

Université de Montréal

**Rôle des eicosanoïdes post-greffe;
implication dans la bronchiolite oblitérante.**

par
Stanislaw Ptaszynski
Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Février 2010

© Stanislaw Ptaszynski, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Rôle des eicosanoïdes post-greffe;
implication dans la bronchiolite oblitérante.**

présenté par :
Stanislaw Ptaszynski

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Thibodeau
président-rapporteur

Dre Céline Bergeron
directrice de recherche

Dre Emmanuelle Brochiero
membre du jury

Résumé

Le rejet chronique se manifeste dans le poumon par la bronchiolite oblitérante (BO), une pathologie inflammatoire et fibrotique menant à l'oblitération des bronchioles. L'étiologie exacte de cette maladie demeure inconnue. Certaines études suggèrent qu'un déséquilibre des leucotriènes (LT) sur les prostaglandines (PG) favorise la fibrose pulmonaire. Les taux des LT et des PG dans le poumon humain post-transplantation sont inconnus. Nous proposons qu'un déséquilibre de cystéinyl leucotriènes (CysLT) sur la PGE2 existe dans le poumon transplanté et pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la BO. Aussi, les leucotriènes contribueraient à la fibrose par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons déterminé les taux de CysLT et de PGE2 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) provenant de poumons transplantés chez l'homme ainsi que leurs corrélations cliniques. Nous avons également déterminé la capacité des CysLT à induire l'expression des marqueurs de la TEM *in vitro*. Nous avons découvert des taux de CysLT et PGE2 supérieurs à la normale dans les LBA des greffés. Un pic prédominant de CysLT sur PGE2 est observée à 52 semaines post-greffe et deux facteurs de risque de la BO, les infections au CMV et à l'*Aspergillus*, sont associés au ratio $\text{CysLT/PGE2} > 1$. *In vitro*, les CysLT induisent une répression des marqueurs épithéliaux mais n'induisent pas l'expression de marqueurs mésenchymateux chez les cellules épithéliales bronchiolaires.

Mots clés : cystéinyl leucotriènes, prostaglandines, greffe pulmonaire, rejet chronique, transition épithélio-mésenchymateuse

Summary

Chronic rejection occurs, in the lung, in the form of bronchiolitis obliterans (BO), an inflammatory and fibroproliferative disease that leads to the obliteration of the bronchioles. A concept of the pathogenesis of BO has been suggested and several risk factors are associated to it, however, the exact etiology of this disease remains unknown. Studies have suggested that an imbalance of leukotrienes (LT) over prostaglandins (PG) promotes pulmonary fibrosis. The levels of LT and PG in the human lung post-transplantation are unknown. We propose that an imbalance of cysteinyl leukotrienes (CysLT) on PGE2 exists in the transplanted lung and may be implicated in the pathogenesis of BO. We also suggest that leukotrienes contribute to fibrosis through epithelial-mesenchymal transition (EMT). In order to test these hypotheses, we have determined the levels of CysLTs and PGE2 in human transplanted lung bronchoalveolar lavage fluid (BALf) samples and their clinical correlations. We have also determined the capacity of CysLT to induce the expression of EMT markers *in vitro*. We found high average levels of CysLT and PGE2 in the BAL of transplant patients. A predominant peak of CysLT over PGE2 was observed at 52 weeks post-transplantation and two risk factors for BO, CMV infections and *Aspergillus* were associated with CysLT/PGE2 ratio > 1. According to our experimental parameters, CysLT can induce the repression of epithelial markers but do not induce the expression of mesenchymal markers *in vitro* in small airway epithelial cells.

Keywords: cysteinyl leukotrienes, prostaglandins, lung transplantation, chronic rejection, epithelial-mesenchymal transition

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Summary</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>ix</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xiii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xiv</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>xv</i>
Chapitre 1	1
Introduction	1
1.1 La transplantation pulmonaire.....	2
1.1.1 <i>Le rejet chronique du greffon pulmonaire</i>	4
1.1.2 <i>La bronchiolite oblitérante post greffe pulmonaire</i>	4
1.2 Les facteurs de risque associés au développement de la BO.....	6
1.2.1 <i>Facteurs de risque allodépendents</i>	7
1.2.2 <i>Facteurs de risque alloindépendents</i>	8
1.3 Mécanismes impliqués dans le développement du SBO.....	9
1.3.1 <i>Le processus inflammatoire</i>	11
1.3.2 <i>Le processus fibrotique</i>	14
1.4 Les études chez l'humain.....	16
1.5 Les modèles animaux.....	18
1.5.1 <i>Le modèle de transplantation trachéale hétérotopique</i>	18
1.5.2 <i>Les modèles de transplantations pulmonaires orthoptiques</i>	21
1.6 Les traitements du SBO.....	22
1.7 Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	24
1.8 Les Eicosanoïdes.....	26
1.8.1 <i>Leucotriènes</i>	30
1.8.2 <i>Prostaglandines</i>	33
1.9 Rationnelle.....	35
1.10 Hypothèse et objectifs.....	36
1.10.1 <i>Hypothèse de recherche</i>	36
1.10.2 <i>Objectifs</i>	36
Chapitre 2	37
La balance Cysteinyl-Leucotriènes/Prostaglandine E2 post transplantation pulmonaire	37
Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs.....	38
Résumé français.....	43
Abstract.....	43
Introduction.....	45
Methods.....	48
<i>Subjects</i>	48

