonaires, l'oreillette gauche et le médiastin postérieur [69, 74]. Les voies aériennes sont séparées par une agrafe posée au niveau proximal de la bronche souche gauche. La dissection s'ensuit un poumon à la fois, en débutant par le premier poumon prévu pour transplantation. Le chirurgien dégage et dissèque les structures hilaires pour libérer les composantes vasculaires. La bronche souche est ensuite préparée : le chirurgien retire l'agrafe pour visualiser la lumière endobronchique, transsèque la bronche jusqu'au dernier anneau cartilagineux avant la première bifurcation lobaire, puis dissèque le contenu péribronchique. Une culture endobronchique et un BAL sont effectués. Au besoin, un lavage vasculaire peut être nouvellement conduit par voie antégrade ou rétrograde. Finalement, ces étapes sont répétées pour le poumon controlatéral [69, 74].

Chez le receveur, une voie veineuse périphérique et une voie artérielle radiale sont installées [69, 74]. L'intubation est effectuée avec un tube double-lumière. Un accès veineux central est établi et un cathéter Swan-Ganz est inséré pour monitorer la PAP. La procédure chirurgicale peut débuter lorsque le greffon est prélevé et jugé adéquat par les chirurgiens auprès du donneur [69]. Une sternotomie transverse (*clamshell incision*) est effectuée. La dissection médiastinale s'ensuit avec des précautions spéciales pour épargner le nerf phrénique et le nerf récurrent laryngé. En fonction des résultats de tests préopératoires, le poumon ayant la moins bonne perfusion est explanté en premier par pneumonectomie. L'équipe débute alors l'implantation du premier greffon, qui comprend de façon séquentielle l'anastomose bronchique, l'anastomose de l'artère pulmonaire et l'anastomose d'une portion de l'oreillette gauche (veine pulmonaire). Cette dernière anastomose veineuse n'est pas complète afin de permettre la fuite d'embolies gazeuses lors de la reperfusion (fil de surjet non-attaché). Le patient est ensuite installé en position déclive (Tredelenburg), le greffon est ventilé et l'artère pulmonaire est déclampée pour permettre la reperfusion du greffon. L'anastomose veineuse de l'oreillette gauche est achevée lorsque l'effluent est vide d'air et que l'échographie cardiaque confirme l'absence d'air dans le ventricule gauche. Des paramètres hémodynamiques et ventilatoires protecteurs sont maintenus tout en assurant une hémostase efficace. Enfin, les mêmes étapes sont répétées pour la pneumonectomie controlatérale et l'implantation du second greffon. Quatre drains pleuraux sont finalement installés et l'incision thoracosternale est fermée [69, 74].

Complications chirurgicales

Les complications chirurgicales peuvent être divisées en complications précoces et tardives ([Tableau 1](#)) [69, 74, 88]. Les arythmies auriculaires, notamment la tachycardie et la fibrillation auriculaire, sont rapportées chez 10-50% des receveurs. Il a été suggéré que l'inflammation, la manipulation des veines pulmonaires et l'anastomose de l'oreillette gauche sont des facteurs contributifs à l'apparition d'impulsions ectopiques et de réentrées aberrantes, ce qui pourrait expliquer la forte incidence rapportée [69, 89, 90]. Ces anomalies du rythme augmentent la durée d'hospitalisation et la mortalité, et différents facteurs prédisposants ont été identifiés tels que la fibrose pulmonaire, l'âge avancé, la maladie coronarienne athérosclérotique, une distension auriculaire gauche, une histoire antérieure de fibrillation auriculaire et l'utilisation de vasopresseurs en postopératoire [91, 92]. Les complications pleurales sont rapportées chez 22 à 37% des receveurs [93, 94]. Premièrement, l'effusion pleurale est attendue après la greffe

pulmonaire et devrait diminuer dans les sept jours suivants la greffe [95, 96]. Les drains thoraciques peuvent être retirés dès que le débit est moindre que 200 mL/jour [94, 96]. Les étiologies sont souvent mixtes et comprennent entre autres la perméabilité capillaire augmentée, un bilan hydrique positif et les rejets aigus [94]. Deuxièmement, l'hémothorax est une cause commune de reprise chirurgicale dans les heures suivant la greffe. Les principales sources de saignement sont le médiastin et la cage thoracique, et les risques de saignement sont fortement accrus par la présence d'adhérences préopératoires, par l'utilisation de l'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) ou de la circulation extracorporelle (CEC), ou par la thérapie antiplaquettaire et anticoagulante. Troisièmement, le pneumothorax peut survenir et il est souvent associé à une discordance entre la taille du greffon et la cage thoracique du receveur. Des facteurs chirurgicaux et des dommages sur le greffon sont les principales causes. Quatrièmement, le chylothorax est rare après la greffe et il est secondaire à un trauma du canal thoracique. Une diète appropriée et le drainage sont habituellement suffisants pour traiter ce problème, mais de façon exceptionnelle, un chylothorax réfractaire peut s'installer et devenir particulièrement néfaste pour les patients immunocompromis. Finalement, des complications vasculaires surviennent chez 1-3% des receveurs et sont souvent fatales [97, 98]. Parmi d'autres, ces complications comprennent le rétrécissement luminal secondaire à des phénomènes de tortillage, de dissection ou de thromboembolies. Les complications veineuses sont beaucoup plus fréquentes que les complications artérielles, et les femmes avec maladies pulmonaires restrictives sont particulièrement à risque. Le pronostic est hautement dépendant de la reconnaissance précoce, du statut

-
- I. Complications vasculaires
 - Saignement anastomotique
 - Sténose anastomotique
 - Obstruction non liée à l'anastomose
 - Tortillage
 - Thrombose et embolie pulmonaire
 - Compression extraluminale
 - II. Complications aériennes
 - Sténose
 - Déhiscence
 - Fistule
 - Granulome endobronchique
 - Infection bronchique
 - Bronchomalacie
 - III. Fuite aérienne
 - IV. Atteinte du nerf phrénique avec paralysie diaphragmatique
 - V. Hémorragie
 - Hémothorax
 - Hémomédiastin/hémopéricarde
 - Hématome de la cage thoracique
 - VI. Complications pleurales
 - Pneumothorax
 - Effusion pleurale
 - Empyème
 - Chylothorax
 - VII. Discordance de taille entre le greffon et la cage thoracique
 - VIII. Autres
 - Tachyarythmies
 - Hernie pulmonaire
 - Infection du site opératoire
 - Complications associées à la CEC ou l'ECMO
-

Tableau 1. Complications chirurgicales de la greffe pulmonaire.

CEC : circulation extra-corporelle; ECMO : oxygénation par membrane extracorporelle. Figure traduite et adaptée de [70].

clinique, et d'une prise en charge réfléchie [69, 74].

Plus tardivement, d'autres complications chirurgicales peuvent survenir ([Tableau 1](#)) [69, 74]. L'incidence des complications aériennes varie de 2-33% [99], et environ 9-13% de toutes les anastomoses bronchiques nécessiteront une réintervention [100, 101]. La principale complication bronchique est la sténose et devient symptomatique généralement après 2-3 mois. La thérapie standard est la pose d'une endoprothèse « stent » bronchique ou la dilatation endoscopique par ballon ou bronchoscopie rigide. La déhiscence bronchique est moins fréquente de nos jours et atteint entre 1 à 10% des receveurs [102-104]. Les patients se présentent communément avec pneumothorax, emphysème sous-cutané et, plus rarement, sepsie. Si non traitée, la déhiscence bronchique peut engendrer des fistules pleurales, vasculaires, médiastinales et même cardiaques [105-107]. Le traitement curatif inclut la chirurgie pour réanastomose, la bronchoplastie et parfois une nouvelle transplantation. La formation de tissu granulaire dans les bronches peut aussi survenir de quelques semaines à quelques mois post-greffe, et cela est exacerbé par la présence d'*Aspergillus* au site anastomotique. Lorsque symptomatiques, les patients peuvent présenter de la toux et de la dyspnée avec une atteinte obstructive objectivée aux tests de fonctions respiratoires. Finalement, des cas de bronchomalacie ont été rapportés et ceux-ci surviennent 3-4 mois post-greffe. Cette complication se définit par une sténose endobronchique de 50% ou plus à l'expiration et agit comme une sténose dynamique. La présentation clinique et paraclinique est similaire aux cas de tissu granulaire et le traitement, chez les patients symptomatiques, comprend la ventilation non invasive à pression positive et la pose d'endoprothèses bronchiques. Par ailleurs, l'empyème est rare et ne survient habituellement que dans les premiers six mois [69, 74].

Autres complications

Les complications immunologiques comprennent, entre autres, la dysfonction primaire du greffon (DPG) et les rejets du greffon. La DPG sera abordée dans la section [Dysfonction primaire du greffon](#). Il est possible de différencier les rejets aigus et chroniques par l'absence et la présence de fibrose, respectivement [74]. Pour la majorité, un traitement immunosuppresseur est de mise (ex. : haute dose de corticostéroïdes IV [10-15 mg/kg/jour]) [74]. Le rejet aigu peut être cellulaire ou humoral. Dans le rejet aigu cellulaire, il y a infiltration interstitielle et/ou périvasculaire de cellules mononucléaires [74]. L'étalon d'or diagnostique est la biopsie transbronchique, mais un

diagnostic présomptif est souvent posé en présence d'un syndrome obstructif symptomatique et objectivé par spirométrie [74]. Environ 15 à 20% des patients développent au moins un épisode de rejet aigu dans la première année suivant la greffe, mais ces épisodes sont pour la plupart silencieux [108]. Le rejet aigu humoral, pour sa part, est plus controversé en greffe pulmonaire qu'avec les autres greffes d'organes solides. Son diagnostic requiert une clinique de dysfonction du greffon, une histologie caractérisée par une capillarite ou une artérite neutrophilique, et la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes du donneur [109]. Des évidences immunohistochimiques d'activation du complément (C3d et C4d) sont également très suggestives. De nos jours, cette complication humorale est rarissime compte tenu des progrès des connaissances en lien avec les compatibilités antigéniques donneur-receveur. Dans une autre perspective, la dysfonction chronique du greffon (CLAD) atteint 50% et 76% des receveurs à 5 ans et 10 ans, respectivement [74]. Cette complication est le principal frein à la survie à long terme après une transplantation pulmonaire [110-114]. La CLAD se sous-divise en diverses entités qui parfois se chevauchent, la plus connue étant le syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS). Le BOS est un diagnostic clinique marqué par le déclin irréversible de la fonction pulmonaire. C'est une maladie obstructive des petites voies aériennes où l'inflammation chronique mine la capacité régénératrice de l'épithélium et favorise la formation de fibrose irréversible [115]. À partir du diagnostic, la survie médiane est de 3 à 5 ans [116].

Plusieurs complications sont associées à l'utilisation de traitements immunosuppresseurs [69, 117]. D'abord, les complications bactériennes, virales et fongiques sont fréquentes après une greffe pulmonaire. Les infections pulmonaires représentent la première cause de mortalité entre 1 et 12 mois après une greffe. Plusieurs facteurs chez le greffé (immunosuppression, dénervation qui empêche la toux réflexe, drainage lymphatique inadéquat, et autres) contribuent au fardeau infectieux [117]. Les plus fréquents pathogènes en cause sont le cytomégalovirus, l'influenza, le virus respiratoire syncytial, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus* et *Candida* [117]. En plus d'être néfastes pour la fonction pulmonaire dans l'épisode infectieux, les infections augmentent aussi les risques de CLAD. Ensuite, l'immunosuppression favorise l'apparition de pathologies systémiques cardiovasculaires (dyslipidémie, diabète, hypertension, et autres), gastro-intestinales (reflux gastro-oesophagien, diarrhée chronique, et autres), hématologiques (cytopénie, hémolyse, microangiopathie, et autres) et neurologiques (encéphalopathie, accident vasculaire, et autres). L'utilisation des inhibiteurs de

calcineurine est associée à une atteinte rénale chez 41% des receveurs dans les 10 premières années post-greffe [117]. Finalement, l'immunosuppression est associée à des néoplasies principalement hématologiques et dermatologiques chez 44% des receveurs dans les 10 premières années, constituant la 3e cause de décès chez les greffés au long terme [118].

1.3 Dysfonction primaire du greffon

Définition

La DPG est une complication inflammatoire du greffon qui se manifeste cliniquement par de l'hypoxémie et de l'œdème pulmonaire dans les 72h suivant la greffe [119]. Le terme DPG a été implanté en 2005 par l'ISHLT afin de combiner et standardiser les diverses appellations existantes à ce moment : dysfonction précoce du greffon, échec primaire du greffon, syndrome de détresse respiratoire aigu post-transplantation, lésion d'ischémie-reperfusion (I/R), œdème de reperfusion et œdème pulmonaire non cardiogénique [119, 120]. Cette classification distingue les receveurs avec DPG en quatre grades : DPG0, DPG1, DPG2 et DPG3. Ces grades sont déterminés en fonction du ratio Pa_{O_2}/Fi_{O_2} et de la présence d'opacités pulmonaires post-transplantation ([Tableau 2](#)). Cette définition a été rendue plus inclusive en 2016 et comprend désormais les patients sous ECMO ainsi que les patients hypoxémiques sans œdème radiologique [121]. Les patients sous ECMO périopératoire pour cause d'hypoxémie sont automatiquement gradés comme DPG3. Au contraire, les patients sous ECMO pour cause non hypoxémique (ex. : défaillance isolée du ventricule droit) ne doivent pas être gradés. Les patients sous intubations invasives et non invasives sont classés selon les mêmes critères. À l'heure actuelle, cette définition est utilisée à la fois pour les transplantations pulmonaires uni- et bilatérales.

Différentes pathologies peuvent confondre et masquer la DPG [121]. Parmi plusieurs, il y a les obstructions anastomotiques vasculaires, les infections, les hémorragies, le syndrome

Grade	Œdème pulmonaire à la radiographie	Ratio Pa_{O_2}/Fi_{O_2}
0	Non	-
1	Oui	> 300
2	Oui	200 - 300
3	Oui	< 200

Tableau 2. Définition de la dysfonction primaire du greffon (DPG).

Cette classification a été révisée en 2016 par la *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) [121]. Les grades sont établis en fonction de la présence d'œdème pulmonaire à la radiographie et du ratio Pa_{O_2}/Fi_{O_2} . Pa_{O_2} : pression partielle en oxygène artériel; Fi_{O_2} : fraction inspirée en oxygène.

respiratoire aigu post-transfusionnel (TRALI), le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), et autres [121]. La DPG s'avère donc un diagnostic d'exclusion.

Incidence, mortalité et autres complications

Avant que l'ISHLT ne propose la définition standardisée de la DPG, l'incidence variait considérablement de 15 à 57%, conséquence des définitions floues [122-125]. Depuis 2005, les données s'avèrent beaucoup plus fiables. Les grandes études épidémiologiques sur la DPG et leurs principaux résultats sont listés ([Tableau 3](#)).

Prekker *et al.* de l'Université du Minnesota ont effectué une étude rétrospective sur 402 patients et ont trouvé une incidence de DPG3 de 32% dans les premières 48h [126, 127]. Pour leur part, Kreisel *et al.* de l'Université Washington ont effectué une étude rétrospective unicentrique sur 1000 patients et ont trouvé une incidence de DPG de 22% [128]. Ils n'ont cependant pas précisé l'incidence en fonction des grades et ils n'ont pas mentionné quand ils ont mesuré la DPG [128]. Christie *et al.* ont conduit une étude de cohorte prospective multicentrique et ont trouvé des incidences de DPG3 de 28%, 23% et 28% respectivement à 24h, 48h et 72h [129]. Diamond *et al.* ont également conduit une étude de cohorte prospective avec 10 centres aux États-Unis et ont rapporté une incidence de 31% pour la DPG3 mesurée à n'importe quel moment de 0 à 72h [130]. Fait important à noter, la majorité des études ont inclus des adultes de 18 ans et plus. La prudence est donc de mise pour l'extrapolation dans la population pédiatrique. Une récente étude de 2021 souligne d'ailleurs que les nouveaux critères ajoutés en 2016 majorent l'incidence de DPG3 [131]. Dans la cohorte de cette étude, l'incidence de DPG3 était de 26% avec la définition de 2005 et de 36% avec la définition de 2016 [131]. Somme toute, la communauté scientifique s'entend pour affirmer que l'incidence précoce de DPG3 est d'environ 30% et que l'incidence à 48h et 72h est d'environ 20% [132].

La mortalité est très élevée avec la DPG3 ([Tableau 3](#)). De même que pour l'incidence, les taux de mortalité variaient considérablement de 21 à 63% avant l'arrivée en 2005 du consensus par l'ISHLT [114, 129, 133-135]. Depuis, les données sont beaucoup plus fiables. La DPG3 est associée à une mortalité à 30 jours de 25% lorsque gradée à 24h et de 36% lorsque gradée à 72h [129]. À 90 jours et 1 an, la mortalité se chiffre à environ 23% et 34% respectivement pour les receveurs gradés DPG3 à 48-72h [130]. Plusieurs études ont souligné la relation fortement positive entre le taux mortalité et le grade de DPG [110, 113, 129, 131, 136]. La mortalité à 90

jours des receveurs DPG3 est 8 fois supérieure à celle des non-DPG3 [136] et la mortalité à 1 an est de 10 fois supérieure [131].

Incidence de la DPG3	Nb. de centres	N	Références
- DPG3 à 48h et 72h chez 20% et 15% des patients	1	n = 118	Samano <i>et al.</i> 2012 [137]
- DPG3 à 48h ou à 72h chez 26% des patients	1	n = 127	Daoud <i>et al.</i> 2021 [131]
- DPG3 à 6h chez 34% des patients FK	1	n = 122	Felten <i>et al.</i> 2012 [138]
- DPG3 à l'arrivée aux soins intensifs chez 21% des patients	1	n = 334	Daud <i>et al.</i> 2007 [113]
- DPG3 entre 0h et 48h chez 32% des patients	1	n = 402	Prekker <i>et al.</i> 2006 [126,
- DPG3 chez 28% des patients à 24h, 23% à 48h et 18% à 72h*	6	n = 450	127]
- DPG3 entre 0h et 72h chez 31% des patients*	10	n = 1255	Christie <i>et al.</i> 2010 [129] Diamond <i>et al.</i> 2013 [130]
Mortalité associée à la DPG3	Nb. de centres	N	Références
30 jours : - 25% de mortalité lorsque DPG3 à 24h et 36% lorsque DPG3 à 72h*	6	n = 450	Christie <i>et al.</i> 2010 [129]
90 jours : - 23% de mortalité selon une méta-analyse	-	n = 2444	Liu <i>et al.</i> 2014 [139]
- 59% de mortalité lorsque DPG3 à 48h	1	n = 78	Samano <i>et al.</i> 2012 [137]
- 33% de mortalité lorsque DPG3 à 48h	1	n = 394	Prekker <i>et al.</i> 2006 [126]
- 23% de mortalité lorsque DPG3 à 48h ou 72h*	10	n = 1255	Diamond <i>et al.</i> 2013 [130]
- Les 5 autres études incluses dans la méta-analyse ne répondaient pas aux critères de l'ISHLT 2005 ou ne classaient pas la DPG en fonction des grades.			
- RR de 1,92 pour les DPG3 gradés à l'arrivée aux soins intensifs comparativement aux DPG0	1	n = 337	Daud <i>et al.</i> 2007 [113]
1 année : - 34% de mortalité lorsque DPG3 à 48h ou 72h*	10	n = 1255	Diamond <i>et al.</i> 2013 [130]
Long-terme : - Survie médiane de 5,2 années chez les DPG3 de 0h à 48h comparativement à 7 années chez les DPG1/2	1	n = 402	Prekker <i>et al.</i> 2006 [126]
- Survie médiane de < 1 an chez les DPG3 à 72h comparativement à > 5 années chez les non-DPG3*	6	n = 450	Christie <i>et al.</i> 2010 [129]

Tableau 3. Incidence et mortalité de la DPG.

Les études incluses ont pour la majorité été menées après 2005 lorsque la définition standardisée par l'ISHLT a été adoptée. Nb. de centres : nombre de centres hospitaliers inclus dans l'étude; N : nombre de patients inclus dans l'étude; FK : fibrose kystique; RR : risque relatif. *Étude prospective.

À long terme, la survie est également moindre chez les DPG3 [110, 113, 114], conséquence de la forte incidence de CLAD [110-114]. Des études ont d'ailleurs montré que la DPG est un facteur de risque majeur de CLAD [74] et que les grades de DPG corrént avec la sévérité de CLAD

[110, 113, 114, 140]. Chez les patients avec DPG3, le risque relatif de développer le BOS varie de 2,53 à 3,31 comparativement aux patients DPG0 [110, 113]. Par ailleurs, dans le plasma du receveur, il est possible de distinguer l'ADN libre du donneur de celui du receveur [140]. Pour y arriver, les chercheurs effectuent d'abord un génotypage de l'ADN du donneur et du receveur. Ils analysent ensuite la distribution des polymorphismes nucléotidiques (SNP) de l'ADN libre circulant chez le receveur, et ils peuvent ainsi quantifier les ratios de SNP associés au donneur/receveur en comparant aux résultats génotypiques préalables. Par cette technique, des chercheurs ont montré que l'ADN libre du donneur est un biomarqueur sensible lorsque mesuré chez les receveurs atteints de DPG3 pour prédire la survenue de CLAD [140]. Il ne fait aucun doute que la DPG3 est associée à une mortalité plus élevée tant à court et long termes comparativement aux DPG0-2. De plus, une étude de 2018 menée aux fins de validations de la nouvelle définition de l'ISHLT 2016 a suggéré de combiner les groupes DPG0 et DPG1, puisqu'il n'y avait pas de différence sur la mortalité dans ces deux groupes [141]. De même par le passé, un groupe avait noté qu'une très légère différence de mortalité (3,5% vs 5,0%) cliniquement peu significative entre les groupes DPG0 et DPG1 [129]. À l'heure actuelle, l'ISHLT n'a toutefois pas adopté ce changement et les grades de DPG demeurent DPG0, DPG1, DPG2 et DPG3 [141].

Facteurs de risque

Différents facteurs de risque ont été associés au développement de DPG (voir [Tableau 4](#)) [74, 130, 142-147]. Ces facteurs peuvent être classés en variables associées au donneur, au receveur et à la procédure chirurgicale. La majorité de ces facteurs de

Catégories	Facteur de risque de DPG
Donneur - Variables inhérentes	Âge > 45 ans Âge < 21 ans Origine afro-américaine Usage d'alcool Historique de tabagisme
- Variables acquises	Ventilation mécanique prolongée Aspiration Instabilité hémodynamique
Receveur	Origine afro-américaine Sexe féminin Indice de masse corporelle > 25 Antécédent de chirurgie cardiothoracique Diagnostic de FPI Diagnostic d'HTAP Diagnostic de sarcoïdose PAP élevée en préopératoire Dysfonction diastolique
Facteurs opératoires	Durée d'ischémie prolongée Discordance entre le greffon et le volume thoracique du receveur Utilisation de CEC Transfusion sanguine > 1L FiO ₂ ≥ 0,4 lors de la reperfusion

Tableau 4. Facteurs de risque cliniques de la DPG.

CEC : circulation extracorporelle; FiO₂ : fraction inspirée en O₂; FPI : fibrose pulmonaire idiopathique; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire; PAP : pression artérielle pulmonaire. Figure adaptée de [74, 130, 142-147], © Steven Bonneau 2022.

risque ont été mis en évidence par l'ISHLT en 2005 [144, 145], mais de récents travaux ont invalidé certains paramètres et ont fait évoluer les connaissances [147].

Chez le donneur, une étude de 2003 a montré qu'un âge de > 45 ans est un facteur de risque important de DPG avec un risque relatif de 6,79 [143]. De plus récentes études semblent toutefois mettre en doute ces trouvailles. En 2013, une étude de cohorte avec 8860 patients a montré une association entre des donneurs de > 65 ans et la mortalité à 1 an, mais aucune association significative n'a été trouvée avec la DPG [148]. Plus récemment, en 2021, une étude rétrospective avec 241 patients n'a trouvé aucune différence dans l'incidence de DPG et de mortalité chez les donneurs de > 65 ans, quoique des biais de sélections ont été associés à ce groupe de donneurs plus âgés [149]. Pour ce qui est du type de don d'organe, une méta-analyse de 2019 n'a trouvé aucune différence significative sur l'incidence de DPG2-3 entre 429 donneurs DDC et 2000 donneurs DDN, invalidant donc le rôle du type de don comme facteur de risque de DPG [150]. Des résultats similaires ont été obtenus en 2020 dans une étude rétrospective combinant 1200 greffés [151]. Par ailleurs, le sexe du donneur [152-155] et le trauma crânien [146] sont deux facteurs de risque mitigés avec résultats non concluants à l'heure actuelle. Finalement, des gènes impliqués dans le stress oxydatif, tel que le gène *NOX3*, sont associés à la DPG lorsque trouvés chez le donneur [156].

Plusieurs facteurs de risque de DPG ont également été identifiés chez le receveur [74, 130, 142-147]. Grâce à des mesures tomодensitométriques, Anderson *et al.* ont précisé que le degré d'adiposité abdominale sous-cutanée corrèle avec la DPG, mais ils n'ont trouvé aucune association entre l'adiposité viscérale et la DPG [157]. La mesure de l'IMC semble donc être un paramètre clinique sous-optimal [157]. Pour ce qui est du sexe, une étude de 2013 avec 1255 receveurs n'a trouvé aucune association entre le sexe du receveur et la DPG [130], mais une méta-analyse de 2014 combinant 10 042 receveurs a trouvé un risque relatif de 1,38 (IC_{95%} 1,09-1,75) pour le sexe féminin [139]. De même, la méta-analyse de 2014 a identifié que l'origine afro-américaine du receveur était associée à un risque relatif de 1,78 (IC_{95%} 1,49-2,13) alors que ce facteur était initialement jugé sans impact [130]. Comme pour le donneur, certains gènes sont associés à la DPG. Diamond *et al.* ont identifié une dizaine de gènes impliqués dans la réponse immunitaire acquise qui, lorsque sous-exprimés chez le receveur, peuvent être associés à la DPG (CD80, IFNG, GZMB, FOXP3, CD28, CXCR3, CD3E, CD40LG, PRF1, CD27, FASLG,

CTLA4, ICOS) [158]. Ils ont aussi identifié plusieurs gènes impliqués dans l'immunité innée qui, lorsque surexprimés, peuvent être associés à la DPG (FOSB, PTX3, IL10, SOC3, HBEGF, LDLR, HMOX1, IL18R1, NLRP3, HGF, NLRC4, C1QA, CEBPD, NOD2, TLR4, TLR2) [158]. Aussi, l'interaction des gènes *NOX3* chez le donneur et *NFE2L2* chez le receveur s'avère très néfaste et augmente l'incidence de DPG [159]. Bien qu'aucun de ces gènes ne soit impliqué directement dans la synthèse des pièges extracellulaires des neutrophiles (*neutrophil extracellular traps* – NET) ou des molécules mesurées dans nos travaux (IL-6, CXCL8/IL-8 et protéine C réactive [CRP]), il est possible de croire que ces gènes sont impliqués indirectement avec la cinétique neutrophilique en exacerbant l'inflammation pulmonaire et en facilitant le recrutement leucocytaire [158, 159].

Finalement, des facteurs de risque opératoires ont été associés à la DPG, quoique certains demeurent controversés [147, 160, 161]. Dans une étude avec plus de 10 000 receveurs, Grim *et al.* n'ont trouvé aucune augmentation d'incidence de la DPG chez les patients ayant reçu des greffons ischémiés pendant six heures ou plus [160]. Cependant, une récente étude de 2017 combinant 2001 receveurs a examiné la durée d'ischémie des greffons chez les receveurs ayant nécessité l'ECMO à 72h versus ceux n'ayant pas nécessité l'ECMO à 72h [161]. La durée d'ischémie dans le groupe avec ECMO était de 5,94h et de 5,08h dans le groupe sans ECMO, une différence significative [161]. De même, quoique l'association entre la CEC et la DPG a été bien validée dans les études animales et humaines, ce lien demeure controversé notamment en raison des transfusions administrées pendant la CEC qui agissent à titre de confondants. Une méta-analyse de 2018 a montré que l'utilisation de CEC doublait le risque de DPG3 comparativement à l'ECMO, mais le groupe avec CEC avait de hauts niveaux de transfusions [162]. Enfin, une méta-analyse de 10 042 patients a invalidé l'association entre la transplantation unilatérale et la DPG [139].

L'ischémie-reperfusion

L'I/R est un processus clé dans la physiopathologie de la DPG. À la suite d'une période d'ischémie, le retour du flot sanguin est essentiel pour préserver la viabilité du tissu. Cela dit, la reperfusion s'ensuit généralement d'une réponse initiale paradoxalement néfaste pour le tissu, découlant du phénomène d'I/R ([Figure 1.3](#)). L'I/R est un processus inflammatoire irréfutable et commun à tous les types de greffes, mais particulièrement nocif lors des transplantations

pulmonaires [163, 164]. Après le retour sanguin dans le poumon ischémique, une inflammation stérile et une dysfonction endothéliale s'installent et s'ensuivent d'importantes répercussions respiratoires et hémodynamiques. D'une part, l'augmentation de la perméabilité vasculaire résulte en de l'œdème pulmonaire et de l'hypoxémie, et d'autre part, l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire entraîne une hypertension pulmonaire secondaire qui est particulièrement redoutée chez des receveurs qui, souvent, ont des fonctions ventriculaires droites déjà défaillantes avant la greffe [163]. Pour bien concevoir l'I/R d'un point de vue physiopathologique, il est utile de scinder les insultes inflammatoires de façon séquentielle au cours des périodes d'ischémie et de reperfusion. En premier lieu, l'ischémie du greffon entraîne l'activation de plusieurs voies qui résultent en une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), une altération du pH ainsi qu'une libération d'enzymes lysosomales [164]. Ces perturbations entraînent de nombreuses conséquences, parmi lesquelles figurent la perte d'étanchéité vasculaire avec expansion des jonctions endothéliales. Au niveau cellulaire, l'ischémie entraîne l'activation des cellules endothéliales et des macrophages pulmonaires qui libèrent diverses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, CXCL8/IL-8 et le facteur de nécrose tumorale (TNF) [165]. Ces stimuli combinés résultent en l'expression et la translocation de nombreuses molécules d'adhérence cellulaires au niveau de l'endothélium, étape cruciale pour les dommages post-reperfusion. Parmi ces molécules d'adhérence, certaines molécules propres à la cinétique neutrophilique dont la P-sélectine et la molécule d'adhérence intercellulaire-1 (ICAM-1) jouent un rôle majeur puisque le blocage de ces molécules réduit les dommages pulmonaires [164-170].