<i>Bronchoscopy</i>	48
<i>BAL processing</i>	48
<i>PGEM assay</i>	49
<i>CysLT assay</i>	49
<i>Clinical data analysis</i>	49
<i>Statistical analysis</i>	50
Results	51
<i>Demographic characteristics of studied population</i>	51
<i>CysLT and PGE2 in BALf after lung transplantation</i>	51
<i>CysLT/PGE2 ratio in BALf after lung transplantation</i>	52
<i>Clinical correlations</i>	52
<i>Inflammatory pattern in BALf</i>	54
Discussion	55
Chapitre 3	77
Le rôle des CysLT dans la transition épithélio-mésenchymateuse <i>in vitro</i>	77
Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs	78
Résumé français	82
Introduction	82
Methods	83
<i>Cell culture</i>	83
<i>Detection of EMT at mRNA level by real-time PCR analysis</i>	83
<i>Detection of EMT at protein level by immunofluorescence</i>	83
<i>Statistical analysis</i>	84
Results	84
Discussion	89
References	90
Chapitre 4	93
Discussion	93
4.1 Déséquilibre d'eicosanoïdes dans le poumon greffé	95
4.2 Rôle des glucocorticostéroïdes dans le déséquilibre des eicosanoïdes.....	96
4.3 Associations avec les facteurs de risque du SBO et le temps post-greffe	97
4.3.1 <i>Association du déséquilibre d'eicosanoïdes avec l'infection au</i> <i>CMV</i>	98
4.3.2 <i>Association du déséquilibre d'eicosanoïdes avec la</i> <i>colonisation à l'Aspergillus</i>	99
4.4 Association à un profil inflammatoire	101
4.5 Rôle éventuel des antagonistes des CysLT dans le déséquilibre des eicosanoïdes.....	102
4.6 Le rôle des CysLT dans le processus de TEM <i>in vitro</i>	103
4.7 Limitations de l'étude	105
Chapitre 5	108
Conclusion	108

Liste des tableaux

Tableau I : Système de classification du syndrome de bronchiolite oblitérante..... p.6

Tableau II : Facteurs de risque associés au développement du syndrome de la bronchiolite oblitérantep. 9

Tableau III : Demographic characteristics of studied population..... p. 62

Tableau IV : Characteristics of the studied population according to CysLT/PGE2 ratio..... p. 63

Tableau V : Bronchoalveolar lavage fluid cellular profile according to CysLT/PGE2 ratio..... p. 66

Tableau VI : Bronchoalveolar lavage fluid cellular profile according to clinical conditions..... p. 65

Liste des figures

- Figure 1 :** Courbes de survie Kaplan-Meier selon le type de greffe pulmonaire chez l'adulte effectuée de Janvier 1994 à Juin 2007..... p. 3
- Figure 2 :** Concept général de la pathogénèse de la BO..... p.11
- Figure 3 :** Voies de biosynthèse des eicosanoïdes et leurs récepteurs..... p. 27
- Figure 4 :** Rôle de la balance des eicosanoïdes dans la régulation d'événements fibrotiques du poumon..... p. 29
- Figure 5 :** Eicosanoid levels post-transplantation.....p. 66
- Figure 6 :** CysLT/PGE2 ratio post-transplantation..... p. 67
- Figure 7 :** Kaplan–Meier representation of freedom from CMV infection according to CysLT/PGE2 ratio..... p. 68
- Figure 8 :** Kaplan–Meier representation of freedom from *Aspergillus* colonisation according to CysLT/PGE2 ratio..... p. 69
- Figure 9 :** Kaplan–Meier representation of freedom from chronic rejection according to CysLT/PGE2 ratio..... p. 70

- Figure 10** : Effect of LTD4 on collagen IA1 transcript expression in human small airway epithelial cells..... p. 86
- Figure 11** : Effect of LTD4 on alpha-smooth muscle actin transcript expression in human small airway epithelial cells..... p. 87
- Figure 12** : Effect of LTD4 on EMT protein markers expression..... p. 88
- Figure 13** : Mécanisme proposé pour l'implication de la balance CysLT/ PGE2 dans la pathogénèse de la BO..... p. 107

Liste des sigles et abréviations

5-HETE	Acide 5-hydroxyéicosatétraénoïque
5-HPETE	Acide 5-hydroperoxyéicosatétraénoïque
5-LO	5-lipoxygénase
AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AML	Actine musculaire lisse
ARNm	Acide ribonucléique messager
AZA	Azathioprine
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BO	Bronchiolite oblitérante
BTB	Biopsie trans-bronchiques
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
COX	Cyclooxygénases
cPLA2	Phospholipases A2 cytoplasmique
CysLT	Cystéinyl-leucotriène
CysLTR	Récepteur des cystéinyl-leucotriènes
CXCR2	<i>Interleukin 8 receptor, beta (IL8R8)</i>
DEMM	Débit expiratoire maximum médian
dmPGE2	Diméthyl-16,16 prostaglandine E2
ED	Antigène de différenciation murin

ELR+ CXC	Motif : acide glutamique-leucine-arginine-CXC
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLAP	<i>5-lipoxygenase-activating protein</i>
FK	Fibrose kystique
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
GvH	Maladie du greffon contre l'hôte
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factors</i>
IgG	Immunoglobine G
IL	Interleukine
IL13RA1	Récepteur de l'interleukine 13 alpha 1
ISHLT	<i>International society for heart and lung transplantation</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1 (CCL2)</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
MMF	Mofétilmycophénolate
MMP-9	Métalloprotéinase matricielle 9
mPGES	Prostaglandine E synthétase microsomale
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
Muc-1	<i>Mucin 1, cell surface associated</i>

NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PG	Prostaglandine
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RAG	<i>Recombination activating genes</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (CCL5)</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>
SBO	Syndrome de bronchiolite oblitérante
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SMAD3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
Sp.	<i>Species</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Lymphocyte <i>T helper</i> (T auxiliaire)
TIMP-1	Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle 1
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TX	Thromboxane
VEMS	Volume expiratoire maximal à une seconde

Dédicace

Je dédie ce mémoire à mon fils Tristan Ptaszynski, dont la naissance a coïncidé avec le début de la rédaction de cet ouvrage.

Tristan, ta naissance a été une source de joie inespérée, mais également l'inspiration et la motivation principale à la rédaction de ce mémoire. Sache, où que tu sois dans le cheminement de ta vie, que ton père t'aime.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Dr Céline Bergeron (M.D., M.Sc., F.R.C.P.) pour avoir cru en moi et m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet extrêmement intéressant.

J'aimerais également remercier tous les membres du laboratoire de Dr Bergeron; Areej, Sawsan, Amal, Elise et Annie, pour leur aide, leurs conseils et leur amitié. Merci les filles, c'est un véritable plaisir de vous côtoyer quotidiennement. J'aimerais également remercier les membres du laboratoire de Dr Yves Berthiaume et toute autre personne du Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu ayant participé à ma formation.

Je tiens particulièrement remercier Dr André Dagenais qui m'a appris plusieurs techniques de biologie moléculaire et autres techniques de base. Merci également André, pour tes précieux conseils et pour toutes les connaissances que tu m'as transmis, tu es une vraie encyclopédie vivante.

Finalement, j'aimerais remercier ma copine et mère de mon enfant, Estefania qui m'a énormément encouragé et a su endurer mes longues absences avec beaucoup d'équanimité.

Chapitre 1

Introduction

1.1 La transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire est aujourd'hui non seulement un traitement viable mais souvent la seule option thérapeutique pour les patients souffrant de maladies pulmonaires terminales telles que la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), la fibrose kystique (FK) ou la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Les premières greffes expérimentales de poumon chez l'humain, lors des années soixante, ont été des échecs¹. Il a fallu attendre le début des années quatre-vingt pour voir la première greffe pulmonaire humaine ayant un succès à long-terme. Ce premier succès est attribuable aux Drs Bruce Reitz et Norman Shumway, qui ont réalisé la première greffe cœur-poumon chez un être humain en 1981². Une vague de succès et d'innovations en transplantation pulmonaire a suivie avec un apport important de l'équipe de Joel Cooper. Cette équipe basée à l'hôpital général de Toronto a réalisé la première greffe pulmonaire simple en 1983 et quelques années plus tard, la première greffe pulmonaire double¹. Grâce à l'avancement des techniques chirurgicales et de préservation d'organes et à l'amélioration du régime immunosuppresseur, la survie à court et à moyen terme post greffe pulmonaire se rapproche aujourd'hui de 80%. Par contre, la survie à long terme post greffe pulmonaire se situe à 52% après cinq ans³. En effet, le progrès de la survie post greffe depuis 1988 est largement due a l'amélioration de la survie à 1 ans post greffe. La demi-vie globale d'une greffe pulmonaire a passée de 4,2 à 5,7 ans entre 1988 et 2007, tandis que la demi-vie de la greffe conditionnellement à une survie minimale d'un an s'est seulement améliorée de 7,0 à 7,6 ans. Parmi toutes les transplantations

d'organes solides, la transplantation pulmonaire présente le plus faible taux de survie à long terme, principalement en raison du développement du rejet chronique.