En deuxième lieu, quoiqu'elle met fin à l'ischémie, la reperfusion du greffon chez le receveur amplifie la cascade inflammatoire et peut mener à l'œdème pulmonaire [164]. Le mécanisme de dommage alvéolaire est comparable à l'œdème trouvé en ARDS ([Figure 1.4](#)). D'une part, l'arrivée de sang adéquatement oxygéné dans un environnement hypoxique accroît la formation de ROS. Ensuite, les leucocytes et les plaquettes circulantes sont fortement activés par l'environnement local très inflammatoire. Via un processus largement médié par le CXCL8/IL-8, les neutrophiles adhérant à l'endothélium microvasculaire migrent dans le parenchyme pulmonaire, accentuent la production de ROS et libèrent nombreuses cytokines et enzymes. Ce contenu cytotoxique et pro-inflammatoire, à son tour, perturbe grandement l'intégrité vasculaire et entretient un cercle vicieux et néfaste pour le greffon. Les dommages neutrophiliques sont aussi notés au niveau de l'épithélium pulmonaire où il y a une perte d'intégrité cellulaire, dysfonction des canaux ENaC et Na^+/K^+ -ATPases et irréversibilité du transport inverse des neutrophiles, tel qu'observé en SIRS et en syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) [38, 171, 172]. Simultanément, trois facteurs concomitants participent à l'activation plaquettaire : la perte d'intégrité endothéliale avec exposition du tissu sous-endothélial, l'environnement riche en leucocytes et l'activation du complément. Dans ce contexte, des microthrombi sont formés et

témoignent de l'environnement proagrégant et procoagulant résultant de

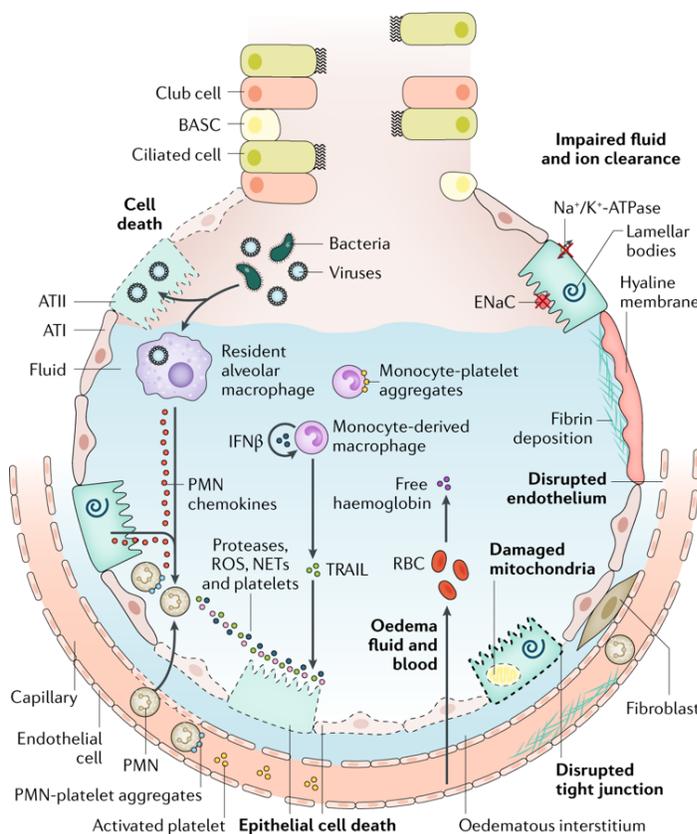


Figure 1.4. L'œdème alvéolaire.

Plusieurs stimuli sont responsables de la diapédèse du neutrophile au site lésé. Une fois dans l'alvéole, le neutrophile libère des enzymes, des ROS et des NET. Ceci contribue à la mort cellulaire et à la perte d'étanchéité de la membrane alvéolo-capillaire. Ces dommages, en conjugaison avec la dysfonction et/ou la diminution de l'expression d'ENaC et de la Na^+/K^+ -ATPase, expliquent les défauts dans la régulation du transport des fluides. Un œdème interstitiel puis alvéolaire s'ensuit avec facilitation consécutive de la transmigration neutrophilique. ATI et ATII : cellule alvéolaire de type I et II; BASC : cellule souche bronchoalvéolaire; ENaC : canal sodique épithélial; IFN : interféron; NETs : pièges extracellulaires des neutrophiles; PMN : polymorphonucléaire; RBC : globule rouge; ROS : dérivé réactif de l'oxygène; TRAIL : ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tissulaire. Figure reproduite de Springer©, 2019 [38].

l’I/R. Prises ensemble, ces insultes inflammatoires expliquent la perte d’étanchéité endothéliale et l’œdème pulmonaire non cardiogénique qui en résulte. Par ailleurs, l’activation plaquettaire engendre la libération de messagers vasoconstricteurs. Conséquence de l’endothélium dysfonctionnel, ces agents vasoconstricteurs ont des actions innoposées grâce à l’absence de potentiel vasodilatateur et cela augmente les résistances vasculaires et contribuent au déclin hémodynamique.

Biomarqueurs pronostiques

Il existe de nombreux biomarqueurs associés à la DPG. Une revue de synthèse rédigée par Hamilton *et al.* en 2017 résume ces biomarqueurs ([Figure 1.5](#)) [173]. Une majorité des biomarqueurs identifiés jouent un rôle dans l’I/R.

Chez le donneur, les niveaux de CXCL8/IL-8 dans le BAL corrént négativement avec le ratio Pa_{O_2}/Fi_{O_2} du receveur aux soins intensifs et corrént positivement avec la DPG et la mortalité à 6 mois [174]. Les niveaux d’ARNm CXCL8/dans le tissu du greffon corrént également avec la DPG [174]. Chez le receveur, la majorité des biomarqueurs identifiés jouent un rôle dans l’I/R. Nous trouvons des cytokines,

des chimiokines et des marqueurs plasmatiques de dommages épithéliaux, de défaut de coagulation et de fibrinolyse, de dommages endothéliaux et d’activation de molécules d’adhérence [121]. À l’heure actuelle, la majorité des biomarqueurs pronostiques sont identifiés aux temps postopératoires. Parmi ceux-ci, les NET dans le BAL sont associés à la DPG lorsque mesurés en postopératoire [175], et ces trouvailles seront abordées dans la section [Les NET dans la transplantation d’organes solides](#). Une étude avec 28 receveurs a montré que les niveaux sanguins d’IL-6 et de CXCL8/IL-8 avant la reperfusion étaient plus

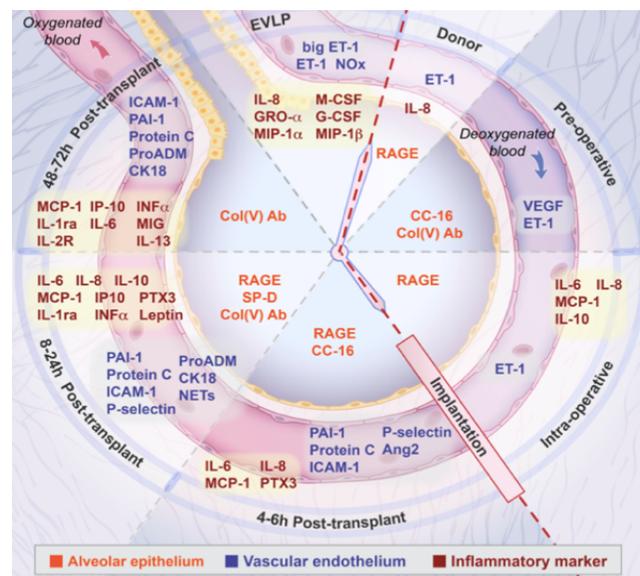


Figure 1.5. Biomarqueurs associés à la DPG.

Un code de couleur distingue les biomarqueurs inflammatoires (rouges), liés à l’épithélium alvéolaire (orange) ou liés à l’endothélium vasculaire (bleus). La mesure des biomarqueurs s’est faite dans la machine *ex-vivo lung perfusion* (EVLP), chez le donneur ou chez le receveur à différents temps. Figure reproduite avec permission de [173].

élevés chez les receveurs qui développent la DPG2-3 à 48h [176]. Après l'opération, les niveaux sanguins d'IL-6 sont plus élevés à 4h chez les receveurs qui développent la DPG3 dans les premières 72h [177]. De même, lorsque mesurés à 12h, les taux d'IL-6 sont plus élevés chez les receveurs qui développent la DPG2-3 à 72h [178]. Pour le CXCL8/IL-8, les trouvailles sont similaires et des taux élevés à 4, 8 et 24h sont associés aux receveurs qui développent la DPG2-3 à 72h [178]. En plus de ces facteurs pro-inflammatoires et chimiotactiques pour le neutrophile, des marqueurs d'adhérence cellulaire et de dysfonction endothéliale sont associés à la DPG. Dans une étude avec 128 receveurs, les niveaux plasmatiques d'ICAM-1 à tous les temps postopératoires (6, 24, 48 et 72h) étaient tous plus élevés chez les receveurs ayant développé la DPG3 à 72h [179]. L'angiopoïétine-2, un autre marqueur d'atteinte endothéliale, semble aussi être associée au développement de DPG3 dans les premières 72h, mais seulement chez les receveurs avec FPI [180]. Parmi les facteurs plaquettaires et liés à la coagulation, des niveaux élevés de P-sélectine et d'inhibiteur de l'activateur de plasminogène 1 (PAI-1) et des niveaux faibles de protéine C sont associés à la DPG [181, 182]. Des élévations postopératoires de protéines du complément (C3a, C4a et C5a) sont associées à la DPG3 à 72h et à une hausse de mortalité à 90 jours [183]. Finalement, nombreux biomarqueurs d'atteinte épithéliale sont associés à la DPG, soulignant le rôle clé d'un épithélium sain dans la résorption de l'œdème pulmonaire [173]. De façon intéressante, des chercheurs ont proposé d'ajouter la mesure de certains biomarqueurs à la définition actuelle de DPG pour préciser le pronostic. Par exemple, Shah *et al.* ont montré en 2012 que la combinaison des grades cliniques de DPG avec les mesures d'ICAM-1, de PAI-1 et du récepteur spécifique du produit final de glycosylation avancée (RAGE) améliorerait significativement la prédiction de la mortalité à 90 jours post-greffe [184]. Ces biomarqueurs ne sont toutefois pas mesurés de façon routinière en clinique.

Traitement

Il n'existe aucune thérapie curative pour la DPG. Seul un traitement de support est offert. Ce dernier vise à maintenir une fonction pulmonaire adéquate pour optimiser la récupération du greffon [74, 185]. Les principales approches disponibles sont l'inhalation d'oxyde nitrique, l'administration de prostaglandine E₁ (PGE₁), le contrôle liquidien strict, la ventilation protectrice et l'utilisation d'ECMO [74].

À l'heure actuelle, l'inhalation d'oxyde nitrique demeure controversée puisque trois études cliniques randomisées n'ont montré aucun bénéfice sur l'incidence de DPG, l'oxygénation, l'œdème pulmonaire, la durée d'extubation, la durée aux soins intensifs et la mortalité [186-188]. Considérant l'innocuité de l'agent et les résultats positifs dans les études animales [189-192], les experts encouragent tout de même l'utilisation d'oxyde nitrique pour améliorer la perfusion pulmonaire chez certains patients sélectionnés avec hypoxémie réfractaire et hypertension pulmonaire [74, 185].

Le PGE₁ est un autre vasodilatateur qui agit pour sa part en augmentant les taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [193]. En plus d'améliorer la perfusion pulmonaire, cette molécule a des effets anti-inflammatoires en diminuant l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF, interféron- γ , IL-12) et molécules d'adhérence (ICAM-1, E-sélectine) [194-196]. Une méta-analyse combinant 25 études a montré son efficacité en ARDS [197]. En greffe pulmonaire chez l'humain, les conclusions sont basées sur de petits échantillons. Une étude avec 18 receveurs a montré que l'inhalation de PGE₁ en aérosol pendant la reperfusion diminue la PAP et améliore l'oxygénation sans compromettre le statut hémodynamique [198]. L'administration de PGE₁ en bolus préreperfusion ou dans la solution de préservation améliore la survie [199]. Des auteurs suggèrent également que la PGE₁ en infusion pourrait être bénéfique chez les patients avec DPG sévère [185, 200, 201].

Un contrôle liquidien strict s'avère nécessaire pour la survie du greffon [185]. Après une greffe pulmonaire, l'inflammation systémique mine l'intégrité vasculaire et accroît la perméabilité capillaire [202]. Une charge liquidienne trop élevée peut mener à une surcharge dans certains compartiments extravasculaires, dont le compartiment aérien. Au contraire, une réduction excessive de l'apport liquidien peut mener à un déficit perfusionnel particulièrement néfaste pour les reins et les anastomoses bronchiques [185]. Ainsi, l'équipe traitante régule finement la balance liquidienne. Une restriction liquidienne partielle est souvent combinée à l'administration de vasopresseurs [185].

Pour ce qui est de la ventilation, aucune étude randomisée n'a évalué les différents paramètres ventilatoires chez les receveurs avec DPG. L'approche utilisée chez ces receveurs est donc basée sur les résultats validés en ARDS qui préconisent la ventilation protectrice. Contrairement aux volumes courants traditionnellement utilisés (10-15 mL/kg), cette méthode utilise de petits

volumes courants (6 à 8 mL/kg) pour prévenir l'hyperinflation et réduire le barotrauma [185, 203]. La ventilation et l'oxygénation sont maintenues par une augmentation de la fréquence respiratoire. Dans un modèle murin de DPG, cette approche ventilatoire protectrice a montré une meilleure oxygénation, une réduction des cytokines pro-inflammatoires et une réduction des dommages pulmonaires comparativement à la ventilation classique [204]. Par ailleurs, une étude rétrospective de 2021 chez l'humain a trouvé que la ventilation protectrice réduit l'incidence de DPG3 et la mortalité à 1 an [205].

L'ECMO est une thérapie de support permettant de fournir un débit sanguin et d'échanger les gaz [206]. Cette thérapie transitoire est utilisée en cas d'insuffisance pulmonaire et/ou cardiaque. Grâce à une pompe, le sang du patient est prélevé par une canule afférente, circule au travers d'une membrane extracorporelle responsable des échanges gazeux, et retourne dans le système vasculaire par une canule efférente. En greffe pulmonaire, les deux canules sont généralement situées dans le système veineux (ECMO V-V) et l'ECMO est utilisée à seule fin d'échanger les gaz. Dans certains cas avec dysfonction cardiaque, la canule efférente peut être placée dans une artère (ECMO V-A). Dans ce cas, l'ECMO joue le double rôle d'échanger les gaz et de fournir un débit adéquat pour remplacer le cœur défaillant et maintenir une perfusion tissulaire. Grâce aux améliorations techniques et à son accès facilité, l'utilisation d'ECMO a grandement bondi dans les 30 dernières années chez les patients avec DPG [207, 208]. En postopératoire, son utilisation est habituellement réservée aux patients avec DPG3 réfractaires aux méthodes ventilatoires conventionnelles [185]. Si l'ECMO est envisagée, l'ISHLT recommande l'initiation précoce dans les premières 48h pour favoriser la survie [207]. De même, l'ISHLT recommande de cesser son utilisation le plus tôt possible pour prévenir les complications liées à l'ECMO dont le saignement intrathoracique, la tamponnade, l'insuffisance rénale, la sepsie et l'embolie [185]. Chez certains patients à haut risque de DPG, l'ECMO intraopératoire peut substituer la CEC conventionnelle [209-211]. Cette thérapie peut également être utilisée avant la greffe chez les receveurs gravement malades qui attendent leur transplantation [185].

Considérant le nombre restreint de thérapies offertes, plusieurs chercheurs travaillent à trouver des thérapies à visées préventives ou curatives. Dans cette optique, il s'avère que l'inflammation stérile en DPG est une avenue intéressante pour développer de telles thérapies, mais il reste

plusieurs étapes à franchir pour bien élucider le rôle des leucocytes et de l'inflammation dans la DPG.

1.4 Neutrophiles

Les neutrophiles, qui forment 50 à 70% des cellules immunitaires circulantes, sont essentiels à la défense innée de l'organisme [212]. D'une taille de 7-10 μm , ces leucocytes ont un noyau plurilobé et leur cytoplasme contient quatre types de granules : azurophiliques, spécifiques, gélatinases et sécrétoires [213]. Les neutrophiles défendent l'organisme des microbes par trois mécanismes : la phagocytose, la dégranulation et la libération de NET. Ces mécanismes sont particulièrement efficaces pour défendre l'organisme en raison du contenu varié des granules neutrophiliques. Dans ces granules se trouvent des cytokines et chimiokines pour la communication intercellulaire, des protéines membranaires pour l'adhésion et la migration tissulaire, des enzymes cytotoxiques pour la défense contre les microbes, et diverses protéines pour la dégradation, le remodelage et la réparation tissulaire [212, 213]. Ces composantes expliquent le rôle clé que peuvent jouer les neutrophiles en situation d'inflammation aiguë.

La cinétique des neutrophiles dans le sang

Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse par granulopoïèse [214]. Cette genèse se déroule sur 7 à 10 jours en trois phases : la prolifération de la cellule souche hématopoïétique, la différenciation des cellules multipotentes vers les lignées myéloïdes puis granulocytaires, et la maturation des granulocytes avant leur libération dans la circulation sanguine [215, 216]. La granulopoïèse est modulée par l'action synergique de plusieurs messagers, le plus important étant le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF). Ce messager est produit et relâché par diverses cellules, dont les macrophages, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les fibroblastes par suite de leur activation par les cytokines IL-1, IL-6, TNF, IL-17A ou par contact antigénique avec le LPS [217]. Cette production d'IL-17A et de G-CSF est finement régulée par les macrophages tissulaires qui, selon leur degré de phagocytose, détectent la quantité de neutrophiles et régulent la neutropoïèse. Au niveau de la moelle osseuse, le rôle du G-CSF sur la granulopoïèse s'effectue à deux principaux niveaux [218]. D'une part, il induit une différenciation neutrophilique des progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse. Ensuite, il exerce un rôle majeur dans la mobilisation et la démarginalisation des neutrophiles vers le compartiment vasculaire en inhibant l'axe CXCR4-CXCL12. Outre le G-CSF, d'autres facteurs

tels que le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), l'IL-6 et l'IL-3 participent également à moduler la granulopoïèse [219]. Somme toute, environ 2×10^{11} neutrophiles sont produits quotidiennement alors que seulement 7×10^9 neutrophiles circulent à tout moment dans le sang d'un adulte en santé. Cela témoigne donc d'un grand roulement des neutrophiles dans l'organisme. En absence d'inflammation, le neutrophile peut circuler dans le compartiment sanguin pendant 8 à 20h avant de mourir par apoptose [220]. En situation d'inflammation, la neutropoïèse peut aussi être accrue de façon urgente, avec libération subséquente de neutrophiles immatures dans le sang qui vivront jusqu'à quatre jours dans le tissu lésé [220-222].

Une fois en circulation, les neutrophiles sont très mobiles et environ 50% sont présents à tout moment dans des réservoirs, par un concept nommé marginalisation [223]. Ces réservoirs consistent en des espaces intravasculaires présents dans certains organes clés (le foie, la rate et la moelle osseuse) où le temps de transit capillaire du neutrophile est plus élevé que dans d'autres organes [223]. À titre d'exemples, les temps de transit pour le neutrophile sont de 2 minutes dans le foie [224] et de 10 minutes pour la rate et la moelle osseuse [224, 225]. Ces réservoirs sont très sensibles à nombreux stimuli systémiques pouvant moduler la marginalisation. Un exemple populaire qui remonte à 1961 est la découverte d'une démarginisation importante en réponse à l'exercice et à l'administration d'adrénaline [226]. Des études ont également montré que le poumon pourrait constituer un organe réservoir important pour le neutrophile, et ce particulièrement en conditions inflammatoires [227, 228]. Dans le poumon, la séquestration des neutrophiles s'effectue au niveau capillaire, conséquence du diamètre capillaire maximal d'environ $7,5 \mu\text{m}$. Sous divers stimuli inflammatoires, les neutrophiles circulants sont amorcés et surexpriment CD11b/CD18 (CD; cluster de différenciation) pour adhérer à l'endothélium pulmonaire. Les neutrophiles deviennent aussi rigides, ce qui empêche leur déformation lors du passage étroit dans le capillaire [227, 229]. Ces changements expliquent le transit pulmonaire prolongé pouvant parfois atteindre jusqu'à 20 minutes [227, 229]. Un exemple de stimulus inflammatoire est l'amorçage *ex vivo* des neutrophiles par le GM-CSF qui provoque une rétention pulmonaire de 96% des neutrophiles injectés [230]. Une théorie largement acceptée stipule qu'un poumon sain séquestre seulement les neutrophiles amorcés et facilite ensuite leur désamorçage pour les libérer dans la circulation systémique [223, 231]. Au contraire, le poumon malade perd cette capacité à désamorcer les neutrophiles séquestrés et ceux-ci migrent dans le tissu

pulmonaire. Ce poumon pathologique peut de surcroît devenir lui-même un site d'activation important pour le neutrophile. Tout bien considérée, la cinétique des neutrophiles circulants est donc finement régulée. Les réservoirs du corps permettent à l'organisme de mobiliser très rapidement une quantité importante de neutrophiles en cas de besoin.

La migration tissulaire des neutrophiles

La migration tissulaire du neutrophile s'effectue par quatre étapes : le roulement, l'activation, l'adhésion et la diapédèse (Figure 1.6) [232-235]. Cette cascade a été bien décrite au niveau de l'endothélium des veinules post-capillaires, principal site de migration tissulaire en réponse à l'inflammation.

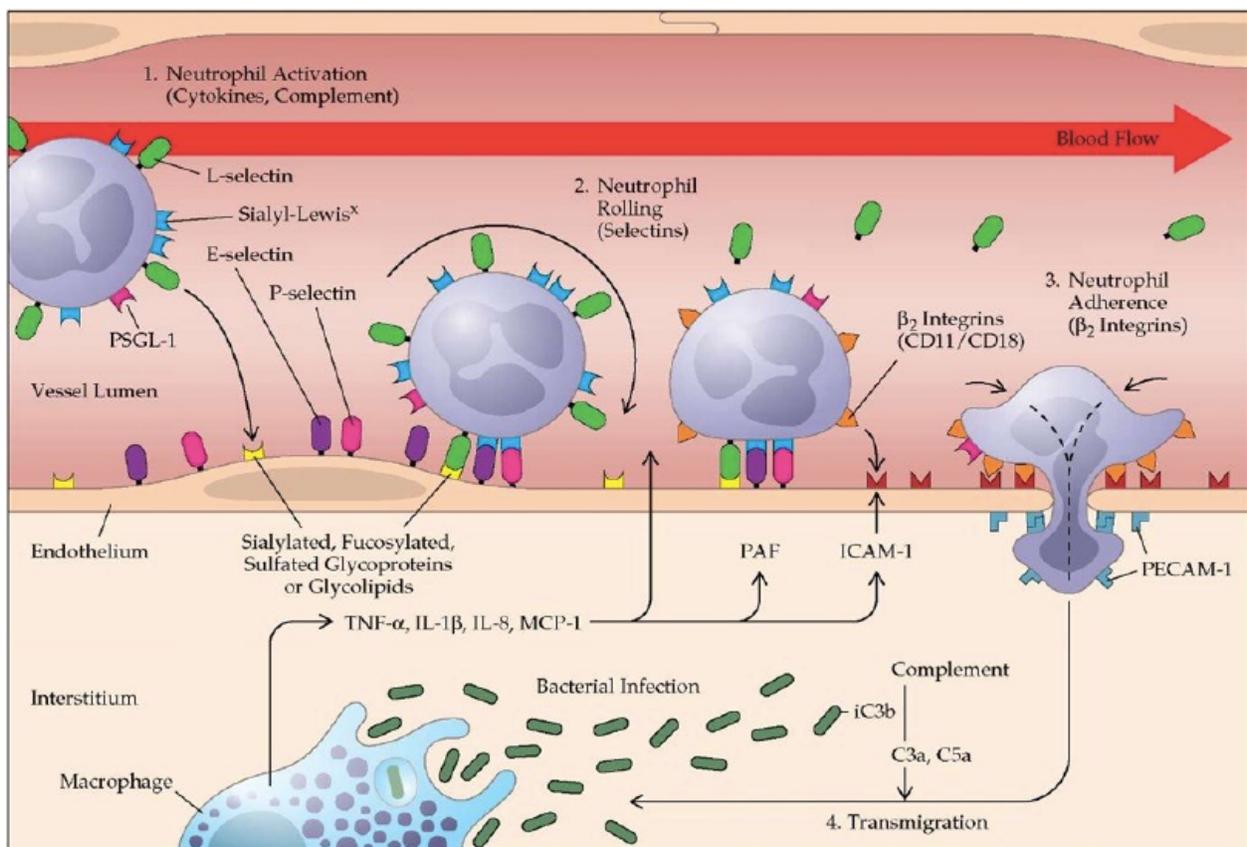


Figure 1.6. La diapédèse du neutrophile.

Des stimuli pro-inflammatoires médient la translocation de L-sélectine et de PSGL-1 sur le neutrophile et de E- et P-sélectine sur les cellules endothéliales, ce qui permet le roulement du neutrophile sur l'endothélium. Le neutrophile est ensuite activé et adhère fermement à l'endothélium grâce à la liaison entre ses ligands β₂-intégrines CD11b/CD18 et le récepteur ICAM-1 de l'endothélium. La transmigration du neutrophile entre les cellules endothéliales s'effectue finalement grâce aux intégrines et à PECAM-1 (CD31). Figure reproduite avec la permission de Springer : Surgery, Copyright© 2008 [232].

En premier lieu, le neutrophile roule sur l'endothélium activé. Ce roulement est médié par l'interaction entre deux molécules du neutrophile, la glycoprotéine de la P-sélectine ligand 1 (PSGL-1) et L-sélectine, et deux molécules de l'endothélium, P-sélectine et E-sélectine. Alors que PSGL-1 et L-sélectine sont exprimées de façon constitutive sur la membrane du neutrophile, l'inflammation est nécessaire pour l'expression des molécules endothéliales. En effet, l'inflammation entraîne rapidement une translocation membranaire des P-sélectines emmagasinées dans les granules α et les corps de Weibel-Palade. Environ 1 heure après le stimulus inflammatoire, il y a une transcription accentuée des E-sélectines et de substrats pour L-sélectine. Les interactions neutrophiles-endothélium qui en résultent permettent alors un ralentissement fort efficace du flot vasculaire neutrophilique. À titre d'exemple, le roulement résultant des interactions PSGL-1/E-sélectine permet une vitesse de 3-7 $\mu\text{m/s}$ [234]. Fait important, le roulement des neutrophiles est aussi rendu efficace par les interactions neutrophiles-neutrophiles et neutrophiles-plaquettes activées qui découlent des interactions PSGL-1/L-sélectine et PSGL-1/P-sélectine, respectivement [234].

En deuxième lieu, l'activation des neutrophiles survient pour solidifier l'adhésion et mener à l'arrêt du neutrophile [232, 234]. En milieux inflammatoires, plusieurs cellules dont les endothélicytes, les plaquettes et les autres leucocytes libèrent des cytokines et des chimiokines. Ces molécules se lient au récepteur couplé aux protéines G du neutrophile roulant et permettent l'activation du neutrophile et l'expression des intégrines. Quatre β_2 -intégrines sont exprimées par le neutrophile dont deux sont particulièrement importantes : l'antigène macrophage-1 (Mac-1) et l'antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA-1). En réponse au stimulus inflammatoire, l'endothélium activé exprime conséquemment ICAM-1, le ligand de Mac-1 (CD11b/CD18) et LFA-1. L'interaction de Mac-1 et LFA-1 avec leur ligand situé sur l'endothélium, ICAM-1, permet donc une adhésion ferme du neutrophile circulant. L'arrêt complet du neutrophile est obtenu [232, 234].

En troisième lieu, le neutrophile arrêté sur l'endothélium transmigre vers le tissu par un processus nommé diapédèse. Pour y arriver, le neutrophile modifie sa conformation pour transiter entre deux cellules endothéliales (migration paracellulaire) ou au travers de la cellule endothéliale (migration transcellulaire) [236]. Ces changements de conformation sont possibles grâce aux interactions fermes entre le neutrophile et l'endothélium, notamment grâce au CD31 (PECAM-1) situé au niveau des jonctions endothéliales. Le neutrophile perce ensuite la membrane basale

grâce à la libération de collagénases et il migre dans le tissu par un gradient chimiotactique local [232, 234].

1.5 Pièges extracellulaires des neutrophiles (NET)

Les NET constituent l'un des mécanismes utilisés par le neutrophile pour défendre l'organisme. Les premières ébauches de la découverte des NET remontent à 1996 où un mécanisme de mort cellulaire non apoptotique et non nécrotique a été décrit chez le neutrophile à la suite de la stimulation au phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) [238]. En 2004, le groupe d'Arturo Zychlinsky a officialisé la découverte des NET en caractérisant ces structures et en élucidant leur fonction immune [239]. Les NET sont des complexes formés de filaments d'ADN ornés de protéines issues du neutrophile (Figure 1.7). Parmi ces protéines attachées se trouvent des histones, des enzymes lysosomales et des peptides antimicrobiens. De façon intéressante mais toujours incomprise, seulement 20% des neutrophiles produisent des NET [240]. Lorsque

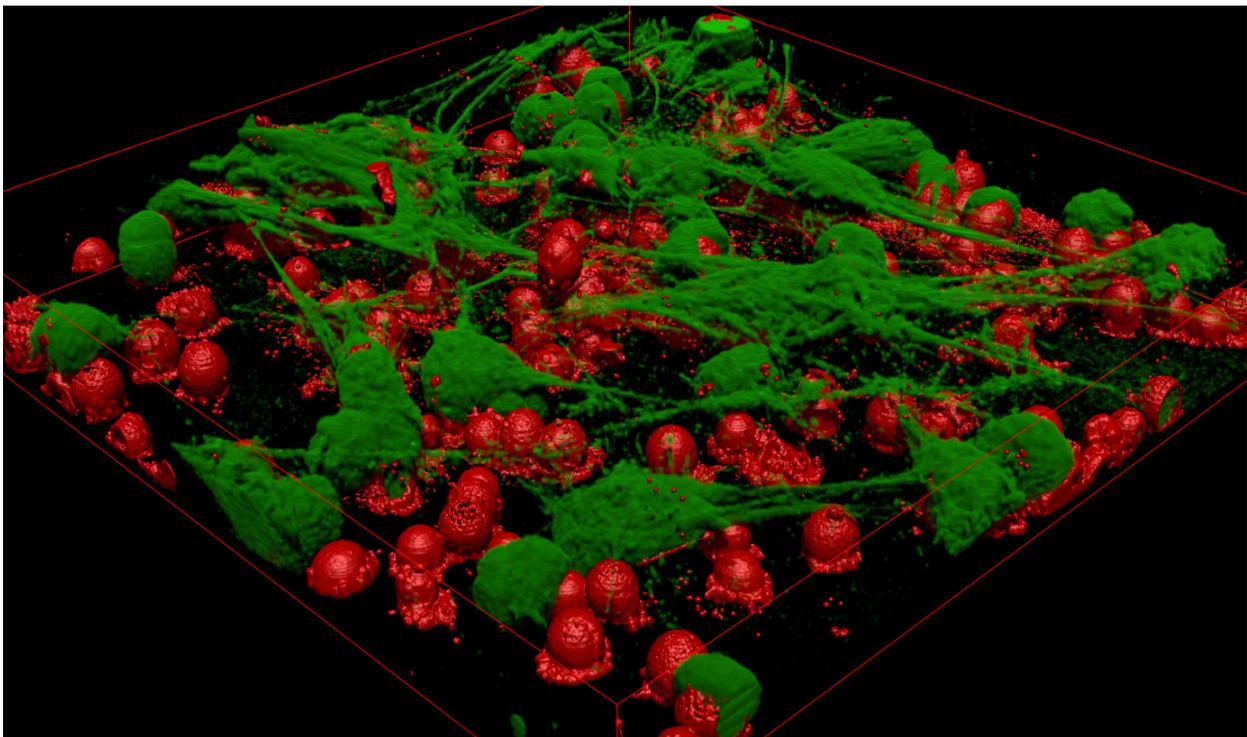


Figure 1.7. Neutrophil extracellular traps.

Des neutrophiles (rouges) libèrent des NET (verts). Des neutrophiles (rouges) libèrent des NET (verts). Les neutrophiles ont été traités avec phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) (25 nM) pendant 3h. Les membranes cellulaires sont visualisées avec *wheat germ agglutinin Alexa Fluor 647* (rouge) et l'ADN avec SYTOX Green (vert). Figure reproduite de [237].

relâchés, les NET sont particulièrement efficaces à protéger contre les pathogènes bactériens pour deux principales raisons : ils encapsulent leur cible grâce à leur structure en filet et ils détruisent le pathogène grâce à leurs nombreuses enzymes cytotoxiques. Cette libération de NET, stratégie évolutive fort efficace du neutrophile dans la défense innée, est toutefois toxique pour l'hôte dans certaines situations. L'activation inappropriée du neutrophile et la libération excessive de NET peuvent endommager le tissu et contribuer à de nombreuses pathologies [238, 239].