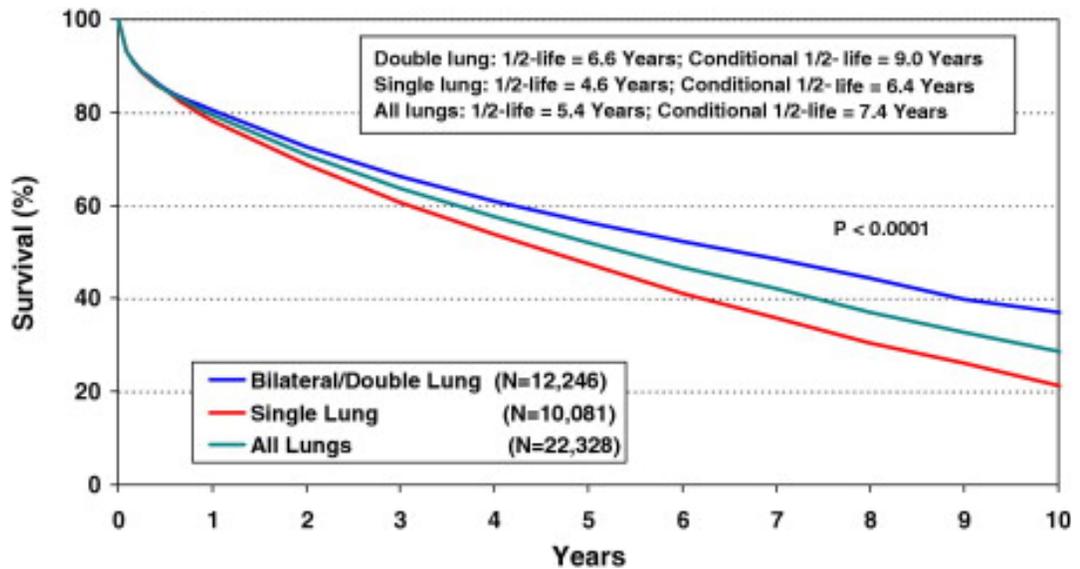


Figure 1. Courbes de survie Kaplan-Meier selon le type de greffe pulmonaire chez l'adulte effectuée de Janvier 1994 à Juin 2007. Les greffes unilatérales, bilatérales et l'ensemble de ces deux types de greffe sont présentés séparément. La demi-vie de la greffe et la demi-vie conditionnelle (temps de survie de 50% pour le sous-ensemble de receveurs qui étaient vivants à 1 an après la transplantation) sont présentés pour chaque type de greffe. J.D. Christie. 2009. J.Heart Lung Transplant. 28:1031-1049 © International Society for Heart and Lung Transplantation

1.1.1 Le rejet chronique du greffon pulmonaire

Le rejet chronique est la cause première de morbidité et de mortalité à long terme suite à une greffe de poumon ou une greffe cœur-poumon⁴. Le rejet chronique du greffon pulmonaire se traduit par une détérioration lente, progressive et irréversible de la fonction pulmonaire causée par une atteinte vasculaire ou une atteinte au niveau des bronchioles⁵. L'atteinte vasculaire, qui est la forme la moins fréquente et la moins morbide, est caractérisée par une athérosclérose de la vascularisation pulmonaire. L'atteinte au niveau des bronchioles se caractérise par une obstruction progressive des voies aériennes due à l'apparition de bronchiolite oblitérante.

1.1.2 La bronchiolite oblitérante post greffe pulmonaire

La manifestation histopathologique du rejet chronique pulmonaire observée au niveau des voies respiratoires est appelée bronchiolite oblitérante (BO) post-greffe pulmonaire. Il s'agit d'une pathologie inflammatoire et fibroproliférative menant ultimement de l'obstruction partielle à complète des bronchioles. L'histologie initiale dévoile une infiltration de cellules mononucléaires, majoritairement lymphocytaires, dans la sous-muqueuse (bronchiolite lymphocytaire) qui mène à des dommages épithéliaux et une ulcération de la muqueuse⁴. Un processus de réparation impliquant le recrutement et la prolifération de fibroblastes et de myofibroblastes dans la lumière bronchique est initié par la suite⁶. Cette fibroprolifération résulte en une cicatrisation

dense des régions ulcérées, riche en collagène et en éosinophiles et conduit à l'oblitération des voies respiratoires⁷.

L'hétérogénéité des lésions, surtout lors des phases précoces de la pathologie, rend le diagnostic histologique sur les biopsies transbronchiques (BTB) peu efficace dans la détection de la BO. En effet, les résultats d'études révèlent que les sensibilités de détection de la BO varient de 15% à 78%⁸. Pour cette raison en 1993, la Société Internationale de Transplantation Cardiaque et Pulmonaire (International Society for Heart and Lung Transplantation; ISHLT) a proposé une définition du Syndrome de Bronchiolite Oblitérante (SBO) basée sur un diagnostic clinique⁹. Le SBO est défini comme une baisse irréversible et soutenue (observable sur trois semaines ou plus) du volume expiratoire maximal à une seconde (VEMS) de base et qui ne peut être expliqué par d'autres facteurs tels que les infections, le rejet aigu, les sténoses ou par le vieillissement. Conjointement, un système de gradation de la sévérité de la pathologie a été proposé. Initialement ce système reposait uniquement sur le VEMS et définissait une réduction du VEMS de moins de 20% comme absence de SBO ou SBO 0; de 20% à 34% comme SBO 1; de 35% à 49% comme SBO 2 et 50% et plus de la perte de VEMS maximal comme un SBO 3. Or, ce système de gradation s'est avéré peu sensible pour déceler des changements minimes et précoces pouvant dévoiler un début de SBO. Le système de gradation a donc été révisé pour inclure le grade SBO 0-p, désignant un SBO potentiel et la baisse du débit expiratoire maximum médian (DEMM) a été ajoutée comme critère fonctionnel. Plusieurs études ont démontré que la DEMM se détériore avant le VEMS lors du développement du SBO¹⁰⁻¹².

Tableau I. Système de classification du syndrome de bronchiolite oblitérante

	Classification 1993	Classification 2002
SBO 0	Perte de $\leq 20\%$ du VEMS de base	Perte de $< 10\%$ du VEMS et 25% du DEMM de base
SBO 0-p		Perte de 10% à 19% du VEMS et/ou 25% du DEMM de base
SBO 1	Perte de 20% à 34% du VEMS de base	Perte de 20% à 34% du VEMS de base
SBO 2	Perte de 35% à 49% du VEMS de base	Perte de 35% à 49% du VEMS de base
SBO 3	Perte de $\geq 50\%$ du VEMS de base	Perte de $\geq 50\%$ du VEMS de base

La classification originale de 1993 a été révisée en 2002 pour inclure le grade SBO 0-p et le DEMM comme critère fonctionnel. VEMS : volume expiratoire maximal à une seconde, DEMM : débit expiratoire maximum médian. Ce tableau a été modifié à partir des lignes directrices de la Société Internationale de Transplantation Cardiaque et Pulmonaire.

1.2 Les facteurs de risque associés au développement de la BO

L'étiologie de la BO est encore inconnue mais plusieurs facteurs de risque y ont été associés. Ceux-ci peuvent être divisés en deux groupes, soient les facteurs allodépendants et alloindépendants. Les facteurs de risque allodépendants incluent les épisodes de rejet aigu, de bronchiolite lymphocytaire et l'histoincompatibilité HLA. Les facteurs de risque alloindépendants incluent les infections au cytomégalovirus (CMV), les autres infections respiratoires, le reflux gastro-œsophagien et les lésions d'ischémie-réperfusion. Tous ces événements peuvent provoquer des dommages épithéliaux sévères et induire ainsi un environnement inflammatoire qui pourrait déclencher et diriger une réponse alloimmune. En effet, les caractéristiques

histologiques de la pathologie suggèrent, comme cause primaire, un processus de réparation tissulaire anormal suite à un stress répété à l'épithélium bronchiolaire. Le degré d'implication de chacun de ces facteurs dans la pathologie de la BO demeure à élucider.

1.2.1 Facteurs de risque allodépendent

Un des principaux facteurs de risque dans le développement de la BO est le rejet aigu. La récurrence et la sévérité des épisodes de rejet aigu sont fortement associées avec le développement de la BO¹³. Par contre, certains patients ayant eu des épisodes de rejet aigu ne développent jamais la BO, tout comme plusieurs patients développent la BO sans avoir eu de rejet aigu¹⁴. Le rejet aigu est une atteinte vasculaire tandis que le rejet chronique se manifeste au niveau bronchiolaire. Récemment la recherche dans le domaine s'est donc tournée vers la bronchiolite lymphocytaire qui se manifeste au niveau des voies respiratoires et qui est, tout comme le rejet aigu, hautement liée au développement de la BO^{15;16}. L'histoincompatibilité HLA bien que débattue serait également un facteur influençant le développement de la BO^{6;17}. L'incompatibilité au niveau de différents gènes HLA, de classe I et II, a été étudiée pour une association avec le développement du SBO. Ces études ont rapportées des résultats mitigés. Il semble, cependant, exister une association entre l'incompatibilité au niveau de HLA-A et le développement du SBO^{18;19}.

1.2.2 Facteurs de risque alloindépendent

L'infection au CMV est un facteur de risque important pour le développement du SBO. Un grand nombre d'études se sont penchées sur le CMV comme facteur de risque dans le développement du SBO^{13;16;17;20;21}. Les résultats ont été variables dû notamment aux différences dans les définitions et les types d'analyses effectuées⁶. Une association entre la pneumopathie à CMV observée post greffe et le développement du SBO ou de la BO (selon la définition utilisée dans l'étude) a néanmoins été rapportée par plusieurs équipes^{13;16;20-23}. De plus, diverses études ont corrélé une baisse de l'incidence du SBO avec une baisse de l'incidence du CMV après l'introduction d'une prophylaxie au ganciclovir, un inhibiteur de réplication du CMV²⁴⁻²⁷. D'autres types d'infections virales, bactériennes ou fongiques ont également été signalées comme facteurs de risque dans le SBO. Des exemples de pathogènes pouvant possiblement augmenter le risque de développer le SBO sont l'Herpèsvirus humain 6 (virus de la roséole)²⁸, *Pseudomonas aeruginosa*^{29;30} et *Aspergillus* sp.³¹. La survie à long-terme post-greffe pulmonaire, en tenant compte de toutes les causes de décès dont le SBO, est plus faible lorsque le temps d'ischémie/réperfusion est plus long³². Un lien direct entre le développement du SBO et les lésions d'ischémie a également été signalé par certaines études^{33;34}. Le reflux gastro-oesophagien récurrent est un fardeau pour de nombreux receveurs de greffe pulmonaire, due notamment au traitement immunosuppresseur et possiblement aux blessures du nerf vague lors de la transplantation³⁵⁻³⁷. Certaines études ont proposé le reflux gastro-oesophagien comme un facteur de risque pour le développement du SBO^{37;38}. D'autre part, la fundoplicature, une intervention chirurgicale permettant de

traiter le reflux gastro-oesophagien, peut potentiellement ralentir le développement de la BO³⁹.