La synthèse et la libération des NET

Il a été décrit qu'au moins deux grands mécanismes existent pour la formation de NET : la NETose suicidaire et la NETose vitale (Figure 1.8) [222, 242]. Dans le premier cas, la libération de NET est un évènement terminal et la mort du neutrophile s'ensuit. Cette NETose suicidaire peut être sous-divisée en deux voies moléculaires distinctes, soient les voies Nox-dépendante et Nox-indépendante [241, 243]. Dans la NETose vitale au contraire, le neutrophile devient anucléaire, mais demeure viable et fonctionnel.

Deux cascades ont également été proposées pour la NETose vitale et sont distinguées par la libération d'ADN mitochondrial ou d'ADN nucléaire [242, 244, 245]. Malgré les nombreuses avancées en recherche depuis la découverte des NET en 2004, plusieurs éléments sont toujours manquants pour saisir adéquatement le processus de NETose dans sa complexité, et deux facteurs contribuent à cette difficulté. D'une part, la majorité des expériences sur la NETose s'effectuent en conditions *in vitro*, ce qui limite notre compréhension des mécanismes *in vivo*. D'autre part, les chercheurs doivent composer avec des différences physiologiques non négligeables entre espèces qui freinent l'extrapolation des trouvailles faites avec des études animales [246].

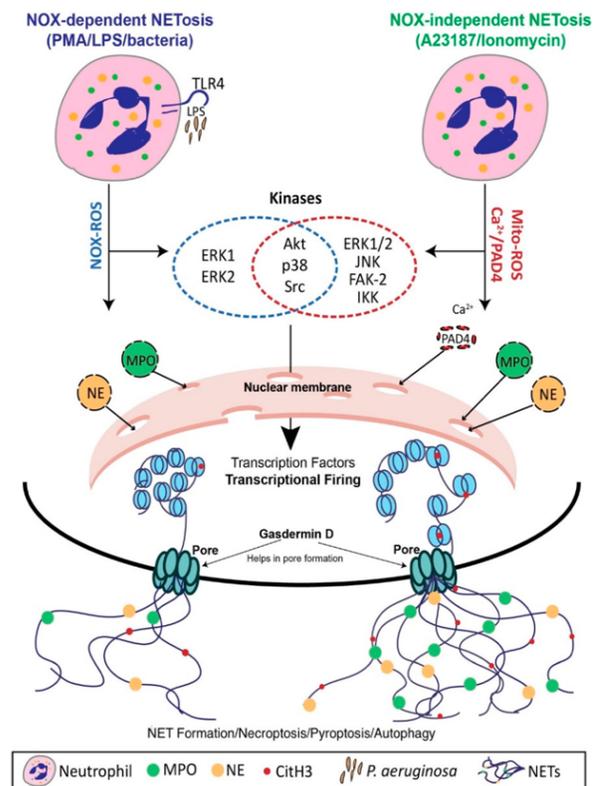


Figure 1.8. Les voies de NETose.

La NETose s'effectue par les voies NOX-dépendante et NOX-indépendante. MPO : myéloperoxydase; NE : neutrophil élastase; CitH3 : histone citrullinée H3. Figure reproduite [241].

La NETose suicidaire peut prendre jusqu'à 3 heures et s'effectue par les voies Nox-dépendante et Nox-indépendante [241, 243]. En présence d'agonistes tels que le PMA, la voie Nox-dépendante débute par un influx de Ca^{2+} intracellulaire en provenance du réticulum endoplasmique. Cet influx ionique accentue l'activité de la protéine kinase C et phosphoryle gp91phox/Nox2, avec comme résultante la génération de ROS intracellulaire. Ces ROS induisent l'autophagie et provoquent la lyse des membranes granulaires et nucléaires ce qui, grâce à un mécanisme toujours inconnu, permet la migration d'enzymes granulaires vers le noyau [243, 247, 248]. Cette étape clé s'ensuit alors de deux processus menant à la décondensation de l'hétérochromatine. D'une part, il y a contact des enzymes azurophiliques élastase neutrophilique (NE) et myéloperoxidase (MPO) avec le contenu nucléaire et celles-ci agissent en synergie pour dégrader certaines histones et favoriser la décondensation de la chromatine. D'autre part, les quantités importantes de Ca^{2+} peuvent activer l'enzyme protéine arginine désiminase 4 (PAD4) qui, une fois dans le noyau, convertit les résidus arginines pour des résidus citrullines au sein des histones H3 [249-252]. Cette modification réduit grandement l'attraction entre les charges négatives de l'ADN et les charges positives des résidus arginines, permettant donc de décondenser la chromatine. L'implication de PAD4 est toutefois encore incertaine dans cette voie Nox-dépendante [241]. Finalement, le noyau du neutrophile perd son aspect plurilobé et s'arrondit, l'enveloppe nucléaire devient perméable et rompt, et s'ensuit en définitive la perméabilisation de la membrane cellulaire avec extrusion des NET [246]. Cette voie Nox-dépendante est essentielle, entre autres, chez l'humain, tel que suggéré par l'absence de NETose chez les patients avec maladie granulomateuse chronique [253]. De son côté, la NETose Nox-indépendante est grandement dépendante de PAD4. Par suite de la stimulation par des ionophores de calcium tels que l'ionomycine ou le A23187, l'influx de calcium active les nombreuses enzymes PAD4 cytoplasmiques. Celles-ci transloquent dans le noyau pour décondenser l'ADN grâce à la citrullination des histones H3. Cette voie requière la génération de ROS mitochondriaux, ce qui n'est pas nécessaire dans la voie Nox-dépendante [241, 243].

La NETose vitale, pour sa part, est beaucoup plus rapide et peut être complétée entre 5 et 60 minutes [241]. La première cascade proposée par Yipp et Kubes utilise l'ADN nucléaire et nécessite l'adhésion du neutrophile avec une plaquette [242, 244]. Pour initier la NETose, la plaquette doit être activée par une bactérie à Gram négatif par la liaison du récepteur de type Toll (TLR) 4 et du lipopolysaccharide (LPS), ou par une bactérie à Gram positif par la liaison de

TLR2 et de la protéine réceptrice du complément (CR) 2. La deuxième cascade, proposée par Yousefi *et al.*, est plutôt caractérisée par l'extrusion d'ADN mitochondrial [245]. Cette cascade nécessite la production de ROS mitochondriaux, ce qui est différent de la voie ROS-indépendante de Yipp et Kubes.

Les NET dans l'inflammation vasculaire

Fuchs *et al.* ont été les premiers chercheurs à découvrir le rôle prothrombotique des NET [254]. Depuis, de nombreux travaux ont mis en évidence le cercle vicieux engendré par l'interrelation entre les NET, les plaquettes, le complément et la coagulation. D'une part, la structure unique des NET en forme de filet permet de piéger les éléments cellulaires circulants, dont les plaquettes [254, 255]. Comment les NET et les plaquettes interagissent ensemble est toujours incompris; or, des travaux suggèrent que l'interaction pourrait s'effectuer par le facteur de von Willebrand (vWF) [256-258] ou le complément [259]. Ce blocage mécanique des plaquettes par les NET, combiné à la nature pro-inflammatoire des NET, résulte en l'activation et l'agrégation plaquettaire [260]. Les plaquettes activées peuvent ensuite se lier aux neutrophiles et promouvoir davantage la NETose, ce qui entretient le cercle vicieux [260, 261]. Ensuite, les NET agissent à divers niveaux dans la cascade de coagulation pour promouvoir cette dernière [260]. En premier lieu, les NET activent le facteur XII de la voie intrinsèque [261]. De plus, les NET sont décorés de facteur tissulaire (TF) qui active la voie extrinsèque, facteur qui est aussi exprimé chez les neutrophiles activés [261-263]. Le cumul de ces deux voies aboutit par la génération de thrombine et par la formation de caillots [255]. Ces thrombi sont également très stables puisque leur dégradation est inhibée par les NET, conséquence de l'action protéolytique des enzymes bactéricides qui dégradent l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) [264]. Finalement, l'activation de la coagulation peut s'effectuer grâce au complément [255, 259]. En effet, le neutrophile activé produit diverses protéines du complément dont le C3, le facteur B et la properdine, qui se trouvent sur les NET lorsque relâchées [265]. De surcroît, certaines enzymes granulaires contenues sur les NET dont la MPO, la NE et la cathepsine G clivent et activent certaines protéines du complément [266, 267].

L'implication des NET dans l'immunothrombose est évidente dans nombreuses pathologies et complications. Dans la sepsie, les marqueurs de NET sont élevés dans le sérum et le plasma [268-271], et l'administration intraveineuse (IV) d'une désoxyribonucléase (DNase) réduit

l'agrégation plaquettaire, réduit la formation de caillots et améliore la perfusion microvasculaire [272]. Dans la thrombose veineuse profonde, les NET sont élevés en circulation chez l'humain [273, 274]. Des études chez la souris ont montré que les NET sont présents au sein des thrombi et la dégradation des NET par la DNase prévient la formation de thrombi [257, 261]. Les NET ont aussi été retrouvés dans la formation de thrombi artériels chez des patients nécessitant une thrombectomie lors de réparation d'anévrisme de l'aorte abdominale [275]. En comparaison aux volontaires sains, les patients avec cancer du poumon, du foie, du pancréas et de la vessie ont des marqueurs de NET sanguins plus élevés [276, 277]. Chez les patients avec cancer terminal, les NET ont aussi une valeur pronostique [277]. Les NET sont impliqués dans l'anémie falciforme et leur dégradation prévient la mortalité chez la souris [278]. Finalement, les NET contribuent à l'hypercoagulabilité de plusieurs pathologies auto-immunes. Dans le lupus, les neutrophiles ont une capacité accrue de produire des NET [279, 280] et certains patients sont résistants à leur dégradation [281, 282]. Dans le syndrome anti-phospholipide, les patients ont des taux de NET plus élevés que les volontaires sains et sont moins en mesure de les dégrader [283, 284]. Dans la polyarthrite rhumatoïde, aucune étude n'a précisément détaillé la relation entre les NET et la thrombose. En comparaison aux volontaires sains, ces patients ont toutefois un sérum et des neutrophiles prompts à la libération de NET [285] et ils comportent 2-3 fois plus de risques thromboemboliques [286], ce qui suggère un lien entre les NET et la thrombose. Dans les maladies inflammatoires de l'intestin, les patients en phase active ont des taux de NET circulants plus élevés que les patients non actifs et leurs neutrophiles sont plus enclins à la NETose [287]. Chez ces patients, la dégradation des NET réduit le temps de coagulation et la formation de fibrine [288].

Les NET dans le poumon

Les NET sont pathologiques dans plusieurs maladies pulmonaires [289]. Leur présence dans les réseaux alvéolaire, tissulaire ou vasculaire peut entraîner de l'œdème non cardiogénique et de l'hypoxémie. Les NET favorisent également l'inflammation et, conséquemment, la fibrose.

Chez les patients atteints de FK, le rôle des NET a été bien étudié. Ces patients ont une lourde charge inflammatoire secondaire à l'épaississement du mucus, l'infiltration de neutrophiles et la colonisation locale par nombreux pathogènes [290]. Parmi ces derniers, les plus fréquents sont *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de

ces micro-organismes stimule directement la NETose [291-295], tout comme les cytokines et chimiokines locales trouvées chez ces patients [296, 297]. La quantité de NET corrèle avec le déclin de la fonction pulmonaire et les NET contribuent à l'obstruction du flot aérien [298]. Ils participent d'ailleurs à la formation du biofilm de *P. aeruginosa* contenu dans l'arbre bronchique de ces patients [299]. La thérapie d'inhalation par DNase I recombinée (dornase alfa; Pulmozyme®) permet de fluidifier les sécrétions, ce qui améliore la fonction pulmonaire et réduit les exacerbations [300, 301]. Encore aujourd'hui, ce traitement est largement utilisé et demeure réservé aux patients atteints de FK [300, 301].

Dans la MPOC, les neutrophiles et les NET sont pathologiques à différents niveaux. Suite à l'irritation des cellules épithéliales et des macrophages, des molécules stimulant la neutropoïèse (GM-CSF, G-CSF) sont libérées tout comme plusieurs cytokines/chimiokines favorisant le roulement, l'adhésion et la migration tissulaire des neutrophiles (CXCL8/IL-8, IL-6, CRP, LTB₄, RAGE, CXCL1) [302, 303]. La phagocytose des neutrophiles par les macrophages résidents est diminuée, ce qui accentue la survie des neutrophiles infiltrés [218, 302, 304]. Ces facteurs contribuent à un influx important et une survie majorée des neutrophiles dans les poumons de patients MPOC. La quantité de neutrophiles dans le BAL corrèle d'ailleurs avec le déclin du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) et le développement de l'emphysème [213]. Ces neutrophiles sont fortement activés et produisent des NET autant en phases chroniques que lors d'exacerbations aiguës [304-306]. Il existe une corrélation forte entre la quantité de NET contenus dans les expectorations et le degré d'obstruction aérienne et la sévérité de la maladie [306]. Cependant, aucune étude n'a évalué le potentiel de la DNase chez ces patients.

L'asthme est une maladie classiquement associée aux éosinophiles [307]. Ces éosinophiles peuvent libérer leur ADN mitochondrial sous forme d'*Eosinophil Extracellular Traps* [308]. De plus, il a été montré que l'implication des neutrophiles est importante chez certains patients [309]. Ces derniers ont une forme de maladie très sévère et réfractaire au traitement standard avec glucocorticoïdes [310, 311]. Dans leurs poumons, les quantités de neutrophiles produisant des NET sont supérieures à la quantité d'éosinophiles [308]. Enfin, le traitement avec DNase réduit le stress oxydatif et améliore la résistance pulmonaire dans des modèles de souris asthmatiques [312, 313].

Dans la pneumonie, les neutrophiles sont largement recrutés au site infecté et produisent d'importantes quantités de NET. Le *S. pneumoniae* induit directement la NETose et la quantité de NET corrèle avec la sévérité de l'atteinte histopathologique chez la souris [314]. Ce pathogène exprime également EndA, une endonucléase lui permettant de dégrader les NET qui est essentielle à la dissémination bactérienne systémique [315]. Dans la pneumonie bactérienne à *H. influenzae*, les NET sont incapables de détruire le pathogène et il existe une association entre des quantités de NET excessives et la sepsie [316-318]. Dans la tuberculose pulmonaire, les neutrophiles et les NET peuvent capturer le *Mycobacterium tuberculosis* mais sont incapables de le tuer [319, 320]. Dans la pneumonie virale à l'influenza, des modèles de souris ont montré une libération excessive de NET qui sont emprisonnés au sein des alvéoles, contribuant à l'obstruction aérienne et à la perte d'étanchéité alvéolo-capillaire [321].

Dans le TRALI, les patients ont des quantités importantes de NET dans le sérum et dans les vaisseaux pulmonaires [322, 323]. Des modèles de souris ont permis de déceler le rôle essentiel des plaquettes dans la formation des NET [322, 323] et dans la physiopathologie du TRALI [324]. Il existe un cercle vicieux où les plaquettes et les neutrophiles s'activent et contribuent à l'occlusion vasculaire et aux dommages pulmonaires [258, 322, 323]. Le traitement préventif des souris avec des anticorps anti-histones a réduit la quantité de NET sériques, l'œdème pulmonaire et la mortalité [323]. De même, l'administration de DNase intranasale réduit la formation de NET et la séquestration plaquettaire tout en améliorant la fonction pulmonaire [322, 323]. Zhu *et al.* ont aussi montré chez l'humain que la quantité de NET plasmatiques corrèlent avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire, et que les neutrophiles des patients gravement atteints sont davantage prompts à la NETose [325].

Dans les lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique (VALI), les neutrophiles et les NET sont impliqués dans les phases précoces et tardives des dommages et corrèlent avec la sévérité de l'atteinte [326-329]. Des nouveau-nés prématurés ventilés pour de courtes périodes ont exprimé d'importantes niveaux de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la synthèse de NET [330, 331]. Dans un modèle de souris ventilées à hauts volumes courants, le BAL des poumons lésés comportait d'importantes quantités de cytokines et de NET [332]. Les effets de la DNase sont toutefois incertains. Rossaint *et al.* ont montré que l'injection de DNase après l'insulte ventilatoire permettait de réduire les taux de NET circulants et d'améliorer les échanges

gazeux [326]. Au contraire, Yildiz *et al.* n'ont observé aucun bénéfice clinique avec l'administration intratrachéale de DNase quoiqu'ils ont noté une réduction des NET dans le BAL [332].

Finalement, les neutrophiles et les NET sont fortement impliqués dans les complications associées à la COVID-19. Chez ces patients, la tempête inflammatoire fournit un milieu idéal à l'activation neutrophilique, et un grand rôle est joué par l'IL-6 [333]. Un ratio neutrophiles sur lymphocytes de $\geq 4,8$ est associé à une maladie plus sévère avec une sensibilité et une spécificité de 78% [334]. Les patients atteints de la COVID-19 ont des taux circulants plus élevés de NET que les volontaires sains, et leur sérum peut induire la libération de NET chez des neutrophiles sains *in vitro* [335-337]. Aussi, les taux de NET sanguins corrélaient directement avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire [337, 338]. Des autopsies ont permis de découvrir que l'agrégation des NET est au cœur de l'occlusion microvasculaire des poumons malades [337, 339-341], confirmant l'implication majeure des NET dans les complications thrombotiques de ces patients [342]. Des résultats préliminaires démontrent que la DNase inhalée pourrait réduire les taux de NET dans le BAL et améliorer l'oxygénation [343-345].

Les NET dans la transplantation d'organes solides

Les NET sont impliqués dans l'I/R, étape cruciale pour tous les types de transplantations d'organes solides. En 2016, Albadawi *et al.* ont été les premiers chercheurs à tester la DNase dans un modèle d'I/R. Leurs résultats ont montré que la dégradation des NET réduisait le recrutement leucocytaire et améliorait la perfusion dans des muscles de souris [346]. Ces conclusions ont suscité l'intérêt pour de plus amples recherches. Une méta-analyse combinant 95 articles a montré que les taux d'ADN libre (cfDNA) du donneur, mesurés dans le sang du receveur, comportaient une validité pronostique pour tous les types de transplantations d'organes solides [347]. En transplantation rénale, les NET sont formés après la reperfusion et leur dégradation par la DNase réduit les dommages tissulaires chez la souris [348, 349]. L'expression de PAD4 était grandement accrue à 24h chez les neutrophiles qui ont infiltré le greffon, suggérant un rôle important de PAD4 dans la formation des NET en I/R rénale [348]. Des souris sauvages déficientes en PAD4 étaient également protégées des dommages rénaux et ne produisaient pas de NET [348]. En transplantation hépatique, les niveaux sanguins de MPO-ADN sont élevés dans la phase anhépatique (i.e. lorsque le foie est explanté) alors que le cfDNA et les nucléosomes sont

élevés après la phase de reperfusion [350]. Chez ces patients, le cfDNA et les nucléosomes corrélaient avec les marqueurs de coagulation, et des biopsies post-reperfusion ont montré des neutrophiles en NETose au sein des greffons [350]. Chez des patients avec I/R lors de résections hépatiques partielles, Yazdani *et al.* ont trouvé que l'IL-33 jouait un grand rôle dans la NETose [351]. Finalement, l'inhibition de la NETose permet de réduire les dommages d'I/R hépatiques chez des rats [352]. Pour les transplantations cardiaques et intestinales, aucune étude n'a évalué le rôle des NET. Cela dit, plusieurs auteurs ont examiné le rôle des NET dans l'I/R associée à ces organes. Dans l'I/R cardiaque, la dégradation des NET est bénéfique puisque la DNase a diminué le dommage cardiaque chez des rats [353]. Dans l'I/R intestinal, la DNase réduit la réponse inflammatoire [354, 355], diminue l'infiltration leucocytaire [355] et permet de restaurer l'intégrité de la barrière intestinale chez les rats [354].

Dans la transplantation pulmonaire, le rôle des NET a été partiellement étudié par un groupe de la Californie [175, 356]. En 2015, Sayah *et al.* ont montré que les taux de NET dans le BAL augmentent après la transplantation pulmonaire tant chez les souris que chez les humains [175]. Ils ont découvert une association claire entre la sévérité de la DPG, la quantité de NET et la déficience relative en DNase intrabronchique [356]. Tout comme chez les souris déficientes en PAD4, l'administration de DNase intrabronchique diminue la quantité de NET, de neutrophiles et de fuites intrabronchiques en plus d'améliorer l'oxygénation [175]. Leurs travaux ont également mis en lumière l'accumulation d'ADN mitochondrial dans les alvéoles très rapidement après la reperfusion qui pourrait résulter de la mort cellulaire comme décrit dans nombreux autres processus inflammatoires stériles et bactériens (sepsis, trauma, ARDS, etc.) [356]. L'accumulation d'ADN mitochondrial, en plus de témoigner de dommages tissulaires, constitue un inducteur puissant de NETose suicidaire par la voie TLR9 [356]. Les bienfaits de la DNase pourraient donc être doubles : l'enzyme dégrade à la fois l'ADN mitochondrial et les NET [356]. Dans ce contexte, la dégradation de l'ADN mitochondrial pourrait bloquer en amont la synthèse de NET en prévenant l'activation de TLR9. Ce blocage en amont pourrait être particulièrement souhaitable considérant le potentiel immunogénique des NET lorsque dégradés [357]. De plus, ces chercheurs ont mesuré les niveaux plasmatiques de complexes NE-DNA en préopératoire, à 4-6h et à 24h postopératoire et n'ont trouvé aucune association avec le développement de DPG3 persistante (DPG3 qui persiste à 24h, 48h et 72h). Finalement, un groupe de Toronto a décrit pour la première fois la présence des NET dans le perfusat de l'EVLP, et ils ont montré que ces

NET corrélaient avec la durée de ventilation mécanique chez le receveur [358]. Cependant, aucune étude n'a examiné le rôle de la DNase dans l'EVLP.

Dégradation des NET

La DNase I est une enzyme permettant de dégrader l'ADN. Elle hydrolyse les liaisons phosphodiester entre les nucléotides [359]. Son pouvoir catalytique est optimal avec un pH de 7,0 et en présence de Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+} [360]. Cette enzyme est principalement retrouvée dans le pancréas, les reins et le tractus gastro-intestinal [361, 362]. Elle est aussi retrouvée dans le sang avec une concentration de 3 à 10 ng/mL [363, 364]. La concentration de DNase I dans le sang est surtout dépendante du pancréas et de l'hypophyse [365-367] et varie en fonction de certains états pathologiques [366, 368-370]. Parmi d'autres, les patients avec certaines maladies pulmonaires interstitielles [371], lupus [222], pancréatite chronique [366], cancer du pancréas [368] ou glomérulonéphrite [369, 370] ont des quantités ou activités réduites de DNases circulantes. Dans le BAL des receveurs avec DPG, il existe une déficience relative de DNase comparativement aux patients non-DPG [356].

Dans nombreuses maladies associées à la NETose, l'ADN est présente en trop grandes quantités et les niveaux de DNase endogènes sont insuffisants. Pour contrer ce problème, des chercheurs ont administré la DNase I exogène et ont obtenu des résultats notables. Dans la sepsie à *Escherichia coli*, l'administration IV de DNase réduit l'inflammation et améliore la survie [372]. L'utilisation de DNase IV chez des souris septiques réduit également l'agrégation plaquettaire et la coagulation en plus d'améliorer la perfusion microvasculaire [272]. Chez des souris cancéreuses et non cancéreuses, la DNase réduit l'incidence de thromboses veineuses profondes [257, 373, 374]. Chez des souris avec anémie falciforme, la DNase IV réduit les complications et améliore la survie [278]. Chez des souris avec infarctus du myocarde, la DNase réduit la zone nécrosée et améliore le remodelage ventriculaire [353, 375]. Au niveau pulmonaire, la DNase I par voie IV réduit l'œdème pulmonaire et la perméabilité vasculaire chez des souris avec TRALI [323]. Par ailleurs, la DNase I inhalée est un traitement crucial chez de nombreux patients atteints de fibrose kystique [300]. Ce traitement réduit la viscosité du mucus et facilite sa sécrétion [376]. La DNase améliore la fonction pulmonaire et réduit les exacerbations infectieuses [300, 301, 376]. Chez les jeunes enfants avec bronchiolites compliquées, la DNase I inhalée améliore l'état clinique et l'aspect radiologique en plus de corriger l'atélectasie [377,

378]. Cet impact sur l'atélectasie semble aussi être bénéfique après une chirurgie [379]. Chez des patients intubés atteints de la COVID-19, l'utilisation de DNase I inhalée pourrait améliorer la fonction pulmonaire [343-345], mais des essais cliniques randomisés sont nécessaires pour fins de validation. Malgré des résultats encourageants chez les animaux [312, 313], la DNase inhalée n'a fourni aucun bénéfice chez des patients asthmatiques [380] et des patients avec bronchiectasies [381, 382]. Finalement, Sayah *et al.* ont montré que l'inhalation de DNase I chez les rats avec DPG réduisait les dommages pulmonaires et améliorait l'oxygénation [175, 356].

L'administration de DNase I par voie IV chez l'humain a été étudiée par Davis Jr *et al.* en 1999 chez des patients avec néphrite lupique [383]. Chez ces patients, il y a un défaut de clairance des NET secondaire à une activité réduite de la DNase endogène [222]. L'essai clinique de phase 1b à double insu et contrôlé par placebo a montré que la DNase I IV (à doses de 25 µg/kg ou 125 µg/kg) est sécuritaire chez les patients avec néphrite lupique [383]. Chez ces patients, l'activité enzymatique est soutenue pour deux à huit heures après l'administration. Par ailleurs, une étude menée par Genentech avec 15 volontaires sains a montré que l'administration de DNase I par voie IV est sécuritaire à des doses variables (5, 25, 125 ou 500 µg/kg) [384]. De plus, des injections quotidiennes pour cinq jours à des doses de 500 µg/kg ne menaient à aucune bioaccumulation du médicament dans le sang [384]. À cet effet, la DNase I par voie IV pourrait être une option thérapeutique sécuritaire et à faible coût pour dégrader les NET dans plusieurs maladies. En greffe pulmonaire, la DNase I par voie IV pourrait potentiellement prévenir ou traiter la DPG et améliorer significativement la survie des receveurs.

1.6 Objectifs de recherche

Il a été suggéré que plusieurs cytokines, dont le CRP, l'IL-6 et le CXCL8/IL-8 sont responsables d'induire la synthèse et la libération de NET [237, 385]. Les NET contribuent à l'inflammation vasculaire et aux phénomènes proagrégants et procoagulants dans nombreuses pathologies [254, 257, 261, 268-275]. Les NET exacerbent les lésions d'I/R et ils sont délétères en transplantation hépatique et rénale [346-350]. Des études animales ont montré que les taux de NET sont élevés dans la greffe pulmonaire et que leur dégradation par la DNase I s'avère bénéfique pour prévenir la DPG [175].

Considérant les affirmations énumérées précédemment, les buts de ce travail sont : 1) déterminer les niveaux circulants de biomarqueurs associés à la NETose chez les donneurs et les receveurs en greffe pulmonaire; et 2) corréler ces biomarqueurs avec le développement de la DPG3. Ces objectifs permettront de vérifier notre hypothèse stipulant que les taux circulants de NET (MPO, cfDNA, MPO-ADN) et de biomarqueurs associés à la NETose (CRP, IL-6 et CXCL8/IL-8) sont associés au développement de la DPG3 chez les receveurs.

CHAPITRE 2 : ARTICLE

Soumission #1:

Journal: The Journal of Heart and Lung Transplantation

Statut: Soumis 03/2022, refusé 06/2022.

The Journal of Heart and Lung Transplantation Editorial Manager
Role: Author Username: stevenbonneau

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES

← Submissions with an Editorial Office Decision for Author

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Results per page 10

Action	Manuscript Number	Title	Authorship	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
Action Links	JHLT-D-22-00258	Impact of neutrophil extracellular traps (NETs) in primary graft dysfunction following human lung transplantation	Other Author	Mar 28, 2022	Jul 01, 2022	Completed	Jul 01, 2022	Reject

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Results per page 10

Soumission #2:

Journal: à établir

Statut: En cours de modifications

**Impact of neutrophil extracellular traps (NETs) in primary graft dysfunction
following human lung transplantation**

Steven Bonneau^{1,2}, Caroline Landry, M.Sc.^{2,5}, Stéphanie Bégin, M.Sc.², Damien Adam, Ph.D.^{2,5}, Louis Villeneuve, M.Sc.¹, Marie-Élaine Clavet-Lanthier¹, Ariane Dasilva^{1,2}, Elcha Charles, M.Sc.^{1,3}, Benjamin L. Dumont, M.Sc.^{1,3}, Paul-Eduard Neagoe, Ph.D.¹, Emmanuelle Brochiero, Ph.D.^{2,5}, Ahmed Menaouar, Ph.D.², Basil Nasir, M.D.^{2,4}, Louis-Mathieu Stevens, M.D., Ph.D.^{2,4}, Pasquale Ferraro, M.D.^{2,4}, *Nicolas Noiseux, M.D., M.Sc.^{2,4} and *Martin G. Sirois, Ph.D.^{1,3}

¹Research Center - Montreal Heart Institute, ²Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Departments of pharmacology and physiology³, surgery⁴ and medicine⁵, Faculty of medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

*Corresponding co-senior authors:

Nicolas Noiseux, Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 Saint-Denis St, Montreal, QC, Canada.

Email: nicolas.noiseux@umontreal.ca

Martin G. Sirois, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St., Montreal, QC, Canada.

Email: martin.sirois@icm-mhi.org

Running Title: NETosis in lung transplantation

List of non-standard abbreviations

ALT: Alanine aminotransferase

cfDNA: Cell-free deoxyribonucleic acid

CHUM: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

CitH3: Citrullinated histone H3

CRCHUM: Centre de Recherche – Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CRP: C-reactive protein

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

DNase: Deoxyribonuclease

dsDNA: Double-stranded DNA

ECMO: Extra-corporeal membrane oxygenation

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EVLP: Ex vivo lung perfusion

FiO₂: Fraction of inspired oxygen

HPS: Hematoxylin, Phloxine, Saffron

IL: Interleukin

IP: Intraperitoneal

IRI: Ischemia-reperfusion injury

ISHLT: International Society of Heart and Lung Transplantation

IV: Intravenous

LTx: Lung transplantation

MHI: Montreal Heart Institute

MPO: Myeloperoxidase

NETs: Neutrophil extracellular traps

NETosis: Synthesis and release of neutrophil extracellular traps

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PGD: Primary graft dysfunction

pTLC: Predicted total lung capacity

2.1 Abstract

Background: Primary graft dysfunction (PGD) is characterized by alveolar epithelial and vascular endothelial damage and inflammation, lung edema and hypoxemia. Up to one-third of recipients develop the most severe form of PGD (Grade 3; PGD3). Animal studies suggest that neutrophils contribute to the inflammatory process through neutrophil extracellular traps (NETs) release (NETosis). NETs are composed of DNA filaments decorated with granular proteins contributing to vascular occlusion associated to PGD. The main objective was to correlate NETosis with recipient PGD3 development in a prospective exploratory study.

Methods: Clinical data and blood samples were collected from donors and recipients pre-, intra- and postoperatively (up to 72hrs). Inflammatory inducers of NETs' release (IL-8, IL-6 and C-reactive protein [CRP]) and components (myeloperoxidase [MPO], MPO-DNA complexes and cell-free DNA [cfDNA]) were quantified by ELISA. When available, histology, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques were performed on lung biopsies from donor graft collected during the surgery to evaluate the presence of activated neutrophils and NETs.

Results: Lung biopsies from donor grafts collected during transplantation presented various degrees of vascular occlusion including neutrophils undergoing NETosis. Also, in recipients intra- and post-operatively, circulating inflammatory (IL-6, IL-8) and NETosis biomarkers (MPO-DNA, MPO, cfDNA) were up to 4-fold higher in PGD3 recipients compared to non-PGD3 ($p = 0.041$ to 0.001).

Conclusion: Perioperative elevation of NETosis biomarkers is associated with PGD3 following human lung transplantation. These biomarkers might serve to identify recipients at risk of PGD3 and initiate preventive therapies.