Tableau II. Facteurs de risque associés au développement du syndrome de la bronchiolite oblitérante.

Alloindépendants	Allodépendants
Ischémie-réperfusion	Rejet aigu
Reflux gastro-œsophagien	Bronchiolite lymphocytaire
Infections au cytomégalo virus	Histoincompatibilité HLA
Autres infections	

1.3 Mécanismes impliqués dans le développement du SBO

L'étiologie du SBO n'est pas définie à ce jour. Un concept général a par contre été formulé pour essayer d'expliquer l'origine et l'évolution de cette pathologie. La bronchiolite oblitérante serait expliquée par un processus de réparation anormal suite à un stress primaire, court et sévère ou répété et moins sévère, au niveau des voies respiratoires. Cette première agression, qu'il s'agisse de lésions d'ischémie-reperfusion, d'un rejet aigu, d'une infection virale ou autre, ou une combinaison de ces derniers, initierait un processus inflammatoire par les cellules structurales et leucocytaires retrouvées au niveau des tissus endommagés. Les dommages à l'épithélium et la présence de pathogènes dans le cas d'infections activent les mécanismes de l'immunité innée grâce aux TLR et autres récepteurs de

type « PRR » présents à la surface de différents leucocytes et des cellules épithéliales. L'activation de ces récepteurs stimule l'expression du CMH et déclenche ainsi l'immunité adaptative. L'atteinte à l'allogreffe se perpétuerait alors par une réponse alloimmune progressive dirigée par des mécanismes d'immunité adaptative. Un état inflammatoire chronique s'établi et amplifie le dommage à l'organe induisant des lésions épithéliales, de la nécrose et l'ulcération de la muqueuse. L'état inflammatoire initial est succédé par un processus de réparation tissulaire marqué par une fibroprolifération aberrante et excessive. La prolifération de cellules de muscle lisse, la transdifférentiation des fibroblastes en myofibroblastes, une vascularisation accrue et la déposition sous-épithéliale de collagène caractérisent ce processus fibroprolifératif, menant ultimement en une fibro-oblitération des bronchioles. Ce concept a été élaboré grâce à l'observation de l'évolution de la maladie et des facteurs de risque chez l'humain et supporté par l'étude des modèles animaux⁷.

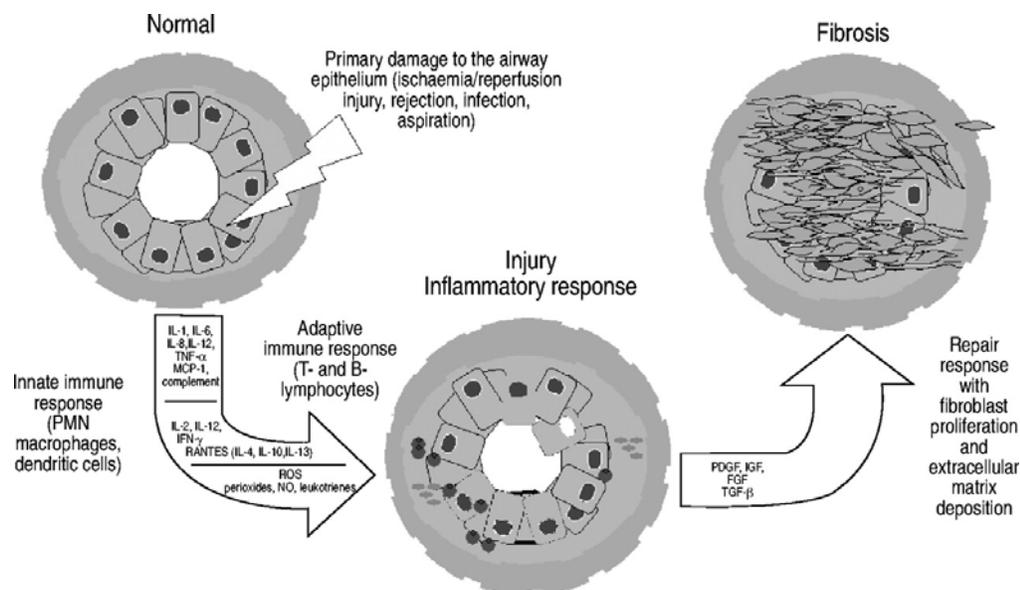


Figure 2. Concept général de la pathogénèse de la BO. Une agression primaire à l'allogreffe pulmonaire conduit à l'activation du système immunitaire inné, qui est suivit par l'activation du système immunitaire adaptatif. Les dommages et la perte de l'épithélium bronchiolaire amorcent des mécanismes de réparation aboutissant à la formation de cicatrices intrabronchiolaires. **A. Boehler, M. Estenne 2003.** Eur Respir J; 22: 1007–1018 © ERS Journals

1.3.1 *Le processus inflammatoire*

Le processus inflammatoire associé à la BO est déclenché par une agression primaire, de nature alloimmune ou non-alloimmune. Les réponses alloimmunes, telles que le rejet aigu et la bronchiolite lymphocytaire sont dirigées par la reconnaissance d'un antigène étranger par l'hôte en l'occurrence, l'allogreffe. Deux voies de reconnaissance des allo-antigènes existent; les reconnaissances directe et indirecte. Dans la voie de reconnaissance directe, les cellules T de l'hôte reconnaissent les molécules du CMH du donneur à la surface des cellules présentatrices d'antigènes du donneur provenant du greffon. Dans la voie de reconnaissance indirecte, les cellules