Résumé

Introduction: La dysfonction primaire du greffon (DPG) pulmonaire se caractérise par des dommages alvéolaires et endothéliaux avec œdème pulmonaire et hypoxémie. La DPG sévère affecte ~30% des receveurs parmi lesquels le tiers vont en décéder. Des études animales suggèrent que les neutrophiles contribuent au processus via les pièges extracellulaires des neutrophiles (*neutrophil extracellular trap* - NET). Les NET sont des filaments d'ADN ornés de protéines inflammatoires pouvant mener à l'occlusion vasculaire. Notre objectif principal est de corrélérer la NETose avec l'évolution clinique des receveurs.

Méthodes: Des renseignements cliniques et des prélèvements veineux chez les donneurs et les receveurs (n=36) ont été collectés pré-, intra- et post-greffe (0 à 72h). Les cytokines induisant la NETose (interleukines [IL-6, IL-8], Protéine C Réactive [CRP]) et les marqueurs de NET (myéloperoxidase [MPO], *cell-free DNA* [cfDNA] et complexes MPO-ADN) ont été quantifiés par ELISA. Lorsque des biopsies de greffons pulmonaires étaient disponibles, la présence de neutrophiles activés et de NET a été évaluée par histologie, immunohistochimie et immunofluorescence.

Résultats: Les biopsies de greffons pulmonaires ont présenté des degrés variables d'occlusion vasculaire avec des neutrophiles en NETose. Chez les receveurs pendant et après la greffe, les niveaux sanguins d'interleukines (IL-6, IL-8) et les marqueurs de NET (MPO, cfDNA et MPO-ADN) sont jusqu'à quatre fois plus élevés chez les receveurs avec DPG3 que chez les non-DPG3 (p = 0.041 à 0.001).

Conclusions: Des élévations des NET sont associées à la DPG3. Ces biomarqueurs pourraient être mesurés pour cibler les receveurs à risque qui bénéficieraient de thérapies préventives.

2.2 Introduction

Primary graft dysfunction (PGD) is the leading cause of morbidity and mortality in the perioperative period of lung transplantation, characterized by vascular endothelial and alveolar epithelial damage and inflammation, lung edema and severe hypoxemia (1). The severity of PGD is graded with the PaO₂/FiO₂ ratio and edema infiltrates at chest x-ray, where a PaO₂/FiO₂ ratio of 200 mmHg or less defines the worst PGD score (e.g. PGD3) (2). Unfortunately, one third of recipients develop PGD3 within 72hrs despite providing efforts to enhance donor lung suitability, organ preservation and perioperative management (2-4). The 30-day mortality of PGD3 recipients is up to 36% (4-8). Until now, there is neither an effective method predicting which donor lungs will develop PGD3, nor a successful therapy for PGD, the management being only supportive (3).

Neutrophils play a key role in PGD (4, 9, 10). Their detrimental implication is rooted into ischemia-reperfusion injury (IRI), a process considered the leading culprit of PGD (11-14). In animal models of lung IRI, neutrophils are sequestered in the pulmonary microcirculation during ischemia, and further recruited following reperfusion (9, 15-18). In humans, priming and activation of circulating neutrophils is likely to occur, given the highly pro-inflammatory environment in donors and recipients (4, 5, 9, 19, 20). Donor and recipient levels of two cytokines involved in neutrophilic chemotaxis or migration (IL-6 and IL-8) are potent predictors of PGD development (21-25). Thus, IRI and systemic inflammation can provide a suitable environment for neutrophil activation and neutrophil extracellular traps (NETs) formation (9, 11).

NETs are web-like structures composed of decondensed chromatin, histones and antimicrobial proteins such as myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE) (26). Originally discovered for their role against bacterial infections (26), NETs are also key drivers of several diseases. In lung transplantation, the role of circulating NETs is less clear. Increased NETs in

perfusates from ex vivo lung perfusion (EVLV) during donor lung reconditioning was associated with worse recipient outcome (27). In a murine model of PGD, Sayah and al. (10) demonstrated a platelet-dependent formation of NETs and the benefits of inhaled DNase I therapy by reducing pulmonary lesions. They also demonstrated the pathological implication of NETs in human airways but found no difference in plasma levels of NETs between PGD3 and PGD0 human recipients. However, plasma was only collected from recipients, and at limited time-points. Thus, there is a need to characterize the kinetics of circulating NETs associated to identify patients at risk of PGD, in order to better anticipate and prevent lethal complications.

Our objectives were to determine the pre-, intra- and post-operative levels of NETs and cytokines associated with NETosis in donors and recipients undergoing bilateral lung transplantation. Cytokines and NETs were correlated with the development of PGD3 in recipients. We hypothesized that pulmonary NETosis would be highly pathological, leading to endothelium injury and microvascular occlusion via neutrophil/platelets aggregates adhered onto endothelial cells. We posed that elevation of acute markers of inflammation in both donors and recipients provides a suitable milieu for NETs synthesis and PGD development.

2.3 Material and methods

Participants

This prospective observational study was conducted from July 2018 to December 2020 at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Québec, Canada. Recipients (≥ 18 yrs old) were screened before surgery and informed written consents were obtained. For 25 out of 36 donors, consent for blood sampling were obtained in written forms by Transplant Québec, the local organ procurement agency, after the family's approval. Exclusion criteria were re-transplant procedures, use of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) before surgery, patients with tuberculosis, HIV or hepatitis. The protocol was approved by the local ethics boards (Montreal Heart Institute [ICM#2019-2430], CHUM [Respiratory Tissue Biobank of CRCHUM, CE08.063] and Transplant Québec).

Study design

Venous blood samples were obtained from donors ($n = 25$) and recipients ($n = 36$) in Vacutainer separation tubes containing 1 mg/mL protamine to ensure coagulation. In donors, blood was obtained during surgery before lung procurement. In recipients, blood was collected after general anesthesia induction, during surgery before the first lung implantation and after the second lung implantation, and at 3, 24, 48 and 72hrs following second lung reperfusion. Samples were centrifuged (1500g for 15 min) and serum was aliquoted and frozen at -80°C .

Demographics (sex, age, BMI) and clinical parameters (medical history, laboratory and respiratory tests, surgical procedure, organ procurement, outcome measurement) were collected from the electronic medical record. Clinical data from all corresponding donors were included in the recipients' medical records. The outcome was a binary variable defined by PGD3 development at 12hrs following arrival of recipients in ICU post-transplant, a cut-off previously

used in other studies (between 0 to 12 hours post-ICU arrival) (28-30). This allows to identify earlier the most severely affected patients (PGD3) and separate them from patients without PGD (PGD0) or low-grade lung injuries (PGD1/2). Edema infiltrates on chest x-ray and PaO₂/FiO₂ ratios were used according to the 2016 standardized scale of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) to determine PGD grades (2).

Quantification of circulating NETs and biomarkers

As NETs are composed of DNA strands bound with proteins, including MPO, a custom ELISA using a mouse anti-human MPO capture antibody and an anti-DNA from the Cell Death Detection ELISA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) as detection antibody was performed (31). Cell-free DNA was isolated by QIAamp® Blood Mini Kit (#51106, Qiagen, Valencia, CA) and quantified with Quant-IT PicoGreen dsDNA Assay Kit (#P7589; Invitrogen, Eugene, OR). MPO was measured by ELISA (#440007, Biolegend, San Diego, CA). IL-8 and IL-6 were quantified by a high sensitivity multiplex assay (Luminex Assay; #LHSCM206 and #LHSCM208, R&D Systems). High-sensitivity CRP (hsCRP) was quantified by nephelometry at the MHI clinical biochemistry laboratory.

Lung histology and immunohistology and confocal imaging

As per standard procurement technique, donor lungs were perfused anterogradely (4L, pulmonary artery) and retrogradely (1L, pulmonary veins) with a low-potassium dextran solution (Perfadex®, XVIVO Perfusion) (32). In cases of size mismatch between donor lungs and recipients, lung specimens were obtained after lung volume reduction (peripheral segmental resection) or standard lobectomy in the donor lung. These procedures were performed during lung transplantation before lung reperfusion in the recipient. Collected tissues (1 specimen of 2 cm³ in volume per available graft) were put into 10% neutral-buffered formalin solution and

embedded in paraffin blocks. Neutrophils were detected using an anti-myeloperoxidase (MPO, #Pa5-16672; ThermoFisher, Waltham, MA) and NETosis was visualized with an anti-histone H3 citrulline R2 + R8 + R17 (CitH3, #ab5103, Abcam, Toronto, ON). For confocal imaging, platelets and endothelial cells were detected using a mouse monoclonal anti-CD41 (Santa Cruz, #sc-365938, Dallas, TX) and a rabbit polyclonal anti-CD31 (Novus Biological, #BN100-2284, Centennial, CO) primary antibodies respectively. Positive signals were revealed with a donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (Abcam, #ab150107) and donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 555) (Abcam, #ab150074) respectively. Histology and immunochemistry images were obtained using a bright field microscope (BX45 model, Olympus, Tokyo, Japan) with QImaging QICAM Fast13 camera and Image Pro Premier software (Media Cybernetic, Rockville, MA). Fluorescence images were obtained using a confocal microscope (LSM 710; Carl Zeiss, Toronto, ON). Scoring and histological procedures were performed on each of the thirteen (13) collected graft samples as previously described (33). Ten images of histology and immunochemistry (magnification, x100) were randomly selected in each tissue sample and a qualitative score was determined to assess vascular occlusion from these images (0, 25, 50, 75 or 100%). A 100% score means all or most vessels visualized (venules and arterioles) were occluded with neutrophils or NETs, whereas 25/50/75% scores mean about 25/50/75% of the blood vessels were obstructed with neutrophils or NETs. All vessels visualized in the images were used for the analyses. Blinded scoring was performed by the same observer.

Statistics

Characteristics of donors and recipients are presented as frequency (percentages), mean \pm standard deviation or median (interquartile range [IQR], quartile 1; quartile 3) as indicated according to results of normality tests. Predicted total lung capacities were calculated based on

formulas defined by Mason and al. (34) using age, gender, height and weight. Inter-group differences were assessed with chi-square tests for dichotomous variables, and with Student t or Mann-Whitney U tests for continuous variables according to distributions. Random-effect longitudinal analyses were used for cellular counts and biomarkers to account for missing time-points (PROC MIXED, SAS 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). Estimates from the models are reported and differences at each time-point were assessed with contrasts only when the overall inter-group difference was significant. Results were considered significant if $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with SPSS and SAS and figures were performed with Prism 8.

2.4 Results

Clinical results

Thirty-six (36) recipients were included from June 2018 to December 2020 for this study. Nine (9) out of 36 recipients developed PGD3 within 12hrs following surgery. Preoperative characteristics of recipients and their corresponding donors are presented in [Table 1](#). Troponin-I levels were higher ($p = 0.019$) in donors associated with postoperative PGD3 than donors not associated with PGD3 but there was no difference in the number of heart transplantation between the two groups. None of the other preoperative baseline characteristics were associated with the PGD3 group.

Intra- and postoperative characteristics of patients are displayed in [Table 2](#). Duration of surgery amongst recipients who developed PGD3 was longer ($p = 0.044$). Three recipients of the PGD3 group were placed on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) intra-operatively while four recipients were on ECMO post-operatively. Three hours following second lung reperfusion, PGD3 recipients had elevations in liver cytolysis biomarker (ALT, $p = 0.008$), renal function (creatinine, $p = 0.050$) and hypo-perfusion (lactic acid, $p = 0.004$). Finally, PGD3 was associated with postoperative hemorrhage ($p = 0.014$) and mortality within 120 days ($p = 0.002$), but prolonged (>72 hrs) mechanical ventilation was not statistically associated with PGD3.

NETs-mediated vascular occlusion in grafts

Tissue samples from 13 donor grafts were collected before reperfusion in recipients. From the 13 available grafts, 8 were associated with PGD3 and 5 with non-PGD3 outcome. Lungs from both groups present various levels of vascular occlusion with neutrophils (MPO) and NETs (CitH3) ([Figure 1A-F](#)). Using a qualitative score, vascular occlusion by neutrophils increased from 20% to 38% and NETs from 15% to 34% in non-PGD3 versus PGD3 groups, although these

elevations were not statistically significant ($p = 0.477$ and $p = 0.500$ respectively) ([Figure 1G](#)). In blood vessels showing partial to complete occlusion, both neutrophil (MPO) - platelet (CD41) interaction and adhesion onto endothelium (CD31) were present ([Figure 2A-B](#)). Neutrophils undergoing NETosis (CitH3) were adhered to the endothelium and present in the thrombus core ([Figure 2C](#)).

Circulating NETs are associated with PGD3

NETosis kinetic was measured using three biomarkers (MPO-DNA, MPO and cfDNA), in donors and recipients ([Figure 3](#)). For MPO-DNA, a specific NETosis biomarker, there was a significant difference over time between patients who developed PGD3 at 12hrs following surgery and those who did not ($p = 0.036$). Levels of MPO-DNA gradually increased intra- and post-operatively in the PGD3 group and were specifically elevated at 3hrs following second lung graft, and at 48hrs post-surgery. MPO levels also fluctuated significantly over time between the two groups ($p = 0.018$), being more elevated at the second lung implantation and 3hrs postoperatively in the PGD3 group. Finally, cfDNA levels were also higher in the PGD3 group overtime ($p = 0.041$). Like MPO, cfDNA levels were more elevated at the second lung implantation and 3hrs later, and additionally at 72hrs post-surgery. For all three NETosis biomarkers, levels in donors were not significantly different between the PGD3 and non-PGD3 groups. Importantly, NETosis elevations in the PGD3 group were not due to an increase in circulating neutrophils ([Figure 4](#)). Neutrophils and lymphocytes ([Figure 4](#)) and neutrophil/lymphocyte ratio (data not shown) were similar in both groups over time. Interestingly, we observed a relative platelet deficiency in the PGD3 group as compared with the non-PGD3 group ($p = 0.024$), and the latter was not due to differential platelet transfusion between groups ([Figure 4](#)).

NETosis-related inflammation is associated with PGD3

Three additional inflammatory biomarkers also known to induce NETosis (35-37) were measured in donors and before, during and after lung transplantation in recipients ([Figure 3](#)). Recipient's intra- and postoperative values of IL-8 ($p < 0.001$) and IL-6 ($p = 0.002$) were both highly associated with PGD3 development in recipients. The highest elevations of IL-8 and IL-6 were observed at 3hrs following second lung perfusion, as observed with NETosis kinetics. For CRP, values in both groups were also elevated in the postoperative period, peaking at 24hrs. No difference was found over time between the two groups ($p = 0.614$). Nonetheless, CRP levels dropped significantly after 48hrs post-surgery in the non-PGD3 group ($p < 0.0001$), while values remained elevated in the PGD3 group. As for NETosis biomarkers, there was no significant association between the development of PGD3 in the recipient and values of IL-8, IL-6 and CRP in donors. Interestingly, independent of PGD3 development, values of CRP in donors were high while values of IL-8 and IL-6 were minimal.

Based on these findings, we compared MPO-DNA levels with the four biomarkers significantly associated with PGD3 ([Figure 5](#)). We established 2 x 2 combinations to assess the PGD3 predictive potential of these biomarkers when measured simultaneously at 3hrs. When values are over the 66th percentile for each biomarker (red zones), the risk of developing PGD3 varies from 71 to 80%. More importantly, when values are lower than the 66th percentile for each biomarker (blue zones), the risk of developing PGD3 varies from 0 to 6%. Cutoffs were selected arbitrarily as per clinical relevance.

2.5 Discussion

Our study is the first to establish an association between circulating NETs and the development of PGD3 in human lung transplantation. We observed an increase in intra- and postoperative recipient levels of circulating NETosis biomarkers (MPO-DNA, MPO and cfDNA) and NETs-associated pro-inflammatory biomarkers (IL-8 and IL-6), correlating with PGD3 development.

Neutrophils and NETs are key contributors to many occlusion-related lung complications, and their inter-relationship with platelets is highly pathogenic (38, 39). Upon their release (40), NETs can bind to endothelial cells through von Willebrand factor (vWF) (41, 42) and P-selectin (43, 44), providing a scaffold for the binding of platelets, neutrophils and erythrocytes, leading to fibrin deposition and thrombotic microvascular occlusion (45-47). In our study, as depicted by immunofluorescence staining, the microvascular occlusion, mainly derived from neutrophils undergoing NETosis and platelet-bound neutrophils adhered onto lung endothelium, was higher in lung grafts that subsequently developed PGD3. This finding was observed prior to lung reperfusion in recipients, suggesting that actual techniques to clear blood-borne elements in blood vessels from donor's lungs might be insufficient.

The local load of intravascular NETs can further be exacerbated upon reperfusion. In this study, perioperative elevations of IL-8 and IL-6, two potent inducers of NETosis and lung neutrophilic chemotaxis, were associated with PGD3 (35-37). These elevations could further aggravate local NETs formation after neutrophil chemotaxis in lungs. Two studies (21, 23) previously correlated perioperative IL-8 and IL-6 levels with PGD3, and our study supports these findings, highlighting the early predictive potential of these biomarkers. Interestingly, we found that intraoperative venous levels of NETs were associated with PGD3. More precisely, biomarkers of NETosis measured directly after second lung perfusion and at 3hrs were closely associated with PGD3. Therefore, this might suggest that circulating NETs in recipient venous

blood enter pulmonary vasculature and add to the local load of intravascular NETs, perpetuating microvessel occlusion and ischemia-reperfusion lesions. At 24hrs, biomarkers of NETosis decreased in the PGD3 group and there was no difference between the two groups. This finding could be related with the transient decrease in circulating neutrophils illustrated in [Figure 4](#). Alternatively, this decrease could be explained by the turnover interval required to synthesise and release new NETs after the acute peri-operative burst observed.

Systemic NETosis leads to circulating platelet depletion through NETs-mediated disseminated clot formation, a major contributor to microvascular hypoperfusion and multiorgan dysfunction (48). In our study, we observed a significant decrease of circulating platelets concomitantly with circulating NETs elevation in recipients developing PGD3. These recipients also presented a slight transient elevation in multiorgan damage biomarkers, although this might be a consequence of surgery-related hemodynamic factors. Taken together, these findings support the plausibility of systemic clot formation following human lung transplantation. This prothrombotic nature of NETs was also delineated in liver transplantation where cfDNA measured upon liver reperfusion correlated with coagulation activation (49). Systemic clot formation associated with thrombocytopenia are part of disseminated intravascular coagulation, a feared complication with high mortality rates (48). Further work comprising coagulation studies is needed to confirm these exploratory findings.

Previous studies reported clinical benefits of grading PGD at ICU arrival (0hr), 6hrs and 12hrs (28-30, 50). We elected to classify recipients developing PGD3 at 12hrs. Moreover, NETosis and inflammatory biomarkers measured as early as 3hrs post-surgery correlated with PGD3 at 12hrs. Therefore, the earliest measurement of NETosis and inflammatory biomarkers could be useful to rapidly identify recipients at high versus low risks of PGD3, facilitating the decision to potentially treat the recipients with therapeutic strategies targeting NETosis and inflammation.

Sayah and al. found that intra-bronchial DNase I therapy can reduce lung injury following murine lung transplantation (10). In a sepsis animal model, DNase I therapy given intraperitoneally (IP) reduced organ damage and improved survival (51, 52). DNase I (IP or intravenously, IV) was also beneficial in IRI involving kidneys, heart and liver (53-55). In humans, David and al. reported that a single IV dose of DNase I was safe and well tolerated, with no side effects within seven days after administration (56). Thus, IV DNase I administration could prevent NETs-mediated complications following human lung transplantation.

Study limitations :

The plurality of blood collection time points made it technically difficult to achieve the complete acquisition of all blood samples. Random-effect longitudinal analyses were used to account for missing values and this accommodation method increased the statistical strength, but we were unable to assess the predictive potential of our biomarkers statistically due to low sample size. The low number of patients also explains data heterogeneity, especially in the PGD3 group, and refrained us from adjusting our results with confounding variables. In this study, all ECMO were considered having PGD3 since ECMO was used to support patient ventilation/oxygenation and not for hemodynamic support. As shown with cardiopulmonary bypass, the use of ECMO likely activates neutrophils to produce NETs (57). Therefore, it is difficult to dissociate the implication of ECMO from NETosis in PGD3 development. On the other hand, well-described characteristics associated with PGD3 such as donor-recipient allograft size mismatch, recipient sex, recipient body mass index, prolonged mechanical ventilation and others were not associated with PGD3, and this might be a consequence for the lack of power (4).

In conclusion, this study demonstrated that circulating NETosis in recipients is associated with PGD3 following human lung transplantation. The perioperative dosage of IL-8 and IL-6 and

NETosis biomarkers (MPO-DNA, MPO and cfDNA) could serve as a diagnostic tool for identifying the risk of developing PGD3. Commercial standardization of our MPO-DNA ELISA test could be combined with the measurement of the other biomarkers as a diagnostic panel kit testing to facilitate point-of-care use in hospital settings. Considering the high burden and mortality rate of PGD3, therapeutics targeting NETosis in recipients with high risk of developing PGD3, such as intravascular DNase I administration, could be a promising low-cost therapy to help prevent postoperative complications and death following human lung transplantation.

2.6 Declarations

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Authors' contributions

NN, PF, BN and LMS performed the lung transplant procedures. NN, PF, BN, AM, CL, EB, LMS, PEN, SB and MGS created and adapted the protocol. SBé, CL, EB and DA recruited all the lung recipients and were responsible for obtaining consents. SB, CL and SBé collected all clinical data from donors and recipients (Tables I and II, Figure 4). CL, SB, SBé, DA and EB collected lung tissues and/or dissected/processed samples. MECL and SB performed tissue processing, histological and immunohistological procedures, image capture and analyses (Figure 1 and 2). LV is the confocal imaging specialist who adapted the staining protocol and acquired post-processed, helped analyzing confocal fluorescent images (Figure 2). CL, AD and SB collected blood samples. PEN, BD and SB performed ELISA measurements of biomarkers (Figures 3 and 4). All tables and figures were performed by SB and thoroughly revised by LMS, NN, PEN and MGS. Result analyses were performed by NN, PF, LMS, CL, EB, PEN, SB and MGS. LMS provided statistical expertise with data collection and performed statistical analyses with SB. EB is the director of the CRCHUM's Respiratory Cell and Tissue Biobank of the Respiratory Health Research Network of Québec. PF is the chief director of the lung transplantation program and was involved in recruitment and data analyses. PEN supervised SB, AD, EC and BD. NN is the co-PI of this study and co-supervisor of SB and AD. MGS is the PI of this study and the principal supervisor of SB, EC, BD, AD, MECL and PEN. He initiated this collaboration and contributed to data analyses and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We are thankful to the donors, their families and the recipients. Without their help and dedication, we would not be in position to share these seminal observations. We are thankful to Transplant Quebec and to the CRCHUM's Respiratory Cell and Tissue Biobank of Quebec Respiratory Health Research Network (QRHN) for their respective contribution for having access to donors and transplant patients. AD was recipient of an undergraduate PREMIER - Université de Montréal studentship. SB was recipient of an undergraduate PREMIER - Université de Montréal studentship, a M.D.-M.Sc. studentship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and is currently recipient of a M.D.-M.Sc. studentship from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). This research project was financially supported by the Thoracic Surgery Research Foundation of Montreal (recipient PF) and by the Montreal Heart Institute Foundation (recipient MGS).

2.7 Tables & Figures

Table 1. Preoperative characteristics of donors and recipients

	All patients (n = 36)	non-PGD3 (n = 27)	PGD3 (n = 9)	P value
Donor characteristics				
Male	18 (50%)	14 (52%)	4 (44%)	1.000
Age (years)	45 ± 17	43 ± 16	50 ± 15	0.281
Body mass index (kg/m ²)	26 (23-29)	25 (23-30)	25 (25-27)	0.889
Cause of death				0.766
- Trauma	15 (43%)	12 (44%)	3 (33%)	
- Stroke	12 (33%)	9 (33%)	3 (33%)	
- Suicide	9 (25%)	6 (22%)	3 (33%)	
White blood cells [4-11] (10 ⁹ /L)	13 (11-18)	13 (11-16)	18 (12-24)	0.107
Type of organ donation				0.392
- Donation after brain death	26 (72%)	18 (67%)	8 (89%)	
- Donation after circulatory death	10 (28%)	9 (33%)	1 (11%)	
Duration of cold ischemia (minutes)	242 (137-278)	237 (137-278)	263 (177-287)	0.406
pTLC (L)	6.5 (5.0-7.4)	6.4 (5.0-7.3)	6.0 (4.9-7.1)	0.765
pTLC donor-to-recipient ratio	1.02 (0.85-1.09)	1.03 (0.85-1.09)	0.96 (0.84-1.06)	0.618
PaO ₂ /FiO ₂ ratio prior to organ procurement (mmHg)	441 ± 73	448 ± 60	418 ± 105	0.436
Other organ procurement				
- Heart	11 (30%)	9 (33%)	2 (18%)	0.490
- Liver	23 (64%)	17 (63%)	6 (67%)	1.000
- Kidneys	30 (83%)	24 (89%)	6 (67%)	0.095
Troponin I level [<14] (ng/mL)	53 (0-249)	10 (0-87)	280 (39-726)	0.019
Alanine aminotransferase [20-55] (U/L)	45 (20-94)	30 (19-94)	54 (26-91)	0.382
Serum creatinine [55-110] (mmol/L)	65 (44-86)	59 (44-78)	123 (46 -386)	0.107
Recipient characteristics				
Male	28 (78%)	22 (82%)	6 (67%)	0.352
Age (years)	62 (53-64)	62 (46-64)	62 (58-66)	0.368
Body mass index (kg/m ²)	24 ± 4	24 ± 4	25 ± 5	0.382
pTLC (L)	6.5 (5.6-6.9)	6.7 (6.1-7.0)	6.3 (5.3-6.4)	0.136
Diabetes	14 (39%)	9 (33%)	5 (56%)	0.194
Smoking				0.431
- Never	14 (39%)	12 (44%)	2 (22%)	
- Former	21 (58%)	15 (56%)	6 (67%)	
Lung disease				0.160
- Pulmonary hypertension	2 (6%)	0 (0%)	2 (22%)	
- Idiopathic lung fibrosis	12 (33%)	10 (37%)	2 (22%)	
- Cystic fibrosis	5 (14%)	4 (15%)	1 (11%)	
- Chronic obstructive pulmonary disease	12 (33%)	9 (33%)	3 (33%)	
- Interstitial pulmonary disease	5 (14%)	4 (15%)	1 (11%)	
White blood cells (10 ⁹ /L)	10 (7-15)	10 (7-11)	12 (7-15)	0.355

Data are presented as frequencies (%), means ± standard deviation or medians (IQR) where appropriate. pTLC, predicted total lung capacity. Reference laboratory values are shown in [square brackets] and are derived from the Montreal Heart Institute.

Table 2. Intra- and postoperative characteristics of recipients

	All patients (n = 36)	non-PGD3 (n = 27)	PGD3 (n = 9)	<i>P</i> value
<i>Intraoperative characteristics</i>				
Duration of surgery (minutes)	250 ± 51	240 ± 43	280 ± 63	0.044
Use of ELVP	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1.000
Use of CPB	5 (14%)	3 (11%)	2 (22%)	0.404
Use of ECMO	3 (8%)	0 (0%)	3 (33%)	0.002
Red blood cells transfusion	28 (78%)	21 (78%)	6 (67%)	0.505
Platelets transfusion	8 (22%)	4 (15%)	4 (44%)	0.064
Volume of blood loss (liters)	1.2 (1.0-2.0)	1.2 (1.0-1.5)	1.5 (1.5-3.0)	0.101
<i>Postoperative characteristics</i>				
Troponin I levels [<14] (ng/mL) ^a				
- Day 0	455 [397-522]	398 [346-457]	659 [483-898]	0.140
- Day 1	534 [459-621]	526 [435-634]	586 [486-707]	0.684
- Day 2	396 [340-461]	389 [322-470]	423 [347-516]	0.758
- Day 3	315 [273-364]	312 [261-373]	337 [277-409]	0.768
Alanine aminotransferase [20-55] (U/L) ^a				
- Day 0	20.2 [17.0-24.0]	14.5 [13.0-16.1]	54.2 [33.7-87.3]	0.008
- Day 1	30.9 [25.6-37.2]	22.3 [19.6-25.4]	77.1 [46.8-126.9]	0.017
- Day 2	31.5 [26.1-37.9]	22.3 [19.6-25.3]	81.7 [50.6-131.9]	0.010
- Day 3	35.6 [29.8-42.7]	24.6 [21.9-27.7]	96.8 [52.1-150.7]	0.003
Serum creatinine [55-110] (mmol/L) ^a				
- Day 0	70.0 [66.8-73.4]	66.0 [63.1-68.7]	83.9 [74.8-94.2]	0.050
- Day 1	85.6 [80.4-91.2]	80.6 [75.0-87.0]	101.7 [92.0-112.6]	0.068
- Day 2	80.9 [74.6-87.7]	77.5 [69.9-85.5]	92.7 [83.9-102.3]	0.204
- Day 3	73.6 [68.1-79.5]	70.1 [63.6-76.6]	86.0 [76.4-96.9]	0.167
Lactic acid [0.5-1.7] (mmol/L) ^a				
- Day 0	2.53 [2.28-2.82]	2.11 [1.92-2.32]	4.39 [3.48-5.52]	0.004
- Day 1	1.91 [1.73-2.11]	1.57 [1.48-1.67]	3.41 [2.60-4.47]	0.006
- Day 2	1.48 [1.36-1.60]	1.42 [1.33-1.52]	1.70 [1.33-2.17]	0.482
- Day 3	1.39 [1.26-1.53]	1.22 [1.10-1.35]	2.02 [1.65-2.48]	0.030
Postoperative hemorrhage	4 (11%)	1 (4%)	3 (33%)	0.014
Use of ECMO	4 (11%)	0 (0%)	4 (44%)	0.001
Mechanical ventilation > 72hrs	8 (22%)	4 (11%)	4 (44%)	0.064
Death in first 120 days following surgery	5 (13%)	1 (4%)	4 (44%)	0.002

Data are presented as frequencies (%), means ± standard deviation, medians (IQR) or as ^aestimates [95%CI] from mixed-effect analysis where appropriate. For estimates, when *P* values representing the global inter-group comparisons over time were significant, specific time-point comparisons were represented. EVLP, *ex vivo* lung perfusion; CPB, cardiopulmonary bypass; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation. Reference laboratory values are shown in [square brackets] and are derived from the Montreal Heart Institute.