T de l'hôte reconnaissent les allo-antigènes apprêtés et présentés par des cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte qui ont infiltré le greffon⁴⁰. Ces deux voies sont capables de stimuler une réponse inflammatoire suffisante pour endommager sévèrement l'allogreffe en dépit du traitement immunosuppresseur. D'autre part, les atteintes d'origine non-alloimmune, telles que l'ischémie, l'acidité du reflux gastro-oesophagien ou les pathogènes, peuvent créer directement des dommages à l'allogreffe. Les dommages à l'épithélium bronchiolaire induits par les mécanismes alloimmuns et non-alloimmuns déclenchent un afflux massif de cellules inflammatoires dans les bronchioles, dirigé par des chimiokines (IL-8, RANTES, MCP-1) et produites par les cellules épithéliales, les cellules T activées, les macrophages et les cellules musculaires lisses⁴¹⁻⁴³. Les dommages initiaux induisent également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17, IL-13) qui vont à leur tour promouvoir une boucle de rétroaction positive perpétuant un état inflammatoire^{42;44}.

L'inflammation neutrophilique associée à des taux élevés d'IL-8 pulmonaire est une caractéristique couramment retrouvée chez les patients atteints de BO¹². Cette inflammation contribue à la destruction de l'épithélium bronchiolaire, entre autre, par l'action des dérivés réactifs d'oxygène, des métalloprotéinases et de l'élastase des neutrophiles^{45;46}. D'autres ligands du récepteur de l'IL-8 (CXCR2), ont également été impliqués dans la BO chez l'homme et dans un modèle murin d'allogreffe trachéale hétérotopique⁴⁷. Des taux élevés de chimiokines de la famille ELR+ CXC, chez les sujets diagnostiqués avec un SBO, étaient associés avec une neutrophilie et un profil angiogénique aberrant et l'importance de ces chimiokines

dans la pathogénèse de la BO a été confirmée dans un modèle murin CXCR2 $-/-$ ⁴⁷. L'origine de la neutrophilie dans la BO est par contre moins définie. En effet, plusieurs éléments peuvent contribuer à la présence de l'inflammation neutrophilique dans le poumon transplanté. Les infections bactériennes, fongiques et virales, qui constituent un fardeau récurrent pour plusieurs receveurs de greffe pulmonaire en raison de l'immunosuppression, induisent un état inflammatoire caractérisé par une importante infiltration de neutrophiles. Les infections sont également des facteurs de risque pour la BO et pourraient donc expliquer leur association avec la BO⁴⁶. L'aspiration d'acide gastrique dans le poumon pourrait induire une inflammation neutrophilique⁴⁸. La réponse immunitaire adaptative contre le greffon pourrait également contribuer au recrutement des neutrophiles dans le poumon. En effet, l'IL-17 produit par des lymphocytes activés dans le poumon peut stimuler la sécrétion d'IL-8 par plusieurs types de cellules pulmonaires et recruter ainsi des neutrophiles^{49;50}. Il est encore incertain si la neutrophilie est une caractéristique spécifique de la pathologie de la BO ou une manifestation associée aux infections récurrentes chez ces sujets. Il est néanmoins établi que la neutrophilie joue un rôle majeur dans l'évolution de la BO⁴⁶.

La réponse immunitaire de type Th1 est retrouvée dans le poumon très tôt post-greffe⁵¹. Elle est plutôt associée au rejet aigu et est caractérisée par la production des cytokines IL-2, IL-12 et INF- γ et de lymphotoxine^{52;53}. La réponse immunitaire de type Th1 contribue vraisemblablement au SBO par son rôle dans le rejet aigu, la bronchiolite lymphocytaire et les infections, qui créent l'état inflammatoire initial. Toutefois, c'est la réponse Th2 qui est associée au développement du SBO. En effet,

un faible taux d'IL-12 dans le LBA serait prédictif du SBO chez les transplantés du poumon⁵⁴, témoignant d'une suppression de la réponse Th1. La réponse immunitaire Th2 est identifiée par la production d'IL-4, IL-5, et IL-13 et est impliquée dans l'immunité mucoale, l'immunité humorale et les allergies. L'IL-13, une cytokine pro-inflammatoire Th2, ayant des propriétés pro-fibrotiques, est impliquée dans la pathologie de la BO. En effet, l'IL-13 est retrouvé en quantité élevées chez les sujets ayant le SBO et son implication dans la pathogénèse de la BO a été confirmée chez des souris KO pour le gène IL13RA1 codant pour le récepteur de l'IL-13^{44;55}. Le rejet aigu serait donc une tentative d'éliminer l'alloantigène par une réponse immune de type Th1, tandis que le rejet chronique constituerait plutôt une réponse de type Th2 et pourrait être interprété comme une tentative d'isoler l'alloantigène par la fibrose.