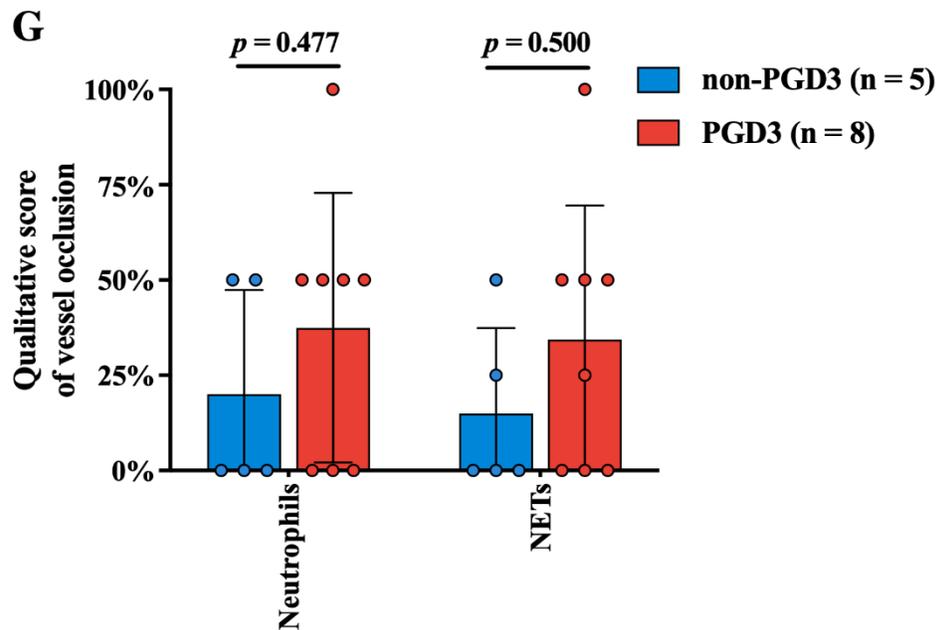
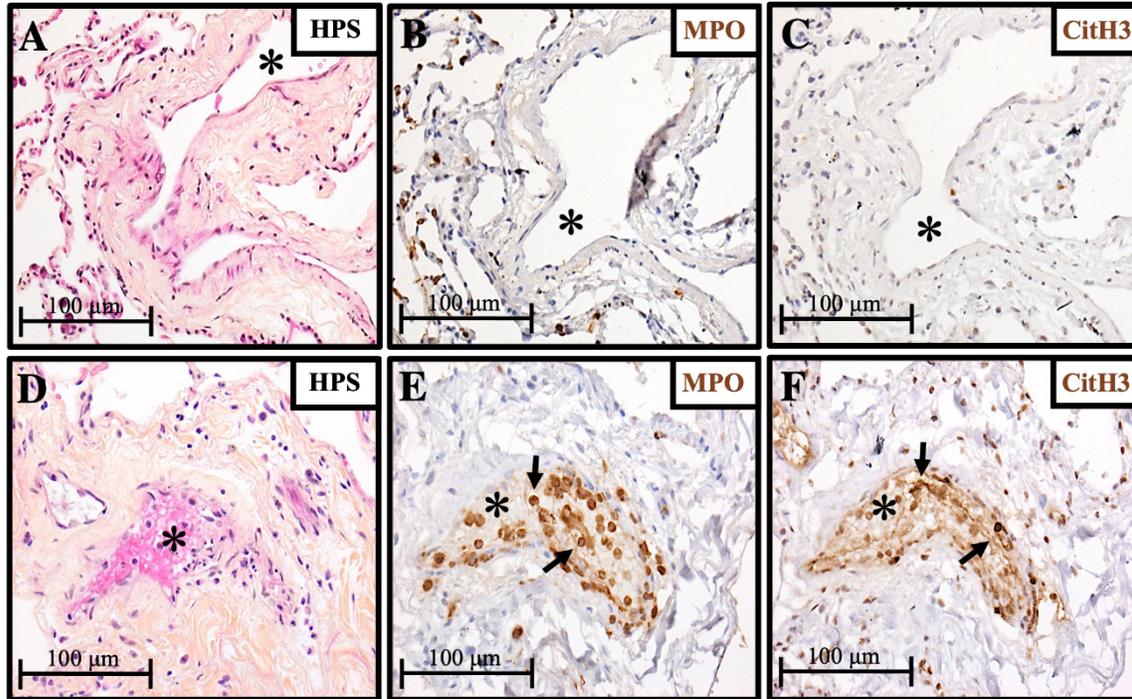


Figure 1. Neutrophil and NETs-mediated vessel occlusion in grafts prior to transplant. Morphology was assessed by HPS staining. Vascular occlusion occurs to varying degrees, some arterioles or venules (*) are not occluded (A) while others are completely occluded (D). Vascular occlusion mainly originates from neutrophils (E; MPO; black arrows) and activated neutrophils undergoing NETosis (F; CitH3; black arrows). Qualitative assessment (G) of vessel occlusion in grafts which led to PGD3 (n = 8) as compared with non-PGD3 (n = 5). Each graft obtained was scored qualitatively for vascular occlusion (0, 25, 50, 75 or 100%). A 100% score means all or most vessels visualized (venules and arterioles) were occluded with neutrophils or NETs, whereas 25/50/75% scores mean about 25/50/75% of the blood vessels were obstructed with neutrophils or NETs. Means and standard deviations are represented with bars and individual scores for each graft are plotted with colored dots (Student t test). Original magnification, x200.

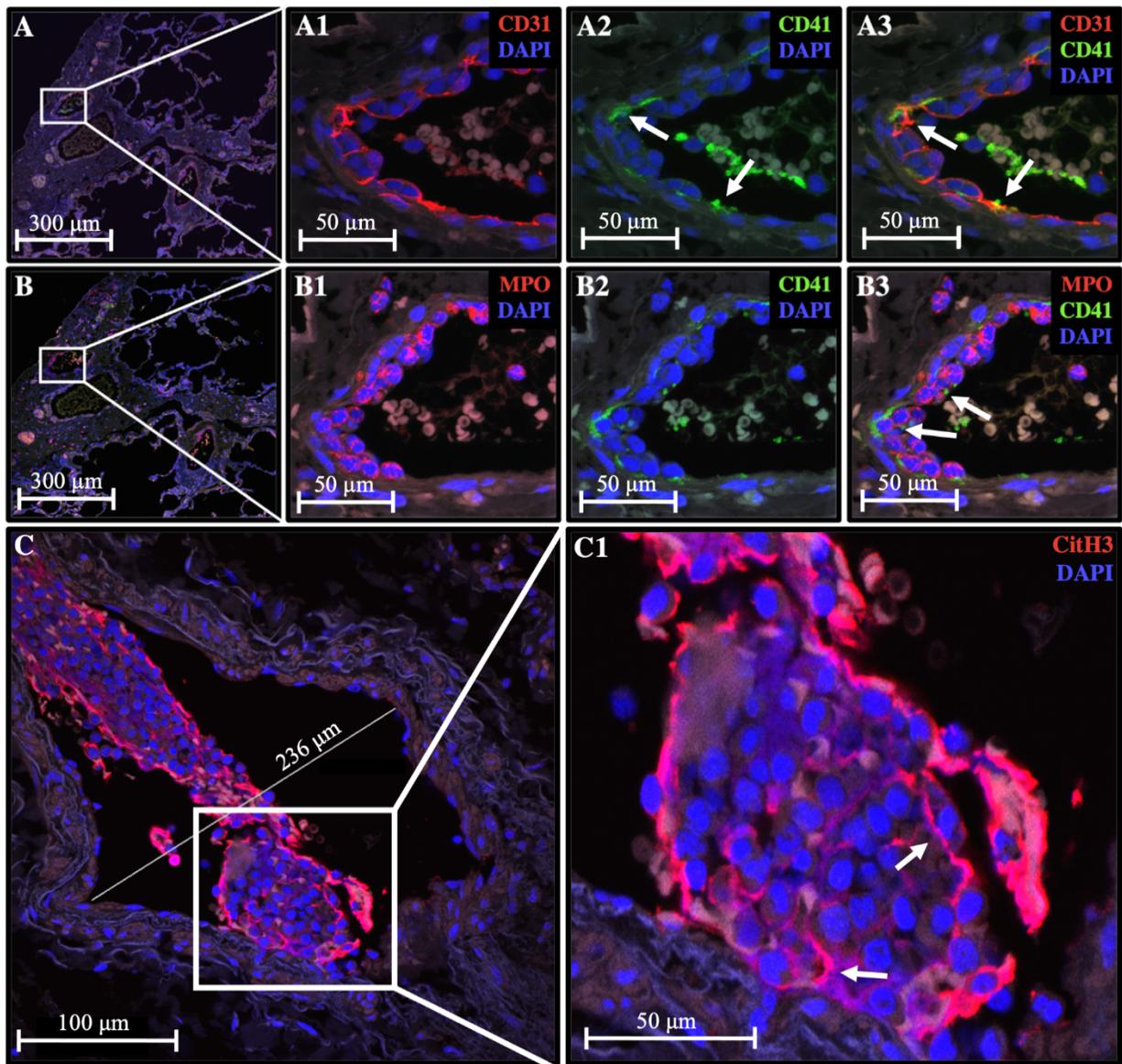


Figure 2. Neutrophil-platelet and NETs endothelium interactions in a lung graft prior to transplant in a recipient who subsequently developed PGD3. In Figure A, platelets adhered onto and underneath the endothelium (white arrows, A2 and A3). In Figure B, numerous neutrophil-neutrophil (B1) and neutrophil-platelet (white arrows, B3) interactions were observed. In Figure C, the presence of NETs (CitH3; white arrows) in a neutrophilic thrombus was noted. CD31, endothelium; CD41, platelets; CitH3, NETs; MPO, neutrophils; DAPI, dsDNA. Original magnification, x240.

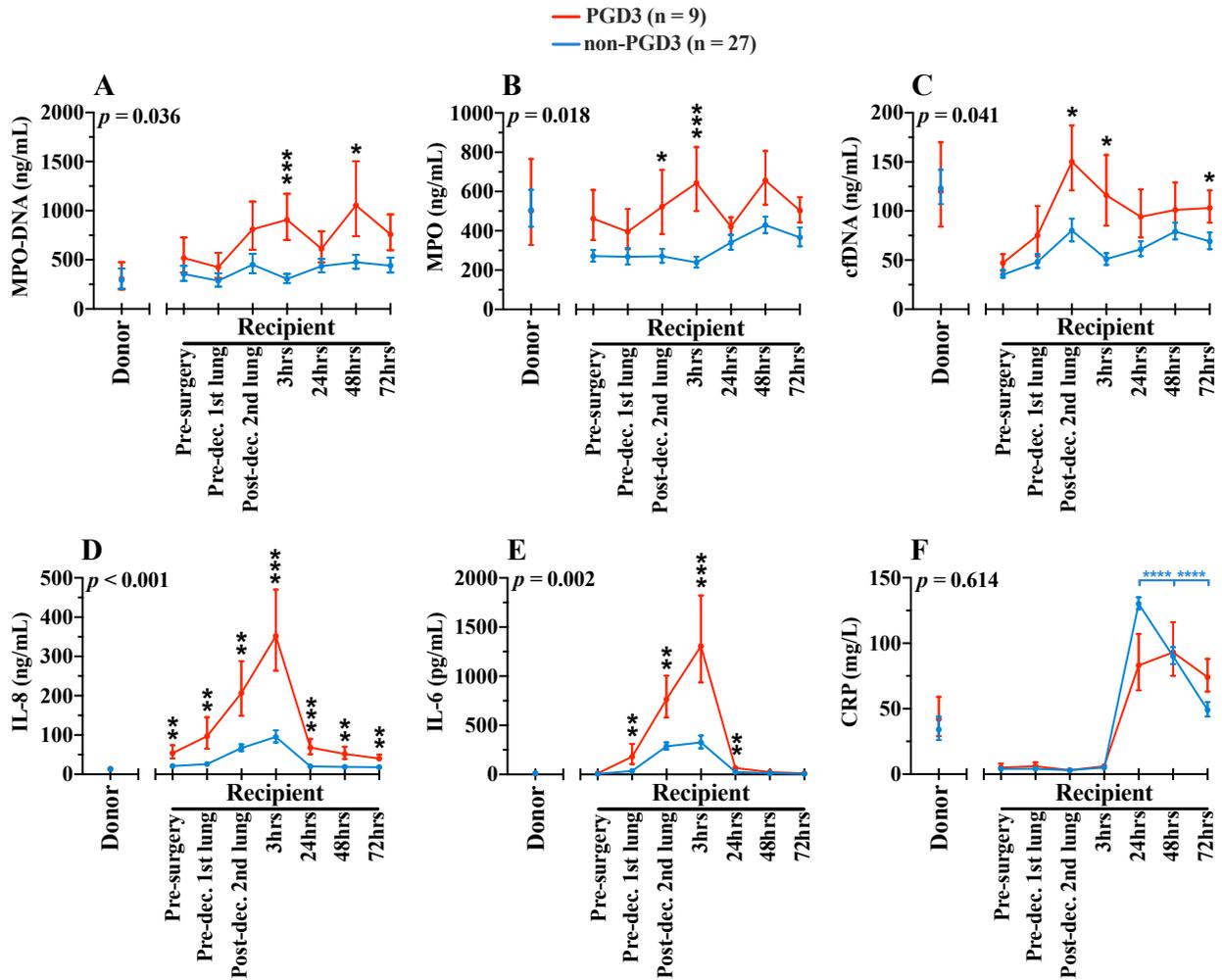


Figure 3. Pre-, intra- and postoperative serum levels of NETosis (A, B, C) and inflammatory (D, E, F) biomarkers in donors (n = 25) and recipients (n = 36). Blue lines show biomarkers in non-PGD3 recipients (n = 27) and red lines in PGD3 recipients (n = 9) (Mixed-method analyses). The 95% confidence intervals are represented with bars. P values represent the global inter-group comparisons over time. Significant time-point differences are illustrated with asterisks (*). *p<0.050, **p<0.001 and ***p<0.001.

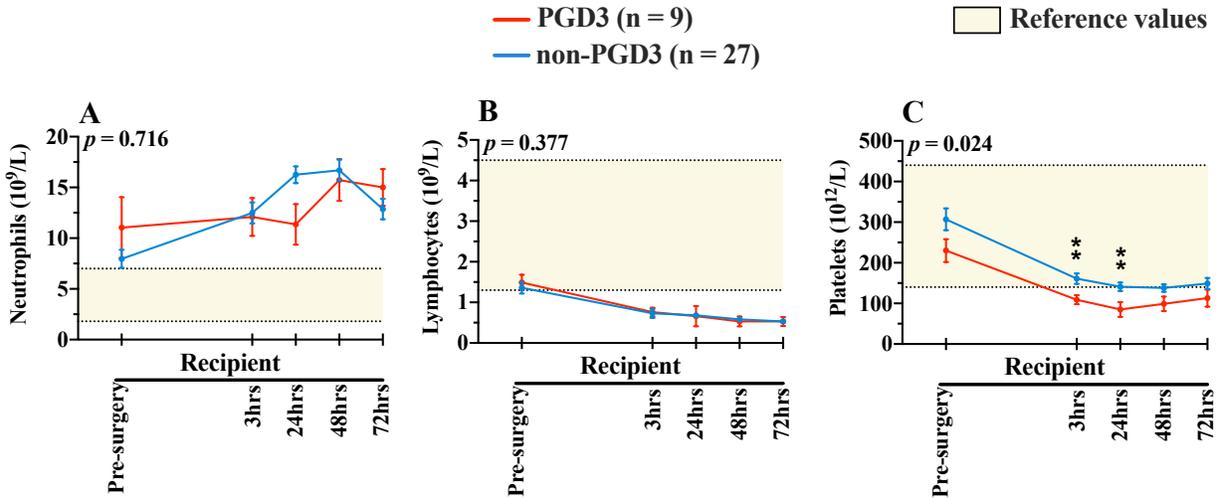


Figure 4. Pre- and postoperative circulating neutrophils (A), lymphocytes (B) and platelets (C) in recipients (n = 36). Blue lines show biomarkers in non-PGD3 recipients (n = 27) and red lines in PGD3 recipients (n = 9) (Mixed-method analyses). Reference laboratory values are derived from the Montreal Heart Institute. The 95% confidence intervals are represented with bars. P values represent the global inter-group comparisons over time. Significant time-point differences are illustrated with asterisks (*). **p<0.010.

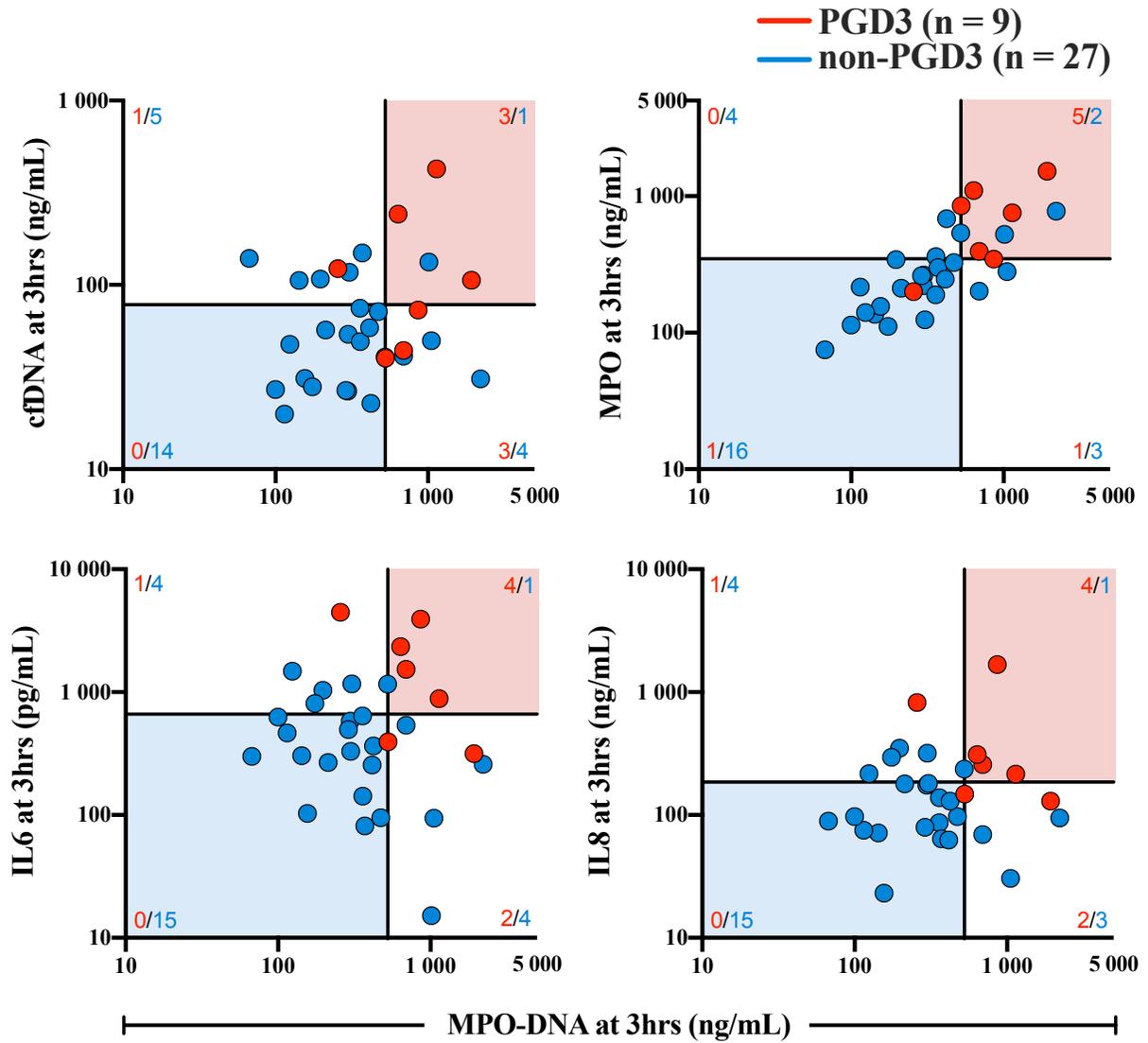


Figure 5. Prediction of PGD3 onset based on early postoperative (3hrs) values of NETosis biomarkers and inflammatory cytokines inducing NETosis. Cut-off lines represent the 66th percentile value for each biomarker and limit four quadrants. The number of recipients belonging in each quadrant is displayed with colored numbers. For every binary combination of biomarkers, recipients located in the red zones have the highest risk of developing PGD3 whereas recipients in the blue zones have the lowest risk of developing PGD3 at 12hrs.

2.8 References

1. Yeung JC, Keshavjee S: Overview of clinical lung transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a015628.
2. Snell GI, Yusen RD, Weill D, *et al.*: Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction, part I: Definition and grading-A 2016 Consensus Group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2017;36:1097-103.
3. Meyer KC: Recent advances in lung transplantation. *F1000Res* 2018;7.
4. Porteous MK, Diamond JM, Christie JD: Primary graft dysfunction: lessons learned about the first 72 h after lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2015;20:506-14.
5. Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, *et al.*: Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:527-34.
6. Kreisel D, Krupnick AS, Puri V, *et al.*: Short- and long-term outcomes of 1000 adult lung transplant recipients at a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141:215-22.
7. Cantu E, Diamond JM, Suzuki Y, *et al.*: Quantitative Evidence for Revising the Definition of Primary Graft Dysfunction after Lung Transplant. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:235-43.
8. Christie JD, Bellamy S, Ware LB, *et al.*: Construct validity of the definition of primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:1231-9.
9. Talaie T, DiChiacchio L, Prasad NK, *et al.*: Ischemia-reperfusion Injury in the Transplanted Lung: A Literature Review. *Transplant Direct* 2021;7:e652.
10. Sayah DM, Mallavia B, Liu F, *et al.*: Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:455-63.
11. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N: Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation* 2009;120:2012-24.

12. Segerer S, Henger A, Schmid H, *et al.*: Expression of the chemokine receptor CXCR1 in human glomerular diseases. *Kidney Int* 2006;69:1765-73.
13. Packard RR, Lichtman AH, Libby P: Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2009;31:5-22.
14. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C: Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2017;17:248-61.
15. Bharat A, Kreisel D: Immunopathogenesis of Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg* 2018;105:671-4.
16. Capucetti A, Albano F, Bonecchi R: Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Front Immunol* 2020;11:1259.
17. 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 Heart Circ Physiol* 2010;299:H1283-99.
18. Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T, *et al.*: Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:937-44.
19. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, *et al.*: Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1460-7.
20. Bittner HB, Kendall SW, Chen EP, Craig D, Van Trigt P: The effects of brain death on cardiopulmonary hemodynamics and pulmonary blood flow characteristics. *Chest* 1995;108:1358-63.
21. Mathur A, Baz M, Staples ED, *et al.*: Cytokine profile after lung transplantation: correlation with allograft injury. *Ann Thorac Surg* 2006;81:1844-9; discussion 9-50.
22. Moreno I, Vicente R, Ramos F, Vicente JL, Barbera M: Determination of interleukin-6 in lung transplantation: association with primary graft dysfunction. *Transplant Proc* 2007;39:2425-6.

23. Allen JG, Lee MT, Weiss ES, Arnaoutakis GJ, Shah AS, Detrick B: Preoperative recipient cytokine levels are associated with early lung allograft dysfunction. *Ann Thorac Surg* 2012;93:1843-9.
24. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, *et al.*: Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:259-65.
25. De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, *et al.*: Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:211-5.
26. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.*: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.
27. Caldarone L, Mariscal A, Sage A, *et al.*: Neutrophil extracellular traps in ex vivo lung perfusion perfusate predict the clinical outcome of lung transplant recipients. *Eur Respir J* 2019;53.
28. Oto T, Levvey BJ, Snell GI: Potential refinements of the International Society for Heart and Lung Transplantation primary graft dysfunction grading system. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:431-6.
29. Prekker ME, Nath DS, Walker AR, *et al.*: Validation of the proposed International Society for Heart and Lung Transplantation grading system for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:371-8.
30. Sommer W, Tudorache I, Kuhn C, *et al.*: C1-esterase-inhibitor for primary graft dysfunction in lung transplantation. *Transplantation* 2014;97:1185-91.
31. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, *et al.*: Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 2020;5(11):e138999.
32. Vigneswaran WT, Garrity ER, Odell JA: Lung transplantation : principles and practice. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2016.

33. Dupuis J, Sirois MG, Rhéaume E, *et al.*: Colchicine reduces lung injury in experimental acute respiratory distress syndrome. *PLoS One* 2020;15:e0242318.
34. Mason DP, Batizy LH, Wu J, *et al.*: Matching donor to recipient in lung transplantation: How much does size matter? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:1234-40 e1.
35. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, Neagoe PE, White M, Sirois MG: Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiopoietin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. *J Immunol* 2018;200:3801-13.
36. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe PE, *et al.*: CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *Immunohorizons* 2019;3:378-88.
37. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamoorthy K: High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett* 2013;587:2241-6.
38. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, *et al.*: Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012;122:2661-71.
39. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, *et al.*: Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* 2020;58:102925.
40. Kaplan MJ, Radic M: Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012;189:2689-95.
41. Grassle S, Huck V, Pappelbaum KI, *et al.*: von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:1382-9.
42. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BG, *et al.*: Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun* 2015;6:6673.

43. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, Neagoe PE, White M, Sirois MG: Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiopoietin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. *J Immunol* 2018, 200(11):3801-3813.
44. Sorensen OE, Borregaard N: Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest* 2016;126:1612-20.
45. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, *et al.*: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15880-5.
46. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, *et al.*: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010;16:887-96.
47. Wong SL, Wagner DD: Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. *FASEB J* 2018, 32(12):fj201800691R.
48. McDonald B, Davis RP, Kim SJ, *et al.*: Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* 2017;129:1357-67.
49. von Meijenfeldt FA, Burlage LC, Bos S, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T: Elevated Plasma Levels of Cell-Free DNA During Liver Transplantation Are Associated With Activation of Coagulation. *Liver Transpl* 2018;24:1716-25.
50. Aigner C, Slama A, Barta M, *et al.*: Treatment of primary graft dysfunction after lung transplantation with orally inhaled AP301: A prospective, randomized pilot study. *J Heart Lung Transplant* 2017(17):S1053-2498.
51. Mai SH, Khan M, Dwivedi DJ, *et al.*: Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Shock* 2015;44:166-72.
52. Sohrabipour S, Muniz VS, Sharma N, Dwivedi DJ, Liaw PC: Mechanistic Studies of Dnase I Activity: Impact of Heparin Variants and PAD4. *Shock* 2021, 56(6):975-987.

53. Wang S, Xie T, Sun S, *et al.*: DNase-1 Treatment Exerts Protective Effects in a Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Sci Rep* 2018;8(1):17788.
54. Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, *et al.*: Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology* 2015;62:600-14.
55. Peer V, Abu Hamad R, Berman S, Efrati S: Renoprotective Effects of DNase-I Treatment in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. *Am J Nephrol* 2016;43:195-205.
56. Davis JC, Jr., Manzi S, Yarboro C, *et al.*: Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus* 1999;8:68-76.
57. Beaubien-Souligny W, Neagoe PE, Gagnon D, Denault AY, Sirois MG: Increased Circulating Levels of Neutrophil Extracellular Traps During Cardiopulmonary Bypass. *CJC Open* 2020;2:39-48.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

3.1 Résumé de nos principales observations

Afin d'explorer le rôle des NET en transplantation pulmonaire chez l'humain, nous nous sommes intéressés à la cinétique des NET et à la présence de NET dans les greffons pulmonaires. Nous avons tenté de répondre à la question suivante : les NET sont-ils impliqués dans la DPG ? Pour y arriver, les niveaux sériques de NET et de biomarqueurs pro-inflammatoires ont été mesurés chez 25 donneurs et chez 36 receveurs à différents temps pré, intra et postopératoires. Les niveaux de NET et de biomarqueurs ont ensuite été corrélés avec la survenue de DPG3 à 12h postopératoire, complication qui est survenue chez 9 des 36 receveurs inclus dans l'étude. Lorsque des biopsies de greffons étaient disponibles pendant la greffe, nous avons évalué la présence de neutrophiles activés et de NET dans ces tissus par histologie, immunohistochimie et immunofluorescence. Aux termes de mon projet de maîtrise, nous avons pu montrer que les niveaux sériques de NET (MPO-ADN, MPO, cfDNA) et de biomarqueurs pro-inflammatoires (IL-6, CXCL8/IL-8) mesurés pendant et après la greffe chez le receveur corrélaient avec le développement de DPG3 à 12h postopératoire. De plus, les greffons collectés présentaient différents degrés d'occlusion vasculaire avec des neutrophiles activés en processus de NETose.

3.2 L'occlusion vasculaire des greffons

L'implication des neutrophiles et des NET dans l'immuno-thrombose est reconnue dans plusieurs pathologies et complications : sepsie, anémie falciforme, cancer, COVID-19, et autres [254, 268-271, 276-284, 286, 339]. En transplantation pulmonaire, l'endothélium est particulièrement prompt à la thrombose conséquence de l'I/R [164, 165]. Une fois en circulation, les NET peuvent adhérer à l'endothélium endommagé par le vWF [386, 387] et les récepteurs P-sélectines [249, 388]. Leur structure en filet permet l'agrégation des cellules circulantes, dont les plaquettes [254, 264, 389], et cette relation NET-plaquettes fortement thrombogène perpétue l'occlusion vasculaire locale [260, 261]. Dans notre étude, nous avons objectivé la présence d'occlusion vasculaire dans les biopsies de greffons récoltés avant le déclantage des greffons transplantés. Les études par immunohistochimie ont permis de déceler la présence importante de neutrophiles et de neutrophiles activés dans la lumière des vaisseaux occlus. Les études par immunofluorescence ont par la suite permis de visualiser la présence de NET dans les zones d'occlusion vasculaire, en plus de montrer les interactions entre plaquettes et neutrophiles. Quoique nous n'avons pas étudié les marqueurs de dommages endothéliaux, il est adéquat de

soutenir que la forte concentration de NET dans les microvaisseaux pulmonaires perturbe l'étanchéité endothéliale. D'autres équipes ont d'ailleurs élucidé les mécanismes expliquant la cytotoxicité des NET sur l'endothélium [323, 339, 390-392]. Entre autres, le CitH3 cause une dysfonction de la barrière endothéliale par une ouverture des jonctions adhérentes et un réarrangement du cytosquelette endothélial [392].

La présence de NET dans la microcirculation pulmonaire du greffon avant la reperfusion laisse suggérer un lavage vasculaire sous-optimal. Le protocole chirurgical requiert un lavage vasculaire du greffon lorsque ce dernier est prélevé chez le donneur. Habituellement, quatre litres d'une solution dextrose faible en potassium (Perfadex®, XVIVO Perfusion) sont perfusés dans l'artère pulmonaire (perfusion antérograde) et un litre est perfusé par les veines pulmonaires (perfusion rétrograde) [74]. Au besoin, un lavage supplémentaire peut être effectué par l'équipe chirurgicale s'il persiste des doutes d'embolies pulmonaires. Dans notre étude, nous avons objectivé la présence d'occlusion vasculaire dans les biopsies de greffons récoltés pendant la greffe, et ce malgré que tous les greffons aient précédemment bénéficié du lavage vasculaire tel que décrit. Les spécimens étudiés étaient pour la plupart des biopsies obtenues en périphérie du poumon, ce qui pourrait expliquer en partie l'inefficacité du lavage vasculaire dans ces zones périphériques. En fonction de nos trouvailles, nous statuons que le lavage vasculaire s'avère imparfait pour décongestionner la microcirculation pulmonaire. Plusieurs éléments cellulaires néfastes persistent dans la lumière vasculaire, parmi ceux-ci se trouvent les NET. Des modifications de la méthode perfusionnelle et/ou l'ajout d'agents thrombolytiques (ex. : alteplase, DNase) pourraient être envisagés pour améliorer la qualité du lavage vasculaire [393]. Ces ajustements permettraient d'éviter les nombreux effets néfastes associés à l'accumulation locale de NET décrits précédemment.

3.3 Les NET circulants et la DPG

La présence de NET dans la circulation sanguine peut mener à une occlusion des microvaisseaux pulmonaires et/ou systémiques, contribuer localement aux dommages tissulaires, et agir comme filet pour l'agrégation et l'extravasation d'autres cellules inflammatoires [254, 260, 272, 339, 354, 394-399]. La libération de NET dans le sang peut être la conséquence de nombreux stimuli inflammatoires [249]. Des travaux récents de notre laboratoire ont montré que les niveaux de CRP corrélaient avec la quantité de NET circulants chez des patients atteints d'insuffisance

cardiaque et que le CRP induit directement la NETose de façon concentration-dépendante *in vitro* [237]. De même, l'IL-6 et le CXCL8/IL-8 sont deux cytokines connues pour induire la NETose directement [239, 400] ou indirectement grâce à la synthèse de CRP par les hépatocytes [401, 402]. Dans notre étude, les taux de ces biomarqueurs pro-inflammatoires (CRP, IL-6, CXCL8/IL-8) et les taux de NET (MPO, MPO-ADN, cfDNA) ont été mesurés dans le sérum des donneurs et des receveurs avant, pendant et après la greffe sur 72h. Ces biomarqueurs ont aussi été corrélés avec le développement de la DPG à 12h postopératoire.

Des prélèvements sanguins ont été obtenus chez 25 des 36 donneurs. Parmi les six biomarqueurs étudiés, aucun n'a corrélé avec le développement de la DPG3 chez le receveur à 12h postopératoire. De façon intéressante, les donneurs inclus dans notre étude comportaient d'importants taux de CRP haute sensibilité (hsCRP) (moyenne = 40 mg/L), ce qui est pareillement rapporté par d'autres auteurs [403, 404]. Pour mettre cette trouvaille en perspective, le CRP est une cytokine témoignant du degré d'inflammation systémique. En clinique, la mesure du CRP s'avère une mesure sensible mais peu spécifique. Il existe deux moyens de mesurer le CRP : une méthode avec haute sensibilité (hsCRP) et une méthode standard. De façon générale, la mesure de hsCRP est réservée aux populations coronariennes puisque, chez ces patients, de minimes différences de hsCRP ont d'importantes répercussions pronostiques [405-407]. Dans le cadre de notre étude, nous avons mesuré le hsCRP puisque les analyses ont eu lieu à l'Institut de cardiologie de Montréal, mais les deux méthodes auraient été acceptables compte tenu des hauts niveaux de CRP associés la DPG. Chez les individus sains, les valeurs de CRP et de hsCRP sont habituellement inférieures à 10 mg/L et 1 mg/L respectivement [405, 408]. Généralement, les valeurs de CRP peuvent grimper entre 10 et 40 mg/L dans des cas d'infections virales ou d'inflammation systémique légère, et au-dessus de 40 mg/L dans lors d'infections bactériennes ou d'inflammation systémique modérée à sévère [408]. Cette trouvaille chez le donneur peut être expliquée par divers facteurs dont une durée de séjour prolongée aux soins intensifs, la cause à l'origine du décès, les comorbidités infectieuses et non infectieuses, et autres[409]. Comme le CRP est un inducteur direct de la NETose [237], ces quantités considérables de CRP pourraient expliquer les taux de NET circulants élevés chez les donneurs ainsi que les NET retrouvés dans la microcirculation pulmonaire objectivés par nos études d'immunofluorescence.

Chez les receveurs, plusieurs biomarqueurs pré, intra et postopératoires corrént avec le développement de DPG3 à 12h postopératoire. En premier lieu, les taux de CXCL8/IL-8 sont plus élevés en préopératoire dans le groupe de patients qui développeront la DPG3. Ce prélèvement préopératoire est effectué avant la mise en place de l'ECMO ou de la CEC, le cas échéant, et sert donc de juste reflet dans l'évaluation de l'état inflammatoire basal du receveur. À notre connaissance, nous sommes le premier groupe à montrer que le CXCL8/IL-8 corréle avec la DPG3 lorsque mesuré aussi précocement chez le receveur [173]. Cet agoniste inflammatoire pourrait servir à amorcer les neutrophiles circulants [164, 410, 411] et, ce faisant, faciliterait la NETose subséquente pendant et après la greffe. En deuxième lieu, tel que décrit précédemment [176], les élévations de CXCL8/IL-8 et d'IL-6 avant le déclampage du 1^{er} poumon sont associées à la DPG3. Cette inflammation systémique pourrait, de même, contribuer à amorcer les neutrophiles circulants [164, 410, 411]. En troisième lieu, dans les minutes et heures qui suivent la greffe et la reperfusion des deux poumons, les taux de MPO-ADN, MPO, cfDNA, CXCL8/IL-8 et IL-6 atteignent leurs valeurs maximales et corrént avec la DPG3. Deux raisons principales peuvent expliquer ces élévations : d'abord, plusieurs stimuli (chirurgical, ECMO, CEC, transfusions, et autres) induisent la libération de NET chez des neutrophiles pré-activés et d'autre part, la reperfusion donne lieu à tous les dommages d'I/R en plus de permettre la recirculation des NET compris dans les microvaisseaux pulmonaires [322-324, 412].

Nous rapportons une corrélation entre les NET circulants et le développement de la DPG3 chez l'humain. En 2015, Sayah *et al.* [175] ont mesuré les niveaux plasmatiques de complexes NE-DNA en préopératoire, à 4-6h et à 24h postopératoire et n'ont trouvé aucune association avec le développement de DPG3 persistante (DPG3 qui persiste à 24h, 48h et 72h). Cette discordance peut être raisonnée en deux points. D'abord, notre étude a inclus plus de prélèvements dans le temps (préopératoire, pré-déclampage du 1^{er} poumon, post-déclampage du 2^e poumon, 3h, 24h, 48h et 72h). Ensuite, à l'instar d'autres auteurs [126, 413-415], nous avons choisi une gradation de la DPG à 12h plutôt qu'à 24h, 48h ou 72h, ce qui est plus précoce et inclusif. En guise de prise en charge, cette classification hâtive de l'issue primaire (DPG3 versus Non-DPG3 à 12h postopératoire) est plus pratique considérant qu'une identification précoce des receveurs avec DPG3 permet l'instauration de traitements de support appropriés (ex. : ECMO). Dans le même ordre d'idées, comme les dommages d'I/R surviennent dès la reperfusion, une classification précoce (< 24h) du grade DPG permettra d'initier les thérapies expérimentales le plus tôt

possible. Cette rationnelle a d'ailleurs été utilisée par Sommer *et al.* en 2014 lorsqu'ils ont gradé les receveurs quelques minutes seulement après la reperfusion dans le but d'initier leur traitement inhibiteur du complément (inhibiteur de la C1 estérase) [415]. Il est aussi pertinent de mentionner que la majorité des receveurs qui développeront la DPG3 aussi tard qu'à 24h, 48h et 72h auront déjà des infiltrats radiologiques et de l'hypoxémie dans la première journée suivant la greffe. Dans notre étude, tous les receveurs ayant une DPG3 à 24h, 48h ou 72h avaient déjà la DPG3 à 12h. Il n'y a pas eu d'apparition tardive de la DPG3. Finalement, d'autres facteurs tels que la balance hydrique et les infections peuvent venir confondre la gradation de la DPG à des temps tardifs [416].

Grâce à l'étude des NET circulants, nos travaux ajoutent aux connaissances actuelles sur la cinétique de la NETose en greffe pulmonaire. Il est déjà connu que le greffon nouvellement perfusé est l'hôte d'une migration tissulaire importante de neutrophiles [164, 417, 418]. Sayah *et al.* ont ensuite montré une association entre la quantité de NET dans le BAL et le développement de la DPG persistante modérée à sévère (DPG2/3). Ces résultats signifient que les neutrophiles ayant migré s'activent pour libérer des NET dans les voies respiratoires. Comme dans le SIRS et l'ARDS, ces NET pourraient contribuer aux dommages engendrés par les neutrophiles au niveau de l'épithélium pulmonaire où il y a une perte d'intégrité cellulaire, dysfonction des canaux ENaC et Na⁺/K⁺-ATPases et irréversibilité du transport inverse des neutrophiles [38, 171, 172]. Tout bien considéré, la libération et l'accumulation de neutrophiles et de NET semblent donc délétères à plusieurs niveaux dans la microcirculation, le tissu interstitiel et les voies aériennes [175]. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant d'empêcher la formation de NET circulants afin de prévenir en amont leur accumulation dans la microcirculation, le tissu et les voies aériennes du greffon.

3.4 Nouveaux biomarqueurs potentiels de DPG

Comme pour plusieurs conditions à hauts taux de morbidité et mortalité, il existe un fort intérêt à prédire la survenue de DPG. Des dizaines de facteurs de risque cliniques ont été identifiés comme étant associés à la DPG, tant chez le donneur que le receveur [74, 130, 142-147]. Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucun algorithme prédictif prenant en compte ces facteurs de risque aux fins d'identification des receveurs à risque de DPG. De même, des dizaines de biomarqueurs pro-inflammatoires quantifiables dans le sang ou dans le BAL ont été associés au

développement de DPG [173]. Dans les études, certains de ces biomarqueurs étaient d'ailleurs mesurés chez le donneur ou chez le receveur avant et pendant la greffe, des mesures précoces qui sont d'un fort intérêt pour identifier en amont les receveurs à haut risque de DPG. De plus, grâce à des modèles de régressions [179] et d'analyses ROC (*receiver operating characteristic*) [184], certains biomarqueurs se sont avérés être d'importants prédicteurs de DPG. Des chercheurs ont d'ailleurs proposé l'ajout de biomarqueurs à la définition de la DPG afin de préciser le pronostic. Par exemple, Shah *et al.* ont montré que la combinaison des grades cliniques de DPG avec les mesures d'ICAM-1, de PAI-1 et de RAGE améliorait significativement la prédiction de la mortalité à 90 jours post-greffe [184]. Cependant, il n'existe à notre connaissance aucune utilisation courante de ces biomarqueurs aux fins d'identification des receveurs à haut risque de DPG. Dans notre étude, nous avons trouvé que les mesures intra et postopératoires des NET sériques (MPO-ADN, MPO, cfDNA) et de certains biomarqueurs pro-inflammatoires (IL-6, CXCL8/IL-8) sont associées à la DPG3 à 12h postopératoire. L'association entre l'IL-6, l'IL8 et la DPG avait été décrite précédemment [176, 178], mais nous sommes les premiers à avoir identifié une association entre les NET circulants et la DPG. Néanmoins, à cause d'un manque de puissance statistique, il fut impossible de conduire des études de prédictibilité pour évaluer le potentiel des NET circulants à prédire la survenue de la DPG. Cela dit, compte tenu de la mortalité élevée de la DPG3 et des bénéfices prouvés à dégrader les NET chez les études animales de DPG [175] et d'I/R [346, 348, 352-355], il pourrait être d'une grande utilité d'intégrer la mesure des NET sériques dans le but d'identifier les receveurs à haut risque de complications. En présence d'un éventuel traitement, cette mesure pourrait s'intégrer dans un arbre décisionnel thérapeutique et, de cette manière, il serait possible d'offrir un traitement ciblé à des donneurs, des greffons et/ou des receveurs préalablement identifiés. Autrement, cette mesure pourrait s'avérer utile afin de départager les besoins de support qui peuvent être, comme pour l'ECMO, à la fois dispendieux et limités.

3.5 Limitations

Notre étude comprend certaines limitations. D'abord, la pluralité des prélèvements sanguins rendait techniquement difficile l'acquisition complète de tous les prélèvements prévus au protocole. Nous avons utilisé des analyses longitudinales à effets aléatoires pour compenser ces pertes et accroître la puissance statistique, mais nous avons tout de même été incapables de

procéder à des régressions et à des analyses ROC afin d'établir le potentiel prédictif des biomarqueurs. De plus, conséquence du nombre de patients recrutés, nous n'avons pu faire des analyses stratifiées ou des analyses multivariées dans le but d'ajuster nos résultats pour la présence de covariables. Dans notre étude et en concordance avec la définition de l'ISHLT [121], tous les patients avec ECMO intraopératoire étaient considérés DPG3, et comme démontré pour la CEC [412], il est possible de croire que l'utilisation d'ECMO contribue à la NETose. Il est donc difficile de dissocier l'effet de l'ECMO de celui des NET en ce qui a trait au développement de la DPG. Par ailleurs, plusieurs facteurs connus pour être associés avec la DPG comme le sexe du receveur, l'IMC du receveur, la durée de ventilation mécanique et autres n'ont pas été significativement associés avec la DPG3 dans notre étude, et cela peut être dû au manque de puissance statistique.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

Les buts de ce travail étaient de mesurer les taux de NET et de certains biomarqueurs pro-inflammatoires chez les donneurs et receveurs en transplantation pulmonaire, puis d'ensuite corréler les niveaux mesurés avec le développement de DPG. Nos travaux de recherche montrent que les taux de NET sériques (MPO-ADN, MPO, cfDNA) et de certains biomarqueurs pro-inflammatoires (IL-6, CXCL8/IL-8) mesurés chez le receveur pendant et après la greffe sont associés avec le développement de DPG3 à 12h postopératoire. La mesure de ces biomarqueurs pourrait être utilisée pour cibler les receveurs à haut risque de DPG3 qui bénéficieraient d'éventuelles thérapies préventives. De plus, les greffons collectés présentaient différents degrés d'occlusion vasculaire comprenant des neutrophiles, des neutrophiles activés et des NET. Cette accumulation est très néfaste puisque les NET contribuent localement aux dommages tissulaires en plus de séquestrer d'autres cellules circulantes [254, 260, 272, 339, 354, 394-399]. Une modification à la méthode du lavage vasculaire et/ou l'ajout de thérapie pour dégrader les NET (i.e. DNase I) pourraient être envisagés pour décongestionner la microcirculation pulmonaire des greffons et prévenir la DPG.

4.1 Perspectives

La physiopathologie de la DPG est encore incomprise et il n'existe à ce jour aucun traitement pour contrer cette complication hautement fatale. Plusieurs travaux ont mis en lumière le rôle pathologique des NET dans la transplantation d'organes solides [175, 347-352, 356, 358], mais il reste beaucoup de chemin à parcourir pour bien élucider la cinétique de NETose et l'importance des NET dans la physiopathologie de la DPG.

D'abord, une nouvelle étude prospective observationnelle pourrait être conduite pour mieux caractériser la NETose en transplantation pulmonaire. Les neutrophiles étant autrefois considérés comme une population homogène de cellules, il est maintenant bien reconnu que les neutrophiles se divisent en deux sous-types de cellules, les neutrophiles à haute densité (HDN) et les neutrophiles à faible densité (LDN), qui sont plus inflammatoires et très adhérents à l'endothélium [339, 419]. Comme dans plusieurs conditions inflammatoires, dont la COVID-19, les taux de LDN corrélaient avec la sévérité de la maladie et produisent davantage de NET que les HDN [339, 419-422]. Les LDN n'ont jamais été étudiés dans le contexte de la transplantation pulmonaire et nous pensons qu'ils peuvent jouer un grand rôle dans la physiopathologie de la DPG. Des études d'adhésion cellulaire avec cellules endothéliales pulmonaires (hPMEC)

pourraient être envisagées en présence et l'absence de DNase I. En utilisant la cytométrie en flux, les neutrophiles (HDN et LDN; CD66b+/CD14-) en processus de NETose pourraient être quantifiés par immunomarquage avec CitH3 et MPO (cellules CitH3+/MPO+). L'agrégation des neutrophiles avec les plaquettes pourrait aussi être étudiée en ciblant les cellules CD41+/CD66b+/CD14-. En plus de mesurer les NET et certains biomarqueurs pro-inflammatoires, il pourrait être adéquat de mesurer les taux de DNase endogènes et certains biomarqueurs de coagulation et de fibrinolyse chez les donneurs et les receveurs. Finalement, tous ces paramètres pourraient être corrélés avec le développement de la DPG et avec d'autres variables d'intérêts.

Comme le CHUM est l'unique centre de transplantation pulmonaire au Québec, il pourrait être facile et souhaitable d'implanter une banque d'échantillons sanguins en transplantation pulmonaire au Québec. Cela permettrait aux chercheurs d'aujourd'hui et demain de tester leurs hypothèses scientifiques avec une puissance statistique considérable. Dans notre étude, nous avons été limités par le manque d'échantillons et le nombre de patients. Nous avons été en mesure de détecter une association entre les NET et la DPG, mais nous n'avons pas pu évaluer le potentiel prédictif des NET. À l'aide d'une banque d'échantillons sanguins, et considérant le nombre croissant de greffes pulmonaires effectuées au Québec, il serait possible à moyen terme de conduire une étude aux fins de validation pour déterminer la capacité des NET circulants à prédire la DPG. Il serait ensuite intéressant de combiner des facteurs de risque avec certains biomarqueurs dans un algorithme ayant pour but d'identifier les receveurs à haut risque de DPG ou, autrement, les receveurs à faible risque de DPG.

Enfin, considérant les bénéfices établis de la DNase I dans plusieurs études animales d'I/R et de transplantations d'organes solides [175, 346, 348, 353-355, 397, 398, 423, 424], il pourrait être souhaitable de tester l'administration IV de DNase I en greffe pulmonaire chez l'humain. Ce traitement pourrait prévenir ou diminuer l'occlusion vasculaire et améliorer le débit sanguin pulmonaire résultant en une meilleure oxygénation. David *et al.* ont rapporté qu'une dose IV unique de DNase I était sécuritaire et bien tolérée chez l'humain, sans aucun effet indésirable jusqu'à sept jours après l'administration [383]. En greffe pulmonaire, l'administration IV de DNase I (125 µg/kg poids corporel; 2 µg/ml de volume sanguin) pourrait être réalisée chez le donneur et/ou le receveur [383]. Il serait également possible d'administrer la DNase I en ajoutant

cette enzyme dans la solution utilisée aux fins de lavage vasculaire lors du prélèvement d'organe (Perfadex®, XVIVO Perfusion). Considérant qu'environ 30% des receveurs développeront la DPG3 parmi lesquels le tiers vont en décéder, il pourrait être judicieux d'inclure le plus de patients possibles dans une telle étude interventionnelle. À terme, la DNase I pourrait s'avérer être une approche thérapeutique sécuritaire et à faible coût qui pourrait aider un grand nombre de receveurs à risque de complications.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Weinberger SE, Cockrill BA, Mandel J, Weinberger SE: **Principles of pulmonary medicine**. In., Seventh edition. edn. Philadelphia, PA: Elsevier; 2019: 1 online resource.
2. Arms K, Camp PS: **Biology, a journey into life**. Philadelphia: Saunders College Pub.; 1988.
3. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR, Milaire J: **Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques**, [4e édition française]. edn; 2017.
4. Stone KC, Mercer RR, Freeman BA, Chang LY, Crapo JD: **Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue**. *Am Rev Respir Dis* 1992, **146**(2):454-456.
5. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER: **Cell number and cell characteristics of the normal human lung**. *Am Rev Respir Dis* 1982, **125**(6):740-745.
6. Hamid Q, Shannon J, Martin J: **Physiologic basis of respiratory disease**. Hamilton: BC Decker, Inc.; 2005.
7. Fox B, Bull TB, Guz A: **Mast cells in the human alveolar wall: an electronmicroscopic study**. *J Clin Pathol* 1981, **34**(12):1333-1342.
8. van Haarst JM, Hoogsteden HC, de Wit HJ, Verhoeven GT, Havenith CE, Drexhage HA: **Dendritic cells and their precursors isolated from human bronchoalveolar lavage: immunocytologic and functional properties**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994, **11**(3):344-350.
9. Vitte, Tortora, Derrickson, Ectors, Bain, Pariaud: **Anatomie et physiologie**, vol. 5e édition. Louvain-la-Neuve: De Boeck Supérieur; 2018.
10. Rhodin JA: **The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa**. *Am Rev Respir Dis* 1966, **93**(3):Suppl:1-15.
11. Nathanson I, Nadel JA: **Movement of electrolytes and fluid across airways**. *Lung* 1984, **162**(3):125-137.
12. Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E: **Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **15**(5):624-632.
13. Marsan C, Cava E, Loughnon J, Roujeau J: **Cytochemical and histochemical characterization of epithelial mucins in human bronchi**. *Acta Cytol* 1978, **22**(6):562-565.
14. Tamai S: **Basal cells of the human bronchiole**. *Acta Pathol Jpn* 1983, **33**(1):123-140.

15. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB: **Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **157**(6 Pt 1):2000-2006.
16. Boers JE, den Brok JL, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FB: **Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**(3 Pt 1):758-763.
17. Becker KL: **The coming of age of a bronchial epithelial cell.** *Am Rev Respir Dis* 1993, **148**(5):1166-1168.
18. Brinkman GL: **The mast cell in normal human bronchus and lung.** *J Ultrastruct Res* 1968, **23**(1):115-123.
19. Hance AJ: **Pulmonary immune cells in health and disease: dendritic cells and Langerhans' cells.** *Eur Respir J* 1993, **6**(8):1213-1220.
20. Erle DJ, Pabst R: **Intraepithelial lymphocytes in the lung: a neglected lymphocyte population.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, **22**(4):398-400.
21. Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG: **Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways.** *J Exp Med* 1991, **173**(6):1345-1356.
22. Meyrick B, Sturgess JM, Reid L: **A reconstruction of the duct system and secretory tubules of the human bronchial submucosal gland.** *Thorax* 1969, **24**(6):729-736.
23. Whimster WF, Lord P, Biles B: **Tracheobronchial gland profiles in four segmental airways.** *Am Rev Respir Dis* 1984, **129**(6):985-988.
24. Matsuba K, Thurlbeck WM: **A morphometric study of bronchial and bronchiolar walls in children.** *Am Rev Respir Dis* 1972, **105**(6):908-913.
25. Ebert RV, Terracio MJ: **The bronchiolar epithelium in cigarette smokers. Observations with the scanning electron microscope.** *Am Rev Respir Dis* 1975, **111**(1):4-11.
26. Jorens PG, Sibille Y, Goulding NJ, van Overveld FJ, Herman AG, Bossaert L, De Backer WA, Lauwerys R, Flower RJ, Bernard A: **Potential role of Clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury.** *Eur Respir J* 1995, **8**(10):1647-1653.
27. Phelps DS, Floros J: **Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization.** *Exp Lung Res* 1991, **17**(6):985-995.

28. De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, Franken C, Fransen JA, Dijkman JH, Kramps JA: **Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies.** *Am Rev Respir Dis* 1986, **133**(5):882-890.
29. Evans MJ, Cabral-Anderson LJ, Freeman G: **Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium.** *Lab Invest* 1978, **38**(6):648-653.
30. Young CD, Moore GW, Hutchins GM: **Connective tissue arrangement in respiratory airways.** *Anat Rec* 1980, **198**(2):245-254.
31. Boutten A, Venembre P, Seta N, Hamelin J, Aubier M, Durand G, Dehoux MS: **Oncostatin M is a potent stimulator of alpha1-antitrypsin secretion in lung epithelial cells: modulation by transforming growth factor-beta and interferon-gamma.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **18**(4):511-520.
32. Crouch EC, Moxley MA, Longmore W: **Synthesis of collagenous proteins by pulmonary type II epithelial cells.** *Am Rev Respir Dis* 1987, **135**(5):1118-1123.
33. Berthiaume Y, Matthay MA: **Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury.** *Respir Physiol Neurobiol* 2007, **159**(3):350-359.
34. Renkin EM, Fishman AP: **Pulmonary edema.** Bethesda, Md. Baltimore: American Physiological Society; 1979.
35. Kapanci Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G: **"Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation-perfusion ratio? Ultrastructural, immunofluorescence, and in vitro studies.** *J Cell Biol* 1974, **60**(2):375-392.
36. Townsley MI: **Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins.** *Compr Physiol* 2012, **2**(1):675-709.
37. Schneeberger EE: **Structural basis for some permeability properties of the air--blood barrier.** *Fed Proc* 1978, **37**(11):2471-2478.
38. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, Herridge M, Randolph AG, Calfee CS: **Acute respiratory distress syndrome.** *Nature Reviews Disease Primers* 2019, **5**(1):18.
39. West JB, Dollery CT, Naimark A: **Distribution of Blood Flow in Isolated Lung; Relation to Vascular and Alveolar Pressures.** *J Appl Physiol* 1964, **19**:713-724.
40. Nema R, Rajanna C, Ray A, Jadon RS, Vikram NK: **When sitting suffocates: a rare cause of platypnoea-orthodeoxia syndrome.** *Breathe (Sheff)* 2020, **16**(4):200205.

41. Boulet L-P, Cormier Y, Desmeules M, Leblanc P, Milot J, Provencher S, Sériès Fdr, Bibliothèque numérique c: **Physiopathologie respiratoire appliquée**. In. [Québec, Québec]: Presses de l'Université Laval; 2013.
42. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP: **Asthma**. *Lancet* 2002, **360**(9342):1313-1322.
43. Bousquet J, Dahl R, Khaltaev N: **Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases**. *Eur Respir J* 2007, **29**(2):233-239.
44. FitzGerald JM, Boulet LP, McIvor RA, Zimmerman S, Chapman KR: **Asthma control in Canada remains suboptimal: the Reality of Asthma Control (TRAC) study**. *Can Respir J* 2006, **13**(5):253-259.
45. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma P: **The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report**. *Allergy* 2004, **59**(5):469-478.
46. Vonk JM, Postma DS, Boezen HM, Grol MH, Schouten JP, Koeter GH, Gerritsen J: **Childhood factors associated with asthma remission after 30 year follow up**. *Thorax* 2004, **59**(11):925-929.
47. Hoyert DL, Xu J: **Deaths: preliminary data for 2011**. *Natl Vital Stat Rep* 2012, **61**(6):1-51.
48. Fletcher C, Peto R: **The natural history of chronic airflow obstruction**. *Br Med J* 1977, **1**(6077):1645-1648.
49. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE, Lung Health Study Research G: **The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial**. *Ann Intern Med* 2005, **142**(4):233-239.
50. Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK: **Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial**. *Bmj* 2000, **320**(7245):1297-1303.
51. Lung Health Study Research G, Wise R, Connett J, Weinmann G, Scanlon P, Skeans M: **Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease**. *N Engl J Med* 2000, **343**(26):1902-1909.
52. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: **Global Strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2022 report)**. In.: www.goldcopd.org.
53. Canada Fk: **À propos de la FK, 2021**. In. <https://www.fibrosekystique.ca/about-cf>.

54. Gouvernement du Québec: **Fibrose kystique**, 2020. In. <https://www.quebec.ca/sante/problemes-de-sante/a-z/fibrose-kystique/>.
55. Fibrose kystique Canada: **Le registre canadien sur la fibrose kystique: rapport de données annuel 2017**. In. <https://www.cysticfibrosis.ca/registry/RapportsDeDonneesAnnuel2017.pdf>.
56. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC: **Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease**. *Cell* 1998, **95**(7):1005-1015.
57. Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A: **Cystic fibrosis**. *Nat Rev Dis Primers* 2015, **1**:15010.
58. Feng LB, Grosse SD, Green RF, Fink AK, Sawicki GS: **Precision Medicine In Action: The Impact Of Ivacaftor On Cystic Fibrosis-Related Hospitalizations**. *Health Aff (Millwood)* 2018, **37**(5):773-779.
59. Thelin WR, Boucher RC: **The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis**. *Curr Opin Pharmacol* 2007, **7**(3):290-295.
60. Stanojevic S, Vukovojac K, Sykes J, Ratjen F, Tullis E, Stephenson AL: **Projecting the impact of delayed access to elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor for people with Cystic Fibrosis**. *J Cyst Fibros* 2021, **20**(2):243-249.
61. Ryu JH, Daniels CE, Hartman TE, Yi ES: **Diagnosis of interstitial lung diseases**. *Mayo Clin Proc* 2007, **82**(8):976-986.
62. American Thoracic S, European Respiratory S: **American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001**. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**(2):277-304.
63. Valeyre D, Freynet O, Dion G, Bouvry D, Annesi-Maesano I, Nunes H: **[Epidemiology of interstitial lung diseases]**. *Presse Med* 2010, **39**(1):53-59.
64. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ *et al*: **Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension**. *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**(1 Suppl):S55-S66.
65. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC *et al*: **Updated clinical classification of pulmonary hypertension**. *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**(1 Suppl):S43-S54.
66. Jeffery TK, Morrell NW: **Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension**. *Prog Cardiovasc Dis* 2002, **45**(3):173-202.

67. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT *et al*: **Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry.** *Ann Intern Med* 1991, **115**(5):343-349.
68. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Jr., Walker GR, Jr.: **Lung Homotransplantation in Man.** *JAMA* 1963, **186**:1065-1074.
69. Raghu G, Carbone RG, SpringerLink (Service en ligne): **Lung Transplantation : Evolving Knowledge and New Horizons.** Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer; 2018.
70. Transplant Québec: **Donneur, 2013.** In. <https://www.transplantquebec.ca/donneur>.
71. Transplant Québec: **Statistiques officielles, 2019.** In. https://www.transplantquebec.ca/sites/default/files/statistiques_2019_final_2.pdf.
72. Transplant Québec: **Statistiques officielles, 2020.** In. https://www.transplantquebec.ca/sites/default/files/bilan_2020_public_v2.pdf.
73. Canadian Institute for Health Information: **Canadian Organ Replacement Register. Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada, 2010 Annual Report.** In. https://publications.gc.ca/collections/collection_2010/icis-cihi/H115-38-2010-eng.pdf.
74. Vigneswaran WT, Garrity ER, Odell JA: **Lung transplantation : principles and practice.** In. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2016.
75. Bhorade SM, Vigneswaran W, McCabe MA, Garrity ER: **Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2000, **19**(12):1199-1204.
76. Frost AE: **Donor criteria and evaluation.** *Clin Chest Med* 1997, **18**(2):231-237.
77. Orens JB, Boehler A, de Perrot M, Estenne M, Glanville AR, Keshavjee S, Kotloff R, Morton J, Studer SM, Van Raemdonck D *et al*: **A review of lung transplant donor acceptability criteria.** *J Heart Lung Transplant* 2003, **22**(11):1183-1200.
78. Cypel M, Keshavjee S: **Strategies for safe donor expansion: donor management, donations after cardiac death, ex-vivo lung perfusion.** *Curr Opin Organ Transplant* 2013, **18**(5):513-517.
79. Botha P: **Extended donor criteria in lung transplantation.** *Curr Opin Organ Transplant* 2009, **14**(2):206-210.
80. Pierre AF, Keshavjee S: **Lung transplantation: donor and recipient critical care aspects.** *Curr Opin Crit Care* 2005, **11**(4):339-344.

81. Steen S, Sjoberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L: **Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor.** *Lancet* 2001, **357**(9259):825-829.
82. Starnes VA, Bowdish ME, Woo MS, Barbers RG, Schenkel FA, Horn MV, Pessotto R, Sievers EM, Baker CJ, Cohen RG *et al*: **A decade of living lobar lung transplantation: recipient outcomes.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004, **127**(1):114-122.
83. Slama A, Ghanim B, Klikovits T, Scheed A, Hoda MA, Hoetzenecker K, Jaksch P, Matilla J, Taghavi S, Klepetko W *et al*: **Lobar lung transplantation--is it comparable with standard lung transplantation?** *Transpl Int* 2014, **27**(9):909-916.
84. Date H: **Update on living-donor lobar lung transplantation.** *Curr Opin Organ Transplant* 2011, **16**(5):453-457.
85. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, Egan T, Keshavjee S, Knoop C, Kotloff R *et al*: **International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2006, **25**(7):745-755.
86. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B *et al*: **The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2014, **33**(10):1009-1024.
87. Munshi L, Keshavjee S, Cypel M: **Donor management and lung preservation for lung transplantation.** *Lancet Respir Med* 2013, **1**(4):318-328.
88. Henri C, Giraldeau G, Dorais M, Cloutier AS, Girard F, Noiseux N, Ferraro P, Rinfret S: **Atrial fibrillation after pulmonary transplantation: incidence, impact on mortality, treatment effectiveness, and risk factors.** *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012, **5**(1):61-67.
89. Echahidi N, Pibarot P, O'Hara G, Mathieu P: **Mechanisms, prevention, and treatment of atrial fibrillation after cardiac surgery.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **51**(8):793-801.
90. See VY, Roberts-Thomson KC, Stevenson WG, Camp PC, Koplan BA: **Atrial arrhythmias after lung transplantation: epidemiology, mechanisms at electrophysiology study, and outcomes.** *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009, **2**(5):504-510.
91. Hussein AA, Panchabhai TS, Budev MM, Tarakji K, Barakat AF, Saliba W, Lindsay B, Wazni OM: **Atrial Fibrillation and Pulmonary Venous Electrical Conduction Recovery After Full Surgical Resection and Anastomosis of the Pulmonary Veins: Insights From Follow-Up and Ablation Procedures in Lung Transplant Recipients.** *JACC Clin Electrophysiol* 2017, **3**(6):559-567.

92. Nielsen TD, Bahnson T, Davis RD, Palmer SM: **Atrial fibrillation after pulmonary transplant.** *Chest* 2004, **126**(2):496-500.
93. Herridge MS, de Hoyos AL, Chaparro C, Winton TL, Kesten S, Maurer JR: **Pleural complications in lung transplant recipients.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995, **110**(1):22-26.
94. Ferrer J, Roldan J, Roman A, Bravo C, Monforte V, Pallissa E, Gic I, Sole J, Morell F: **Acute and chronic pleural complications in lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2003, **22**(11):1217-1225.
95. Judson MA, Handy JR, Sahn SA: **Pleural effusions following lung transplantation. Time course, characteristics, and clinical implications.** *Chest* 1996, **109**(5):1190-1194.
96. Nunley DR, Grgurich WF, Keenan RJ, Dauber JH: **Empyema complicating successful lung transplantation.** *Chest* 1999, **115**(5):1312-1315.
97. de la Torre M, Fernandez R, Fieira E, Gonzalez D, Delgado M, Mendez L, Borro JM: **Postoperative surgical complications after lung transplantation.** *Rev Port Pneumol (2006)* 2015, **21**(1):36-40.
98. Clark SC, Levine AJ, Hasan A, Hilton CJ, Forty J, Dark JH: **Vascular complications of lung transplantation.** *Ann Thorac Surg* 1996, **61**(4):1079-1082.
99. Santacruz JF, Mehta AC: **Airway complications and management after lung transplantation: ischemia, dehiscence, and stenosis.** *Proc Am Thorac Soc* 2009, **6**(1):79-93.
100. Hyytinen TA, Heikkila LJ, Verkkala KA, Sipponen JT, Vainikka TL, Halme M, Hekali PE, Keto PE, Mattila SP: **Bronchial artery revascularization improves tracheal anastomotic healing after lung transplantation.** *Scand Cardiovasc J* 2000, **34**(2):213-218.
101. Date H, Trulock EP, Arcidi JM, Sundaresan S, Cooper JD, Patterson GA: **Improved airway healing after lung transplantation. An analysis of 348 bronchial anastomoses.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995, **110**(5):1424-1432; discussion 1432-1423.
102. Garfein ES, McGregor CC, Galantowicz ME, Schulman LL: **Deleterious effects of telescoped bronchial anastomosis in single and bilateral lung transplantation.** *Ann Transplant* 2000, **5**(1):5-11.
103. Murthy SC, Blackstone EH, Gildea TR, Gonzalez-Stawinski GV, Feng J, Budev M, Mason DP, Pettersson GB, Mehta AC, Members of Cleveland Clinic's Pulmonary Transplant T: **Impact of anastomotic airway complications after lung transplantation.** *Ann Thorac Surg* 2007, **84**(2):401-409, 409 e401-404.

104. Garfein ES, Ginsberg ME, Gorenstein L, McGregor CC, Schulman LL: **Superiority of end-to-end versus telescoped bronchial anastomosis in single lung transplantation for pulmonary emphysema.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001, **121**(1):149-154.
105. Samano MN, Minamoto H, Junqueira JJ, Yamacake KG, Gomes HA, Mariani AW, Pego-Fernandes PM, Jatene FB: **Bronchial complications following lung transplantation.** *Transplant Proc* 2009, **41**(3):921-926.
106. Karmy-Jones R, Vallieres E, Culver B, Raghu G, Wood DE: **Bronchial-atrial fistula after lung transplant resulting in fatal air embolism.** *Ann Thorac Surg* 1999, **67**(2):550-551.
107. Hoff SJ, Johnson JE, Frist WH: **Aortobronchial fistula after unilateral lung transplantation.** *Ann Thorac Surg* 1993, **56**(6):1402-1403.
108. Valapour M, Skeans MA, Smith JM, Edwards LB, Cherikh WS, Uccellini K, Israni AK, Snyder JJ, Kasiske BL: **OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Lung.** *Am J Transplant* 2017, **17 Suppl 1**:357-424.
109. Levine DJ, Glanville AR, Aboyoun C, Belperio J, Benden C, Berry GJ, Hachem R, Hayes D, Jr., Neil D, Reinsmoen NL *et al*: **Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2016, **35**(4):397-406.
110. Huang HJ, Yusen RD, Meyers BF, Walter MJ, Mohanakumar T, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR: **Late primary graft dysfunction after lung transplantation and bronchiolitis obliterans syndrome.** *Am J Transplant* 2008, **8**(11):2454-2462.
111. Bharat A, Kuo E, Steward N, Aloush A, Hachem R, Trulock EP, Patterson GA, Meyers BF, Mohanakumar T: **Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection.** *Ann Thorac Surg* 2008, **86**(1):189-195; discussion 196-187.
112. Bharat A, Narayanan K, Street T, Fields RC, Steward N, Aloush A, Meyers B, Schuessler R, Trulock EP, Patterson GA *et al*: **Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection.** *Transplantation* 2007, **83**(2):150-158.
113. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF, Chakinala MM, Walter MJ, Aloush AA, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR: **Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**(5):507-513.
114. Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS, Whelan TP, Radosevich DM, Hertz MI, Dahlberg PS: **Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2007, **26**(10):1004-1011.
115. Aguilar PR, Michelson AP, Isakow W: **Obliterative Bronchiolitis.** *Transplantation* 2016, **100**(2):272-283.

116. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P, Wilson KC, Brozek J, Glanville AR, Committee IAEBTF, Committee IAEBTF: **An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome.** *Eur Respir J* 2014, **44**(6):1479-1503.
117. Costa J, Benvenuto LJ, Sonett JR: **Long-term outcomes and management of lung transplant recipients.** *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2017, **31**(2):285-297.
118. Bos S, Vos R, Van Raemdonck DE, Verleden GM: **Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020?** *Curr Opin Organ Transplant* 2020, **25**(3):268-273.
119. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D, Dysfunction IWGoPLG: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1454-1459.
120. Vigneswaran WT, Garrity ER, Odell JA: **Lung transplantation.** In: *Principles and practice.* Boca Raton, Fla.: CRC Press; 2015: 1 online resource (419 pages).
121. Snell GI, Yusen RD, Weill D, Strueber M, Garrity E, Reed A, Pelaez A, Whelan TP, Perch M, Bag R *et al*: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction, part I: Definition and grading-A 2016 Consensus Group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2017, **36**(10):1097-1103.
122. Haydock DA, Trulock EP, Kaiser LR, Knight SR, Pasque MK, Cooper JD: **Management of dysfunction in the transplanted lung: experience with 7 clinical cases. Washington University Lung Transplant Group.** *Ann Thorac Surg* 1992, **53**(4):635-641.
123. Sleiman C, Mal H, Fournier M, Duchatelle JP, Icard P, Groussard O, Jebrak G, Mollo JL, Raffy O, Roue C *et al*: **Pulmonary reimplantation response in single-lung transplantation.** *Eur Respir J* 1995, **8**(1):5-9.
124. Khan SU, Salloum J, O'Donovan PB, Mascha EJ, Mehta AC, Matthay MA, Arroliga AC: **Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response.** *Chest* 1999, **116**(1):187-194.
125. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, Kotloff RM: **Primary graft failure following lung transplantation.** *Chest* 1998, **114**(1):51-60.
126. Prekker ME, Nath DS, Walker AR, Johnson AC, Hertz MI, Herrington CS, Radosevich DM, Dahlberg PS: **Validation of the proposed International Society for Heart and Lung Transplantation grading system for primary graft dysfunction after lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2006, **25**(4):371-378.

127. Whitson BA, Nath DS, Johnson AC, Walker AR, Prekker ME, Radosevich DM, Herrington CS, Dahlberg PS: **Risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006, **131**(1):73-80.
128. Kreisel D, Krupnick AS, Puri V, Guthrie TJ, Trulock EP, Meyers BF, Patterson GA: **Short- and long-term outcomes of 1000 adult lung transplant recipients at a single center.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011, **141**(1):215-222.
129. Christie JD, Bellamy S, Ware LB, Lederer D, Hadjiliadis D, Lee J, Robinson N, Localio AR, Wille K, Lama V *et al*: **Construct validity of the definition of primary graft dysfunction after lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2010, **29**(11):1231-1239.
130. Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, Shah RJ, Localio AR, Bellamy SL, Lederer DJ, Cantu E, Kohl BA, Lama VN *et al*: **Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**(5):527-534.
131. Daoud D, Chacon Alberty L, Wei Q, Hochman Mendez C, Virk MHM, Mase J, Jindra P, Cusick M, Choi H, Debolske N *et al*: **Incidence of primary graft dysfunction is higher according to the new ISHLT 2016 guidelines and correlates with clinical and molecular risk factors.** *J Thorac Dis* 2021, **13**(6):3426-3442.
132. Diamond JM, Arcasoy S, Kennedy CC, Eberlein M, Singer JP, Patterson GM, Edelman JD, Dhillon G, Pena T, Kawut SM *et al*: **Report of the International Society for Heart and Lung Transplantation Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction, part II: Epidemiology, risk factors, and outcomes-A 2016 Consensus Group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2017, **36**(10):1104-1113.
133. Arcasoy SM, Fisher A, Hachem RR, Scavuzzo M, Ware LB, Dysfunction IWGoPLG: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part V: predictors and outcomes.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1483-1488.
134. Chatila WM, Furukawa S, Gaughan JP, Criner GJ: **Respiratory failure after lung transplantation.** *Chest* 2003, **123**(1):165-173.
135. Thabut G, Vinatier I, Stern JB, Leseche G, Loirat P, Fournier M, Mal H: **Primary graft failure following lung transplantation: predictive factors of mortality.** *Chest* 2002, **121**(6):1876-1882.
136. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, DeMissie E, Kimmel SE: **The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **171**(11):1312-1316.
137. Samano MN, Fernandes LM, Baranauskas JC, Correia AT, Afonso JE, Jr., Teixeira RH, Caramori ML, Pego-Fernandes PM, Jatene FB: **Risk factors and survival impact of primary graft dysfunction after lung transplantation in a single institution.** *Transplant Proc* 2012, **44**(8):2462-2468.

138. Felten ML, Sinaceur M, Treilhaud M, Roze H, Mornex JF, Pottecher J, Journois D, Fischler M: **Factors associated with early graft dysfunction in cystic fibrosis patients receiving primary bilateral lung transplantation.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2012, **41**(3):686-690.
139. Liu Y, Liu Y, Su L, Jiang SJ: **Recipient-related clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation: a systematic review and meta-analysis.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e92773.
140. Keller M, Bush E, Diamond JM, Shah P, Matthew J, Brown AW, Sun J, Timofte I, Kong H, Tunc I *et al*: **Use of donor-derived-cell-free DNA as a marker of early allograft injury in primary graft dysfunction (PGD) to predict the risk of chronic lung allograft dysfunction (CLAD).** *J Heart Lung Transplant* 2021, **40**(6):488-493.
141. Cantu E, Diamond JM, Suzuki Y, Lasky J, Schaufler C, Lim B, Shah R, Porteous M, Lederer DJ, Kawut SM *et al*: **Quantitative Evidence for Revising the Definition of Primary Graft Dysfunction after Lung Transplant.** *Am J Respir Crit Care Med* 2018, **197**(2):235-243.
142. Lee JC, Christie JD: **Primary graft dysfunction.** *Clin Chest Med* 2011, **32**(2):279-293.
143. Christie JD, Kotloff RM, Pochettino A, Arcasoy SM, Rosengard BR, Landis JR, Kimmel SE: **Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation.** *Chest* 2003, **124**(4):1232-1241.
144. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, Pajaro O, Schueler S, Verleden GM, Dysfunction IWGoPLG: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1460-1467.
145. Barr ML, Kawut SM, Whelan TP, Girgis R, Bottcher H, Sonett J, Vigneswaran W, Follette DM, Corris PA, Dysfunction IWGoPLG: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part IV: recipient-related risk factors and markers.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1468-1482.
146. Kuntz CL, Hadjiliadis D, Ahya VN, Kotloff RM, Pochettino A, Lewis J, Christie JD: **Risk factors for early primary graft dysfunction after lung transplantation: a registry study.** *Clin Transplant* 2009, **23**(6):819-830.
147. Criner RN, Clausen E, Cantu E: **Primary graft dysfunction.** *Curr Opin Organ Transplant* 2021, **26**(3):321-327.
148. Baldwin MR, Peterson ER, Easthausen I, Quintanilla I, Colago E, Sonett JR, D'Ovidio F, Costa J, Diamond JM, Christie JD *et al*: **Donor age and early graft failure after lung transplantation: a cohort study.** *Am J Transplant* 2013, **13**(10):2685-2695.

149. Renard R, Girault A, Avramenko-Bouvier A, Roussel A, Cerceau P, Pellenc Q, Bunel V, Godet C, Jebrak G, Messika J *et al*: **Outcome of Lung Transplantation Using Grafts From Donors Over 65 Years of Age.** *Ann Thorac Surg* 2021, **112**(4):1142-1149.
150. Zhou J, Chen B, Liao H, Wang Z, Lyu M, Man S, Pu Q, Liu L: **The Comparable Efficacy of Lung Donation After Circulatory Death and Brain Death: A Systematic Review and Meta-analysis.** *Transplantation* 2019, **103**(12):2624-2633.
151. Qaqish R, Watanabe Y, Hoetzenecker K, Yeung J, Chen M, Pierre A, Yasufuku K, Donahoe L, de Perrot M, Waddell T *et al*: **Impact of donor time to cardiac arrest in lung donation after circulatory death.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2021, **161**(4):1546-1555.
152. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Dartevelle P, Dromer C, Velly JF, Stern M, Loirat P, Bertocchi M, Mornex JF *et al*: **Influence of donor characteristics on outcome after lung transplantation: a multicenter study.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(9):1347-1353.
153. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ, Denish P, Silverman RA, Celedon JC, Reilly JJ *et al*: **Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**(6):2152-2158.
154. Minambres E, Llorca J, Subrviola B, Ballesteros MA, Ortiz-Melon F, Gonzalez-Castro A: **Influence of donor-recipient gender mismatch in early outcome after lung transplantation.** *Transplant Proc* 2008, **40**(9):3076-3078.
155. Alvarez A, Moreno P, Illana J, Espinosa D, Baamonde C, Arango E, Algar FJ, Salvatierra A: **Influence of donor-recipient gender mismatch on graft function and survival following lung transplantation.** *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013, **16**(4):426-435.
156. Cantu E, Shah RJ, Lin W, Daye ZJ, Diamond JM, Suzuki Y, Ellis JH, Borders CF, Andah GA, Beduhn B *et al*: **Oxidant stress regulatory genetic variation in recipients and donors contributes to risk of primary graft dysfunction after lung transplantation.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015, **149**(2):596-602.
157. Anderson MR, Udupa JK, Edwin E, Diamond JM, Singer JP, Kukreja J, Hays SR, Greenland JR, Ferrante A, Lippel M *et al*: **Adipose tissue quantification and primary graft dysfunction after lung transplantation: The Lung Transplant Body Composition study.** *J Heart Lung Transplant* 2019, **38**(12):1246-1256.
158. Diamond JM, Cantu E, Porteous MK, Suzuki Y, Meyer KC, Lederer DJ, Milewski RK, Arcasoy S, D'Ovidio F, Bacchetta M *et al*: **Peripheral Blood Gene Expression Changes Associated With Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation.** *Am J Transplant* 2017, **17**(7):1770-1777.
159. Cantu E, Shah RJ, Lin W, Daye ZJ, Diamond JM, Suzuki Y, Ellis JH, Borders CF, Andah GA, Beduhn B *et al*: **Oxidant stress regulatory genetic variation in recipients and**

- donors contributes to risk of primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015, **149**(2):596-602.**
160. Grimm JC, Valero V, 3rd, Kilic A, Magruder JT, Merlo CA, Shah PD, Shah AS: **Association Between Prolonged Graft Ischemia and Primary Graft Failure or Survival Following Lung Transplantation.** *JAMA Surg* 2015, **150**(6):547-553.
161. Mulvihill MS, Yerokun BA, Davis RP, Ranney DN, Daneshmand MA, Hartwig MG: **Extracorporeal membrane oxygenation following lung transplantation: indications and survival.** *J Heart Lung Transplant* 2017.
162. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Svokos AA, Svokos KA, Zacharoulis D: **Extracorporeal membrane oxygenation versus cardiopulmonary bypass during lung transplantation: a meta-analysis.** *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2018, **66**(1):38-47.
163. 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 Heart Circ Physiol* 2010, **299**(5):H1283-1299.
164. Talaie T, DiChiacchio L, Prasad NK, Pasrija C, Julliard W, Kaczorowski DJ, Zhao Y, Lau CL: **Ischemia-reperfusion Injury in the Transplanted Lung: A Literature Review.** *Transplant Direct* 2021, **7**(2):e652.
165. 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.
166. Minamiya Y, Tozawa K, Kitamura M, Saito S, Ogawa J: **Platelet-activating factor mediates intercellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**(1):150-157.
167. Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M, Taylor AE: **Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung.** *J Appl Physiol (1985)* 1995, **78**(6):2245-2252.
168. Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC, Pinsky DJ: **Failure to express the P-selectin gene or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(2):757-761.
169. Kapelanski DP, Iguchi A, Niles SD, Mao HZ: **Lung reperfusion injury is reduced by inhibiting a CD18-dependent mechanism.** *J Heart Lung Transplant* 1993, **12**(2):294-306; discussion 306-297.
170. DeMeester SR, Molinari MA, Shiraishi T, Okabayashi K, Manchester JK, Wick MR, Cooper JD, Patterson GA: **Attenuation of rat lung isograft reperfusion injury with a combination of anti-ICAM-1 and anti-beta2 integrin monoclonal antibodies.** *Transplantation* 1996, **62**(10):1477-1485.

171. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC-L, Cooper MA: **Neutrophils—A Key Component of Ischemia-Reperfusion Injury.** *Shock* 2013, **40**(6):463-470.
172. Landry CB, E. Ferraro, P.: **Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la dysfonction primaire du greffon suite à une transplantation pulmonaire.** Université de Montréal; 2020.
173. Hamilton BC, Kukreja J, Ware LB, Matthay MA: **Protein biomarkers associated with primary graft dysfunction following lung transplantation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017, **312**(4):L531-1541.
174. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Haslett C, Strieter RM, Dark JH, Corris PA: **Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(1):259-265.
175. Sayah DM, Mallavia B, Liu F, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, DerHovanessian A, Ross DJ, Lynch JP, 3rd, Saggarr R, Ardehali A *et al*: **Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2015, **191**(4):455-463.
176. Allen JG, Lee MT, Weiss ES, Arnaoutakis GJ, Shah AS, Detrick B: **Preoperative recipient cytokine levels are associated with early lung allograft dysfunction.** *Ann Thorac Surg* 2012, **93**(6):1843-1849.
177. Moreno I, Vicente R, Ramos F, Vicente JL, Barbera M: **Determination of interleukin-6 in lung transplantation: association with primary graft dysfunction.** *Transplant Proc* 2007, **39**(7):2425-2426.
178. Mathur A, Baz M, Staples ED, Bonnell M, Speckman JM, Hess PJ, Jr., Klodell CT, Knauf DG, Moldawer LL, Beaver TM: **Cytokine profile after lung transplantation: correlation with allograft injury.** *Ann Thorac Surg* 2006, **81**(5):1844-1849; discussion 1849-1850.
179. Covarrubias M, Ware LB, Kawut SM, De Andrade J, Milstone A, Weinacker A, Orens J, Lama V, Wille K, Bellamy S *et al*: **Plasma intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in primary graft dysfunction after lung transplantation.** *Am J Transplant* 2007, **7**(11):2573-2578.
180. Diamond JM, Porteous MK, Cantu E, Meyer NJ, Shah RJ, Lederer DJ, Kawut SM, Lee J, Bellamy SL, Palmer SM *et al*: **Elevated plasma angiopoietin-2 levels and primary graft dysfunction after lung transplantation.** *PLoS One* 2012, **7**(12):e51932.
181. Kawut SM, Okun J, Shimbo D, Lederer DJ, De Andrade J, Lama V, Shah A, Milstone A, Ware LB, Weinacker A *et al*: **Soluble p-selectin and the risk of primary graft dysfunction after lung transplantation.** *Chest* 2009, **136**(1):237-244.
182. Christie JD, Robinson N, Ware LB, Plotnick M, De Andrade J, Lama V, Milstone A, Orens J, Weinacker A, Demissie E *et al*: **Association of protein C and type 1**

- plasminogen activator inhibitor with primary graft dysfunction.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**(1):69-74.
183. Shah RJ, Emtiazjoo AM, Diamond JM, Smith PA, Roe DW, Wille KM, Orens JB, Ware LB, Weinacker A, Lama VN *et al*: **Plasma complement levels are associated with primary graft dysfunction and mortality after lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2014, **189**(12):1564-1567.
184. Shah RJ, Bellamy SL, Localio AR, Wickersham N, Diamond JM, Weinacker A, Lama VN, Bhorade S, Belperio JA, Crespo M *et al*: **A panel of lung injury biomarkers enhances the definition of primary graft dysfunction (PGD) after lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2012, **31**(9):942-949.
185. Shargall Y, Guenther G, Ahya VN, Ardehali A, Singhal A, Keshavjee S: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part VI: treatment.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1489-1500.
186. Botha P, Jeyakanthan M, Rao JN, Fisher AJ, Prabhu M, Dark JH, Clark SC: **Inhaled nitric oxide for modulation of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2007, **26**(11):1199-1205.
187. Perrin G, Roch A, Michelet P, Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Doddoli C, Auffray JP: **Inhaled nitric oxide does not prevent pulmonary edema after lung transplantation measured by lung water content: a randomized clinical study.** *Chest* 2006, **129**(4):1024-1030.
188. Meade M, Granton JT, Matte-Martyn A, McRae K, Cripps PM, Weaver B, Keshavjee SH: **A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent reperfusion injury following lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2001, **20**(2):254-255.
189. Strüber M, Harringer W, Ernst M, Morschheuser T, Hein M, Bund M, Haverich A: **Inhaled nitric oxide as a prophylactic treatment against reperfusion injury of the lung.** *Thorac Cardiovasc Surg* 1999, **47**(3):179-182.
190. Date H, Triantafillou AN, Trulock EP, Pohl MS, Cooper JD, Patterson GA: **Inhaled nitric oxide reduces human lung allograft dysfunction.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996, **111**(5):913-919.
191. Macdonald P, Mundy J, Rogers P, Harrison G, Branch J, Glanville A, Keogh A, Spratt P: **Successful treatment of life-threatening acute reperfusion injury after lung transplantation with inhaled nitric oxide.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995, **110**(3):861-863.
192. Adatia I, Lillehei C, Arnold JH, Thompson JE, Palazzo R, Fackler JC, Wessel DL: **Inhaled nitric oxide in the treatment of postoperative graft dysfunction after lung transplantation.** *Ann Thorac Surg* 1994, **57**(5):1311-1318.

193. Ricciotti E, FitzGerald GA: **Prostaglandins and inflammation**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, **31**(5):986-1000.
194. de Perrot M, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, Keshavjee S: **Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines**. *Transplantation* 2001, **72**(9):1505-1512.
195. Fang W, Li H, Zhou L, Su L, Liang Y, Mu Y: **Effect of prostaglandin E1 on TNF-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells**. *Can J Physiol Pharmacol* 2010, **88**(5):576-583.
196. Farrokhnia E, Makarem J, Khan ZH, Mohagheghi M, Maghsoudlou M, Abdollahi A: **The effects of prostaglandin E1 on interleukin-6, pulmonary function and postoperative recovery in oesophagectomised patients**. *Anaesth Intensive Care* 2009, **37**(6):937-943.
197. Wittwer T, Franke UF, Ochs M, Sandhaus T, Schuette A, Richter S, Dreyer N, Knudsen L, Müller T, Schubert H *et al*: **Inhalative pre-treatment of donor lungs using the aerosolized prostacyclin analog iloprost ameliorates reperfusion injury**. *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1673-1679.
198. Della Rocca G, Coccia C, Pompei L, Costa MG, Di Marco P, Pietropaoli P: **Inhaled aerosolized prostaglandin E1, pulmonary hemodynamics, and oxygenation during lung transplantation**. *Minerva Anesthesiol* 2008, **74**(11):627-633.
199. Toyoda Y, Thacker J, Santos R, Nguyen D, Bhamra J, Bermudez C, Kormos R, Johnson B, Crespo M, Pilewski J *et al*: **Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension**. *Ann Thorac Surg* 2008, **86**(4):1116-1122.
200. Jin Z, Suen KC, Wang Z, Ma D: **Review 2: Primary graft dysfunction after lung transplant-pathophysiology, clinical considerations and therapeutic targets**. *J Anesth* 2020, **34**(5):729-740.
201. Yeung JC, Keshavjee S: **Overview of clinical lung transplantation**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, **4**(1):a015628.
202. Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J: **Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management**. *Kidney Int* 2017, **92**(1):37-46.
203. Marini JJ: **Evolving concepts in the ventilatory management of acute respiratory distress syndrome**. *Clin Chest Med* 1996, **17**(3):555-575.
204. de Perrot M, Imai Y, Volgyesi GA, Waddell TK, Liu M, Mullen JB, McRae K, Zhang H, Slutsky AS, Ranieri VM *et al*: **Effect of ventilator-induced lung injury on the development of reperfusion injury in a rat lung transplant model**. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002, **124**(6):1137-1144.

205. Tague LK, Bedair B, Witt C, Byers DE, Vazquez-Guillamet R, Kulkarni H, Alexander-Brett J, Nava R, Puri V, Kreisel D *et al*: **Lung protective ventilation based on donor size is associated with a lower risk of severe primary graft dysfunction after lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 2021, **40**(10):1212-1222.
206. Chaves RCF, Rabello Filho R, Timenetsky KT, Moreira FT, Vilanova L, Bravim BA, Serpa Neto A, Corrêa TD: **Extracorporeal membrane oxygenation: a literature review.** *Rev Bras Ter Intensiva* 2019, **31**(3):410-424.
207. Harano T, Ryan JP, Morrell MR, Luketich JD, Sanchez PG: **Extracorporeal Membrane Oxygenation for Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation.** *ASAIO J* 2021, **67**(9):1071-1078.
208. Bermudez CA, Adusumilli PS, McCurry KR, Zaldonis D, Crespo MM, Pilewski JM, Toyoda Y: **Extracorporeal membrane oxygenation for primary graft dysfunction after lung transplantation: long-term survival.** *Ann Thorac Surg* 2009, **87**(3):854-860.
209. Ko WJ, Chen YS, Lee YC: **Replacing cardiopulmonary bypass with extracorporeal membrane oxygenation in lung transplantation operations.** *Artif Organs* 2001, **25**(8):607-612.
210. Ko WJ, Chen YS, Luh SP, Lee YC, Chu SH: **Extracorporeal membrane oxygenation support for single-lung transplantation in patients with primary pulmonary hypertension.** *Transplant Proc* 1999, **31**(1-2):166-168.
211. Pereszlenyi A, Lang G, Steltzer H, Hetz H, Kocher A, Neuhauser P, Wissner W, Klepetko W: **Bilateral lung transplantation with intra- and postoperatively prolonged ECMO support in patients with pulmonary hypertension.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2002, **21**(5):858-863.
212. Kolaczowska E, Kubes P: **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2013, **13**(3):159-175.
213. Jasper AE, McIver WJ, Sapey E, Walton GM: **Understanding the role of neutrophils in chronic inflammatory airway disease.** *F1000Res* 2019, **8**.
214. Borregaard N: **Neutrophils, from marrow to microbes.** *Immunity* 2010, **33**(5):657-670.
215. Hoffbrand AV, Moss PAH: **Essential haematology**, 6th edn. Oxford ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2011.
216. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M: **Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection.** *Clin Chim Acta* 2016, **457**:46-53.
217. Mehta HM, Malandra M, Corey SJ: **G-CSF and GM-CSF in Neutropenia.** *J Immunol* 2015, **195**(4):1341-1349.

218. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C: **Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2017, **17**(4):248-261.
219. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW, Ayoub SS: **Fundamentals of Inflammation.** In. Cambridge: Cambridge University Press,; 2010: 1 online resource (489 pages).
220. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C: **Neutrophils: Many Ways to Die.** *Front Immunol* 2021, **12**:631821.
221. Boettcher S, Manz MG: **Sensing and translation of pathogen signals into demand-adapted myelopoiesis.** *Curr Opin Hematol* 2016, **23**(1):5-10.
222. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K: **NETopathies? Unraveling the Dark Side of Old Diseases through Neutrophils.** *Front Immunol* 2016, **7**:678.
223. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER: **Neutrophil kinetics in health and disease.** *Trends Immunol* 2010, **31**(8):318-324.
224. Peters AM, Saverymuttu SH, Keshavarzian A, Bell RN, Lavender JP: **Splenic pooling of granulocytes.** *Clin Sci (Lond)* 1985, **68**(3):283-289.
225. Ussov WY, Aktolun C, Myers MJ, Jamar F, Peters AM: **Granulocyte margination in bone marrow: comparison with margination in the spleen and liver.** *Scand J Clin Lab Invest* 1995, **55**(1):87-96.
226. Athens JW, Raab SO, Haab OP, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM: **Leukokinetic studies. III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects.** *J Clin Invest* 1961, **40**:159-164.
227. Hogg JC, Doerschuk CM: **Leukocyte traffic in the lung.** *Annu Rev Physiol* 1995, **57**:97-114.
228. Peters AM: **Just how big is the pulmonary granulocyte pool?** *Clin Sci (Lond)* 1998, **94**(1):7-19.
229. Lien DC, Wagner WW, Jr., Capen RL, Haslett C, Hanson WL, Hofmeister SE, Henson PM, Worthen GS: **Physiological neutrophil sequestration in the lung: visual evidence for localization in capillaries.** *J Appl Physiol (1985)* 1987, **62**(3):1236-1243.
230. Summers C, Singh NR, White JF, Mackenzie IM, Johnston A, Solanki C, Balan KK, Peters AM, Chilvers ER: **Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome.** *Thorax* 2014, **69**(7):623-629.
231. Farahi N, Loutsios C, Tregay N, Summers C, Lok LSC, Ruparelia P, Solanki CK, Gillett D, Chilvers ER, Peters AM: **Radiolabelled leucocytes in human pulmonary disease.** *Br Med Bull* 2018, **127**(1):69-82.

232. Opal SM: **Severe Sepsis and Septic Shock**. In: *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*. Edited by Norton JA, Barie PS, Bollinger RR, Chang AE, Lowry SF, Mulvihill SJ, Pass HI, Thompson RW. New York, NY: Springer New York; 2008: 287-304.
233. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(9):678-689.
234. Zarbock A, Ley K: **Neutrophil adhesion and activation under flow**. *Microcirculation* 2009, **16**(1):31-42.
235. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC: **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition : Expert Consult - Online**. In., 9th ed. edn. London: Elsevier Health Sciences; 2014.
236. Schmidt EP, Lee WL, Zemans RL, Yamashita C, Downey GP: **On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity**. *Physiology (Bethesda)* 2011, **26**(5):334-347.
237. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe PE, Dumas E, Rakel A, White M, Sirois MG: **CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes**. *Immunohorizons* 2019, **3**(8):378-388.
238. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F: **Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis**. *J Leukoc Biol* 1996, **59**(2):229-240.
239. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. *Science* 2004, **303**(5663):1532-1535.
240. Phillipson M, Kubes P: **The neutrophil in vascular inflammation**. *Nat Med* 2011, **17**(11):1381-1390.
241. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N: **Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology**. *Biomolecules* 2019, **9**(8).
242. Yipp BG, Kubes P: **NETosis: how vital is it?** *Blood* 2013, **122**(16):2784-2794.
243. Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Jyoti A: **Neutrophil Extracellular Traps: Formation and Involvement in Disease Progression**. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2018, **17**(3):208-220.
244. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC *et al*: **Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo**. *Nat Med* 2012, **18**(9):1386-1393.

245. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU: **Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(11):1438-1444.
246. Thiam HR, Wong SL, Qiu R, Kittisopikul M, Vahabikashi A, Goldman AE, Goldman RD, Wagner DD, Waterman CM: **NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020, **117**(13):7326-7337.
247. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A: **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** *J Cell Biol* 2007, **176**(2):231-241.
248. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A: **Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps.** *J Cell Biol* 2010, **191**(3):677-691.
249. Sorensen OE, Borregaard N: **Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils.** *J Clin Invest* 2016, **126**(5):1612-1620.
250. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA *et al*: **Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation.** *J Cell Biol* 2009, **184**(2):205-213.
251. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, Wang Y: **PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures.** *Front Immunol* 2012, **3**:307.
252. Neeli I, Radic M: **Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release.** *Front Immunol* 2013, **4**:38.
253. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J: **Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis.** *Blood* 2009, **114**(13):2619-2622.
254. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD: **Extracellular DNA traps promote thrombosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(36):15880-15885.
255. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SH, Weitz JI, Liaw PC: **Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, **34**(9):1977-1984.
256. Ward CM, Tetaz TJ, Andrews RK, Berndt MC: **Binding of the von Willebrand factor A1 domain to histone.** *Thromb Res* 1997, **86**(6):469-477.

257. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD: **Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice.** *J Thromb Haemost* 2012, **10**(1):136-144.
258. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, Esmon CT: **Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4.** *Blood* 2011, **118**(7):1952-1961.
259. de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM: **NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship.** *Cell Mol Immunol* 2019, **16**(1):19-27.
260. Kapoor S, Opneja A, Nayak L: **The role of neutrophils in thrombosis.** *Thromb Res* 2018, **170**:87-96.
261. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M *et al*: **Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo.** *J Exp Med* 2012, **209**(4):819-835.
262. Manukyan D, von Bruehl ML, Massberg S, Engelmann B: **Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation.** *Thromb Res* 2008, **122** Suppl 1:S19-22.
263. Reinhardt C, von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L *et al*: **Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation.** *J Clin Invest* 2008, **118**(3):1110-1122.
264. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB *et al*: **Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases.** *Nat Med* 2010, **16**(8):887-896.
265. Yuen J, Pluthero FG, Doua DN, Riedl M, Cherry A, Ulanova M, Kahr WH, Palaniyar N, Licht C: **NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways.** *Front Immunol* 2016, **7**:137.
266. van der Maten E, de Bont CM, de Groot R, de Jonge MI, Langereis JD, van der Flier M: **Alternative pathway regulation by factor H modulates Streptococcus pneumoniae induced proinflammatory cytokine responses by decreasing C5a receptor crosstalk.** *Cytokine* 2016, **88**:281-286.
267. O'Flynn J, Dixon KO, Faber Krol MC, Daha MR, van Kooten C: **Myeloperoxidase directs properdin-mediated complement activation.** *J Innate Immun* 2014, **6**(4):417-425.
268. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw KL, Weitz JI, Cook DJ, Fox-Robichaud AE, Liaw PC, Canadian Critical Care Translational Biology G: **Prognostic**

- utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis.** *Crit Care* 2012, **16**(4):R151.
269. Liaw PC, Fox-Robichaud AE, Liaw KL, McDonald E, Dwivedi DJ, Zamir NM, Pepler L, Gould TJ, Xu M, Zytaruk N *et al*: **Mortality Risk Profiles for Sepsis: A Novel Longitudinal and Multivariable Approach.** *Crit Care Explor* 2019, **1**(8):e0032.
270. Jackson Chornenki NL, Dwivedi DJ, Kwong AC, Zamir N, Fox-Robichaud AE, Liaw PC: **Identification of hemostatic markers that define the pre-DIC state: A multi-center observational study.** *J Thromb Haemost* 2020, **18**(10):2524-2531.
271. Lee KH, Cavanaugh L, Leung H, Yan F, Ahmadi Z, Chong BH, Passam F: **Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis.** *Int J Lab Hematol* 2018, **40**(4):392-399.
272. McDonald B, Davis RP, Kim SJ, Tse M, Esmon CT, Kolaczkowska E, Jenne CN: **Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice.** *Blood* 2017, **129**(10):1357-1367.
273. van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, Middeldorp S, Meijers JC, Zeerleder S: **Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, **33**(1):147-151.
274. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, Myers DD, Jr., Wagner DD, Wakefield TW: **Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis.** *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 2013, **1**(4):341-348.e341.
275. Oklu R, Albadawi H, Watkins MT, Monestier M, Sillesen M, Wicky S: **Detection of extracellular genomic DNA scaffold in human thrombus: implications for the use of deoxyribonuclease enzymes in thrombolysis.** *J Vasc Interv Radiol* 2012, **23**(5):712-718.
276. Oklu R, Sheth RA, Wong KHK, Jahromi AH, Albadawi H: **Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis.** *Cardiovasc Diagn Ther* 2017, **7**(Suppl 3):S140-S149.
277. Seo JD, Gu JY, Jung HS, Kim YJ, Kim HK: **Contact System Activation and Neutrophil Extracellular Trap Markers: Risk Factors for Portal Vein Thrombosis in Patients With Hepatocellular Carcinoma.** *Clin Appl Thromb Hemost* 2019, **25**:1076029618825310.
278. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS: **Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease.** *Blood* 2014, **123**(24):3818-3827.
279. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M *et al*: **Netting neutrophils induce endothelial damage,**

infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011, **187**(1):538-552.

280. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V *et al*: **Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus.** *Sci Transl Med* 2011, **3**(73):73ra19.
281. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A: **Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(21):9813-9818.
282. Leffler J, Gullstrand B, Jonsen A, Nilsson JA, Martin M, Blom AM, Bengtsson AA: **Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther* 2013, **15**(4):R84.
283. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Nunez-Alvarez C, Hernandez-Ramirez D, Bockenstedt PL, Liaw PC, Cabral AR *et al*: **Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome.** *Arthritis Rheumatol* 2015, **67**(11):2990-3003.
284. Leffler J, Stojanovich L, Shoenfeld Y, Bogdanovic G, Hesselstrand R, Blom AM: **Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome.** *Clin Exp Rheumatol* 2014, **32**(1):66-70.
285. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V *et al*: **NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.** *Sci Transl Med* 2013, **5**(178):178ra140.
286. Chung WS, Peng CL, Lin CL, Chang YJ, Chen YF, Chiang JY, Sung FC, Kao CH: **Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(10):1774-1780.
287. Cao M, Yu M, Zhang Y, Tong D, Guo L, Wang C, Li T, Yang X, Zhang C, Kou J *et al*: **Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Inflammatory Responses and Thrombotic Tendency in Both a Murine Colitis Model and Patients with Inflammatory Bowel Disease.** *Blood* 2017, **130**(Supplement 1):994-994.
288. He Z, Si Y, Jiang T, Ma R, Zhang Y, Cao M, Li T, Yao Z, Zhao L, Fang S *et al*: **Phosphatidylserine exposure and neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity in patients with inflammatory bowel disease.** *Thromb Haemost* 2016, **115**(4):738-751.
289. Porto BN, Stein RT: **Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing?** *Front Immunol* 2016, **7**:311.

290. O'Sullivan BP, Freedman SD: **Cystic fibrosis**. *Lancet* 2009, **373**(9678):1891-1904.
291. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms**. *Cell Microbiol* 2006, **8**(4):668-676.
292. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F: **NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus***. *Microbes Infect* 2010, **12**(12-13):928-936.
293. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M *et al*: **A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus***. *J Immunol* 2010, **185**(12):7413-7425.
294. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latgé JP, Brakhage AA, Gunzer M: **Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA**. *PLoS Pathog* 2010, **6**(4):e1000873.
295. Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML *et al*: **Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR**. *PLoS One* 2011, **6**(9):e23637.
296. Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Hector A, Vitkov L, Wiedenbauer EM, Krautgartner WD, Stoiber W, Belohradsky BH *et al*: **CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation**. *Nat Med* 2010, **16**(9):1018-1023.
297. Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, Thiel S, Huebner J, Gadjeva M: **Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor**. *J Innate Immun* 2014, **6**(6):765-779.
298. Marcos V, Zhou-Suckow Z, Onder Yildirim A, Bohla A, Hector A, Vitkov L, Krautgartner WD, Stoiber W, Griese M, Eickelberg O *et al*: **Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction**. *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:408935.
299. Fuxman Bass JI, Russo DM, Gabelloni ML, Geffner JR, Giordano M, Catalano M, Zorreguieta A, Trevani AS: **Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**. *J Immunol* 2010, **184**(11):6386-6395.
300. Konstan MW, Wagener JS, Pasta DJ, Millar SJ, Jacobs JR, Yegin A, Morgan WJ: **Clinical use of dornase alpha is associated with a slower rate of FEV1 decline in cystic fibrosis**. *Pediatr Pulmonol* 2011, **46**(6):545-553.

301. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME: **Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group.** *N Engl J Med* 1994, **331**(10):637-642.
302. Barnes PJ: **Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Chest Med* 2014, **35**(1):71-86.
303. Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L: **Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J Suppl* 2003, **46**:5s-13s.
304. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ: **Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease.** *Respirology* 2016, **21**(3):467-475.
305. Pedersen F, Marwitz S, Holz O, Kirsten A, Bahmer T, Waschki B, Magnussen H, Rabe KF, Goldmann T, Uddin M *et al*: **Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients.** *Respir Med* 2015, **109**(10):1360-1362.
306. Grabcanovic-Musija F, Obermayer A, Stoiber W, Krautgartner WD, Steinbacher P, Winterberg N, Bathke AC, Klappacher M, Studnicka M: **Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation.** *Respir Res* 2015, **16**:59.
307. Lambrecht BN, Hammad H: **The immunology of asthma.** *Nat Immunol* 2015, **16**(1):45-56.
308. Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S: **Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways.** *J Allergy Clin Immunol* 2011, **127**(5):1260-1266.
309. Deckers J, Branco Madeira F, Hammad H: **Innate immune cells in asthma.** *Trends Immunol* 2013, **34**(11):540-547.
310. Haldar P, Pavord ID: **Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **119**(5):1043-1052; quiz 1053-1044.
311. Holgate ST: **Trials and tribulations in identifying new biologic treatments for asthma.** *Trends Immunol* 2012, **33**(5):238-246.
312. da Cunha AA, Nunez NK, de Souza RG, Moraes Vargas MH, Silveira JS, Antunes GL, Durante Lda S, Porto BN, Marczak ES, Jones MH *et al*: **Recombinant human deoxyribonuclease therapy improves airway resistance and reduces DNA extracellular traps in a murine acute asthma model.** *Exp Lung Res* 2016, **42**(2):66-74.

313. da Cunha AA, Nunez NK, de Souza RG, Vargas MH, Silveira JS, Antunes GL, Schmitz F, de Souza Wyse AT, Jones MH, Pitrez PM: **Recombinant human deoxyribonuclease attenuates oxidative stress in a model of eosinophilic pulmonary response in mice.** *Mol Cell Biochem* 2016, **413**(1-2):47-55.
314. Moorthy AN, Rai P, Jiao H, Wang S, Tan KB, Qin L, Watanabe H, Zhang Y, Teluguakula N, Chow VT: **Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during in vivo pathogenesis of pneumonia.** *Oncotarget* 2016, **7**(15):19327-19340.
315. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B: **An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps.** *Curr Biol* 2006, **16**(4):401-407.
316. Juneau RA, Pang B, Armbruster CE, Murrah KA, Perez AC, Swords WE: **Peroxiredoxin-glutaredoxin and catalase promote resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* 86-028NP to oxidants and survival within neutrophil extracellular traps.** *Infect Immun* 2015, **83**(1):239-246.
317. Hong W, Juneau RA, Pang B, Swords WE: **Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media.** *J Innate Immun* 2009, **1**(3):215-224.
318. Hamaguchi S, Seki M, Yamamoto N, Hirose T, Matsumoto N, Irisawa T, Takegawa R, Shimazu T, Tomono K: **Case of invasive nontypable *Haemophilus influenzae* respiratory tract infection with a large quantity of neutrophil extracellular traps in sputum.** *J Inflamm Res* 2012, **5**:137-140.
319. Corleis B, Korbel D, Wilson R, Bylund J, Chee R, Schaible UE: **Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils.** *Cell Microbiol* 2012, **14**(7):1109-1121.
320. Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muniz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, Chacon-Salinas R, Estrada-Parra S, Estrada-Garcia I: **Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*.** *Tuberculosis (Edinb)* 2009, **89**(1):29-37.
321. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, Phoon MC, van Rooijen N, Chow VT: **Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis.** *Am J Pathol* 2011, **179**(1):199-210.
322. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, Cifuni SM, Fuchs TA, von Andrian UH, Hartwig JH *et al*: **Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice.** *Blood* 2012, **119**(26):6335-6343.

323. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR: **Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury.** *J Clin Invest* 2012, **122**(7):2661-2671.
324. Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA: **Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury.** *J Clin Invest* 2009, **119**(11):3450-3461.
325. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, Chen Z, Hao Y, Wang B, Han J *et al*: **High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection.** *J Infect Dis* 2018, **217**(3):428-437.
326. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Döring Y, Weber C, Soehnlein O, Zarbock A: **Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation.** *Blood* 2014, **123**(16):2573-2584.
327. Imai Y, Kawano T, Iwamoto S, Nakagawa S, Takata M, Miyasaka K: **Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits.** *J Appl Physiol (1985)* 1999, **87**(2):510-515.
328. Doyle NA, Bhagwan SD, Meek BB, Kutkoski GJ, Steeber DA, Tedder TF, Doerschuk CM: **Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice.** *J Clin Invest* 1997, **99**(3):526-533.
329. Choudhury S, Wilson MR, Goddard ME, O'Dea KP, Takata M: **Mechanisms of early pulmonary neutrophil sequestration in ventilator-induced lung injury in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**(5):L902-910.
330. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS: **Mechanical ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines.** *J Pediatr* 2010, **156**(1):16-19.
331. Bose CL, Laughon MM, Allred EN, O'Shea TM, Van Marter LJ, Ehrenkranz RA, Fichorova RN, Leviton A: **Systemic inflammation associated with mechanical ventilation among extremely preterm infants.** *Cytokine* 2013, **61**(1):315-322.
332. Yildiz C, Palaniyar N, Otulakowski G, Khan MA, Post M, Kuebler WM, Tanswell K, Belcastro R, Masood A, Engelberts D *et al*: **Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation.** *Anesthesiology* 2015, **122**(4):864-875.
333. Moore JB, June CH: **Cytokine release syndrome in severe COVID-19.** *Science* 2020, **368**(6490):473-474.
334. Li X, Liu C, Mao Z, Xiao M, Wang L, Qi S, Zhou F: **Predictive values of neutrophil-to-lymphocyte ratio on disease severity and mortality in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis.** *Crit Care* 2020, **24**(1):647.

335. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, Blair C, Weber A, Barnes BJ, Egeblad M *et al*: **Neutrophil extracellular traps in COVID-19**. *JCI Insight* 2020, **5**(11).
336. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, Schneider AH, Caetite D, Tavares LA, Paiva IM *et al*: **SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology**. *J Exp Med* 2020, **217**(12):e20201129.
337. Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, Mostyka M, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk AC, Loda M *et al*: **Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome**. *Blood* 2020, **136**(10):1169-1179.
338. Ng H, Havervall S, Rosell A, Aguilera K, Parv K, von Meijenfeldt FA, Lisman T, Mackman N, Thalín C, Phillipson M: **Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021, **41**(2):988-994.
339. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, Sturzl M, Staats L, Mahajan A, Schauer C *et al*: **Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19**. *EBioMedicine* 2020, **58**:102925.
340. Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, Cavalier E, Henket M, d'Emal C, Vanwinge C, Cataldo D, Oury C, Delvenne P *et al*: **Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19**. *J Exp Med* 2020, **217**(12).
341. Obermayer A, Jakob LM, Haslbauer JD, Matter MS, Tzankov A, Stoiber W: **Neutrophil Extracellular Traps in Fatal COVID-19-Associated Lung Injury**. *Dis Markers* 2021, **2021**:5566826.
342. Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, Gockman K, Madison JA, Shi H, Woodard W, Lezak SP, Lugogo NL, Knight JS *et al*: **Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19**. *J Thromb Thrombolysis* 2021, **51**(2):446-453.
343. Weber AG, Chau AS, Egeblad M, Barnes BJ, Janowitz T: **Nebulized in-line endotracheal dornase alfa and albuterol administered to mechanically ventilated COVID-19 patients: a case series**. *Mol Med* 2020, **26**(1):91.
344. Okur HK, Yalcin K, Tastan C, Demir S, Yurtsever B, Karakus GS, Kancagi DD, Abanuz S, Seyis U, Zengin R *et al*: **Preliminary report of in vitro and in vivo effectiveness of dornase alfa on SARS-CoV-2 infection**. *New Microbes New Infect* 2020, **37**:100756.
345. Holliday ZM, Earhart AP, Alnijoumi MM, Krvavac A, Allen LH, Schrum AG: **Non-Randomized Trial of Dornase Alfa for Acute Respiratory Distress Syndrome Secondary to Covid-19**. *Front Immunol* 2021, **12**:714833.

346. Albadawi H, Oklu R, Raacke Malley RE, O'Keefe RM, Uong TP, Cormier NR, Watkins MT: **Effect of DNase I treatment and neutrophil depletion on acute limb ischemia-reperfusion injury in mice.** *J Vasc Surg* 2016, **64**(2):484-493.
347. Knight SR, Thorne A, Lo Faro ML: **Donor-specific Cell-free DNA as a Biomarker in Solid Organ Transplantation. A Systematic Review.** *Transplantation* 2019, **103**(2):273-283.
348. Raup-Konsavage WM, Wang Y, Wang WW, Feliers D, Ruan H, Reeves WB: **Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury.** *Kidney Int* 2018, **93**(2):365-374.
349. Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, Desai J, Holderied A, Rath L, Kraft F, Lei Y, Fukasawa Y, Moeckel GW *et al*: **Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI.** *J Am Soc Nephrol* 2017, **28**(6):1753-1768.
350. von Meijenfeldt FA, Burlage LC, Bos S, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T: **Elevated Plasma Levels of Cell-Free DNA During Liver Transplantation Are Associated With Activation of Coagulation.** *Liver Transpl* 2018, **24**(12):1716-1725.
351. Yazdani HO, Chen HW, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, Rosborough BR, Sud V, Beer-Stolz D, Turnquist HR *et al*: **IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation.** *J Hepatol* 2017.
352. Liu Y, Qin X, Lei Z, Chai H, Huang Z, Wu Z: **Tetramethylpyrazine inhibits neutrophil extracellular traps formation and alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation.** *Exp Cell Res* 2021, **406**(1):112719.
353. Ge L, Zhou X, Ji WJ, Lu RY, Zhang Y, Zhang YD, Ma YQ, Zhao JH, Li YM: **Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015, **308**(5):H500-509.
354. Wang S, Xie T, Sun S, Wang K, Liu B, Wu X, Ding W: **DNase-1 Treatment Exerts Protective Effects in a Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury.** *Sci Rep* 2018, **8**(1):17788.
355. Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, Jimenez-Alcazar M, Klinke M, Vincent D, Tiemann B, Bergholz R, Reinshagen K, Fuchs TA: **Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):15377.
356. Mallavia B, Liu F, Lefrançois E, Cleary SJ, Kwaan N, Tian JJ, Magnen M, Sayah DM, Soong A, Chen J *et al*: **Mitochondrial DNA Stimulates TLR9-Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation in Primary Graft Dysfunction.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020, **62**(3):364-372.

357. Scozzi D, Wang X, Liao F, Liu Z, Zhu J, Pugh K, Ibrahim M, Hsiao HM, Miller MJ, Yizhan G *et al*: **Neutrophil extracellular trap fragments stimulate innate immune responses that prevent lung transplant tolerance.** *Am J Transplant* 2019, **19**(4):1011-1023.
358. Caldarone L, Mariscal A, Sage A, Khan M, Juvet S, Martinu T, Zamel R, Cypel M, Liu M, Palaniyar N *et al*: **Neutrophil extracellular traps in ex vivo lung perfusion perfusate predict the clinical outcome of lung transplant recipients.** *Eur Respir J* 2019, **53**(4).
359. Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA: **Human deoxyribonucleases.** *Biochemistry (Mosc)* 2004, **69**(6):587-601.
360. Riley DE: **Deoxyribonuclease I generates single-stranded gaps in chromatin deoxyribonucleic acid.** *Biochemistry* 1980, **19**(13):2977-2992.
361. Shiokawa D, Tanuma S: **Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis.** *Biochemistry* 2001, **40**(1):143-152.
362. Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, Nakajima T, Nakashima Y, Mori S, Hoshino T, Kishi K: **Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **269**(2):481-484.
363. Nadano D, Yasuda T, Kishi K: **Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method.** *Clin Chem* 1993, **39**(3):448-452.
364. Gibson UE, Chen AB, Baker DL, Sinicropi DV: **An antibody capture bioassay (ACB) for DNase in human serum samples.** *J Immunol Methods* 1992, **155**(2):249-256.
365. Love JD, Hewitt RR: **The relationship between human serum and human pancreatic DNase I.** *J Biol Chem* 1979, **254**(24):12588-12594.
366. Funakoshi A, Wakasugi H, Ibayashi H: **Clinical investigation of serum deoxyribonuclease: II. Clinical studies of serum deoxyribonuclease activity in pancreatic disease.** *Gastroenterol Jpn* 1979, **14**(5):436-440.
367. Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Yasuda T, Kishi K, Suzuki S: **Detection of deoxyribonuclease I along the secretory pathway in Paneth cells of human small intestine.** *J Histochem Cytochem* 1998, **46**(7):833-840.
368. Basso D, Piera Panozzo M, Fabris C, Meggiato T, Fogar P, Del Favero G, Scalon P, Meani A, Faggian D, Plebani M *et al*: **Deoxyribonuclease I serum activity in pancreatic cancer.** *Bull Cancer* 1990, **77**(4):385-387.
369. Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM: **Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus.** *Rheumatol Int* 1981, **1**(2):55-60.

370. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y: **Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus.** *Nat Genet* 2001, **28**(4):313-314.
371. Zhang S, Shu X, Tian X, Chen F, Lu X, Wang G: **Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: a potential contributor to interstitial lung disease complications.** *Clin Exp Immunol* 2014, **177**(1):134-141.
372. Lauková L, Konečná B, Bábíčková J, Wagnerová A, Melišková V, Vlková B, Celec P: **Exogenous deoxyribonuclease has a protective effect in a mouse model of sepsis.** *Biomed Pharmacother* 2017, **93**:8-16.
373. Leal AC, Mizurini DM, Gomes T, Rochael NC, Saraiva EM, Dias MS, Werneck CC, Sielski MS, Vicente CP, Monteiro RQ: **Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):6438.
374. Hisada Y, Grover SP, Maqsood A, Houston R, Ay C, Noubouossie DF, Cooley BC, Wallén H, Key NS, Thålin C *et al*: **Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice bearing human pancreatic tumors.** *Haematologica* 2020, **105**(1):218-225.
375. Vogel B, Shinagawa H, Hofmann U, Ertl G, Frantz S: **Acute DNase1 treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin.** *Basic Res Cardiol* 2015, **110**(2):15.
376. Yang C, Montgomery M: **Dornase alfa for cystic fibrosis.** *Cochrane Database Syst Rev* 2018, **9**(9):Cd001127.
377. Nasr SZ, Strouse PJ, Soskolne E, Maxvold NJ, Garver KA, Rubin BK, Moler FW: **Efficacy of recombinant human deoxyribonuclease I in the hospital management of respiratory syncytial virus bronchiolitis.** *Chest* 2001, **120**(1):203-208.
378. Merkus PJ, de Hoog M, van Gent R, de Jongste JC: **DNase treatment for atelectasis in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis.** *Eur Respir J* 2001, **18**(4):734-737.
379. Ozturk E, Tanidir IC, Haydin S, Onan IS, Odemis E, Bakir I: **The use of dornase alpha for post-operative pulmonary atelectasis after congenital heart surgery.** *Cardiol Young* 2014, **24**(5):807-812.
380. Silverman RA, Foley F, Dalipi R, Kline M, Lesser M: **The use of rhDNase in severely ill, non-intubated adult asthmatics refractory to bronchodilators: a pilot study.** *Respir Med* 2012, **106**(8):1096-1102.

381. Wills PJ, Wodehouse T, Corkery K, Mallon K, Wilson R, Cole PJ: **Short-term recombinant human DNase in bronchiectasis. Effect on clinical state and in vitro sputum transportability.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**(2 Pt 1):413-417.
382. O'Donnell AE, Barker AF, Ilowite JS, Fick RB: **Treatment of idiopathic bronchiectasis with aerosolized recombinant human DNase I. rhDNase Study Group.** *Chest* 1998, **113**(5):1329-1334.
383. Davis JC, Jr., Manzi S, Yarboro C, Rairie J, McInnes I, Averbheli D, Sinicropi D, Hale VG, Balow J, Austin H *et al*: **Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis.** *Lupus* 1999, **8**(1):68-76.
384. Genentech: **Pulmozyme (dornase alpha) Inhalation Solution.** In. Genentech Investig Broc; 2018: 1-49.
385. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, Sapey E, Lord JM: **Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals.** *Aging Cell* 2014, **13**(4):690-698.
386. Grassle S, Huck V, Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Aponte-Santamaria C, Baldauf C, Grater F, Schneppenheim R, Obser T, Schneider SW: **von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, **34**(7):1382-1389.
387. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BG, Thanabalasuriar A, Lee WY, Sanz MJ, Mowen K, Opdenakker G, Kubes P: **Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature.** *Nat Commun* 2015, **6**:6673.
388. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, Neagoe PE, White M, Sirois MG: **Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiopoietin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities.** *J Immunol* 2018, **200**(11):3801-3813.
389. Wong SL, Wagner DD: **Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging.** *FASEB J* 2018, **32**(12):fj201800691R.
390. Liang Y, Pan B, Alam HB, Deng Q, Wang Y, Chen E, Liu B, Tian Y, Williams AM, Duan X *et al*: **Inhibition of peptidylarginine deiminase alleviates LPS-induced pulmonary dysfunction and improves survival in a mouse model of lethal endotoxemia.** *Eur J Pharmacol* 2018, **833**:432-440.
391. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S: **Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins.** *Am J Physiol* 1998, **275**(2):H385-392.

392. Meegan JE, Yang X, Beard RS, Jr., Jannaway M, Chatterjee V, Taylor-Clark TE, Yuan SY: **Citrullinated histone 3 causes endothelial barrier dysfunction.** *Biochem Biophys Res Commun* 2018, **503**(3):1498-1502.
393. Liersch-Nordqvist A, Fakhro M, Pierre L, Hlebowicz J, Malmsjo M, Ingemansson R, Lindstedt S: **The impact of alteplase on pulmonary graft function in donation after circulatory death - An experimental study.** *Ann Med Surg (Lond)* 2017, **22**:1-6.
394. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Bourdeau F, Kubes P, Ferri L: **Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis.** *J Clin Invest* 2013.
395. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, Wang Y, Simmons RL, Huang H, Tsung A: **Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress.** *Cancer Res* 2016, **76**(6):1367-1380.
396. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT: **Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones.** *PLoS One* 2012, **7**(2):e32366.
397. Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, Tai S, Loughran P, Chen L, Wang S, Kim J, Billiar T, Wang Y *et al*: **Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury.** *Hepatology* 2015, **62**(2):600-614.
398. Peer V, Abu Hamad R, Berman S, Efrati S: **Renoprotective Effects of DNase-I Treatment in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury.** *Am J Nephrol* 2016, **43**(3):195-205.
399. Jimenez-Alcazar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, Bilyy R, Krenn V, Renne C, Renne T *et al*: **Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps.** *Science* 2017, **358**(6367):1202-1206.
400. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamoorthy K: **High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation.** *FEBS Lett* 2013, **587**(14):2241-2246.
401. Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB, Ross JA: **Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes.** *Am J Physiol* 1997, **273**(4):E720-726.
402. Szalai AJ, van Ginkel FW, Dalrymple SA, Murray R, McGhee JR, Volanakis JE: **Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice.** *J Immunol* 1998, **160**(11):5294-5299.

403. Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, Salas E, Riancho JA, Lopez-Cordovilla JJ, Garcia-Unzueta MT: **Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants.** *Metabolism* 1995, **44**(6):812-816.
404. Venkateswaran RV, Dronavalli V, Lambert PA, Steeds RP, Wilson IC, Thompson RD, Mascaro JG, Bonser RS: **The proinflammatory environment in potential heart and lung donors: prevalence and impact of donor management and hormonal therapy.** *Transplantation* 2009, **88**(4):582-588.
405. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL *et al*: **Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association.** *Circulation* 2003, **107**(3):499-511.
406. Helal I, Zerelli L, Krid M, ElYounsi F, Ben Maiz H, Zouari B, Adelmoula J, Kheder A: **Comparison of C-reactive protein and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients on hemodialysis.** *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2012, **23**(3):477-483.
407. Sabatine MS, Morrow DA, Jablonski KA, Rice MM, Warnica JW, Domanski MJ, Hsia J, Gersh BJ, Rifai N, Ridker PM *et al*: **Prognostic significance of the Centers for Disease Control/American Heart Association high-sensitivity C-reactive protein cut points for cardiovascular and other outcomes in patients with stable coronary artery disease.** *Circulation* 2007, **115**(12):1528-1536.
408. Clyne B, Olshaker JS: **The C-reactive protein.** *J Emerg Med* 1999, **17**(6):1019-1025.
409. Cucchiari D, Rovira J, Paredes D, Ventura-Aguilar P, Sanchez-Escuredo A, Sole M, Adalia R, Oppenheimer F, Diekmann F, Revuelta I: **Association of Brain-Dead Donors' Terminal Inflammation With Delayed Graft Function in Kidney Transplant Recipients.** *Transplant Proc* 2017, **49**(10):2260-2264.
410. Wozniak A, Betts WH, Murphy GA, Rokicinski M: **Interleukin-8 primes human neutrophils for enhanced superoxide anion production.** *Immunology* 1993, **79**(4):608-615.
411. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N: **Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury.** *Circulation* 2009, **120**(20):2012-2024.
412. Beaubien-Souligny W, Neagoe PE, Gagnon D, Denault AY, Sirois MG: **Increased Circulating Levels of Neutrophil Extracellular Traps During Cardiopulmonary Bypass.** *CJC Open* 2020, **2**(2):39-48.
413. Aigner C, Slama A, Barta M, Mitterbauer A, Lang G, Taghavi S, Matilla J, Ullrich R, Krenn K, Jaksch P *et al*: **Treatment of primary graft dysfunction after lung transplantation with orally inhaled AP301: A prospective, randomized pilot study.** *J Heart Lung Transplant* 2017(17):S1053-2498.

414. Oto T, Levvey BJ, Snell GI: **Potential refinements of the International Society for Heart and Lung Transplantation primary graft dysfunction grading system.** *J Heart Lung Transplant* 2007, **26**(5):431-436.
415. Sommer W, Tudorache I, Kuhn C, Avsar M, Salman J, Ius F, Gras C, Weber P, Welte T, Gottlieb J *et al*: **C1-esterase-inhibitor for primary graft dysfunction in lung transplantation.** *Transplantation* 2014, **97**(11):1185-1191.
416. Ray M, Dharmarajan S, Freudenberg J, Zhang W, Patterson GA: **Expression profiling of human donor lungs to understand primary graft dysfunction after lung transplantation.** *Am J Transplant* 2007, **7**(10):2396-2405.
417. Kreisel D, Sugimoto S, Tietjens J, Zhu J, Yamamoto S, Krupnick AS, Carmody RJ, Gelman AE: **Bcl3 prevents acute inflammatory lung injury in mice by restraining emergency granulopoiesis.** *J Clin Invest* 2011, **121**(1):265-276.
418. Kreisel D, Goldstein DR: **Innate immunity and organ transplantation: focus on lung transplantation.** *Transpl Int* 2013, **26**(1):2-10.
419. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J: **Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome.** *Crit Care Med* 2013, **41**(3):820-832.
420. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ, Kaplan MJ: **A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs.** *J Immunol* 2010, **184**(6):3284-3297.
421. Herteman N, Vargas A, Lavoie JP: **Characterization of Circulating Low-Density Neutrophils Intrinsic Properties in Healthy and Asthmatic Horses.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):7743.
422. Hong CW: **Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity.** *Immune Netw* 2017, **17**(5):298-306.
423. Mai SH, Khan M, Dwivedi DJ, Ross CA, Zhou J, Gould TJ, Gross PL, Weitz JI, Fox-Robichaud AE, Liaw PC *et al*: **Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis.** *Shock* 2015, **44**(2):166-172.
424. Sohrabipour S, Muniz VS, Sharma N, Dwivedi DJ, Liaw PC: **Mechanistic Studies of Dnase I Activity: Impact of Heparin Variants and PAD4.** *Shock* 2021, **56**(6):975-987.