La réponse immunitaire de type Th17 est caractérisée par la production d'IL-17 et d'IL-23 et est associée à l'auto-immunité. IL-17 et IL-23 ont récemment été associés avec une autoimmunité contre le collagène de type V dans la pathologie de la BO^{49;56}. L'IL-17 est également capable d'induire la sécrétion de l'IL-8 par les cellules musculaires lisses et épithéliales et de participer ainsi à l'inflammation dans la BO^{50;57}.

1.3.2 *Le processus fibrotique*

L'état inflammatoire initial est suivi par un processus de réparation tissulaire marqué par une fibroprolifération excessive et aberrante. La prolifération des cellules de muscle lisse, la transdifférentiation des fibroblastes en myofibroblastes, la néo-

vascularisation et la déposition sous-épithéliale de collagène caractérisent ce processus fibroprolifératif, menant ultimement en une fibro-oblitération des bronchioles⁵. Différents médiateurs profibrotiques, tels que le PDGF, l'IGF et le TGF- β ont été trouvés à hautes concentrations dans les modèles animaux du SBO ainsi que chez l'humain⁵⁸⁻⁶². Les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs sont associés au développement des maladies fibrotiques du poumon^{63;64}. Des taux élevés de métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) ont été décrits au niveau du poumon chez les patients greffés, sans contrebalancement par son inhibiteur; l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle 1 (TIMP-1)⁶⁵. Donc, ce débalancement pourrait être expliqué comme une tentative inefficace de contrebalancer la production excessive des produits de la matrice extracellulaire au niveau du tissu pulmonaire. D'autre part, il pourrait également contribuer au processus fibrotique en déstabilisant l'intégrité de la membrane basale ou en clivant la forme latente du TGF- β ^{66;67}. Ces molécules et possiblement plusieurs autres pourraient être responsables de l'activation ou du recrutement des cellules mésenchymateuses dans la BO. La provenance exacte des cellules effectrices de la fibrose perçue dans la BO n'est pas complètement définie. Les sources connues des fibroblastes et myofibroblastes sont; le poumon lui-même (fibroblastes résidents), la dédifférenciation de cellules musculaires lisses en myofibroblastes, le recrutement et la différenciation à partir des fibrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses circulantes et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)^{68;69}.

1.4 Les études chez l'humain.

La BO a été principalement étudiée par observation de l'histologie pulmonaire et des profils cellulaires et moléculaires du poumon greffé humain. Les études chez l'humain sont généralement réalisées par analyse d'expectorations induites ou par analyse de biopsies et du LBA après examen bronchoscopique chez des sujets greffés. Le profil cellulaire du LBA des patients souffrant de BO démontre des taux élevés de neutrophiles et d'IL-8⁷⁰⁻⁷³. Sa concentration dans le liquide de LBA des patients SBO est directement corrélée avec la neutrophilie⁴¹. L'IL-8 est principalement produit par l'épithélium bronchique mais également par le muscle lisse et les macrophages alvéolaires^{74;75}. Des taux élevés de neutrophiles sont également retrouvés dans les expectorations induites⁷⁶ et dans les tissus pulmonaires⁷⁷ des patients atteints de BO. Toutefois, tel que mentionné précédemment, il n'est toujours pas clair s'il s'agit d'une caractéristique spécifique de la BO ou si la neutrophilie détectée ne reflète simplement qu'une infection concomitante des voies aériennes⁷⁸. L'infiltration neutrophilique est associée avec la production de dérivés réactifs d'oxygène et de métalloprotéinases qui participent aux dommages épithéliaux observés dans cette pathologie^{45;46}. Les études sur le LBA ont également décelé, tel que mentionné antérieurement, une augmentation des concentrations de MCP-1, de RANTES dans la BO chez l'humain.^{42;43} Des études ont également décelé une association entre la BO et l'élévation des éosinophiles dans le LBA^{42;62}. Les études sur les biopsies transbronchiques ont quant à elles révélée la présence accrue de cellules dendritiques et de macrophages chez les patients atteints de BO^{79;80}. Les cellules observées étaient majoritairement de type présentatrices d'antigènes,

identifiées par l'expression des molécules de classe II du CMH, tandis que la proportion de macrophages «suppresseurs» était faible⁷⁹. Il est probable que ces cellules activent des réponses immunitaires locales et systémiques qui contribuent au processus du rejet chronique. D'autre part, les analyses de biopsies transbronchiques prélevées chez les patients atteints de BO et de poumons complets provenant de retransplantations démontrent une expression accrue de molécules du CMH de classe II au niveau de l'épithélium et de l'endothélium^{81;82;82}. Des taux élevés d'anticorps anti-HLA circulants ont également été associés à la BO¹⁹. Il est intéressant de noter que la neutrophilie n'est pas observée dans les modèles animaux de la BO, où l'on observe plutôt une infiltration lymphocytaire. Chez l'humain l'infiltration lymphocytaire a également été associée à la BO mais de façon moins évidente. En effet, lorsque les populations lymphocytaires sont comparées entre les greffés stables et les sujets atteints du SBO, certains groupes ont démontrées une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+⁸², d'autre une expansion oligoclonale de lymphocytes T CD4+⁸³ et d'autres encore une augmentation de la sous-population CD8+ seulement^{84;85}. Le rôle exact des différentes sous-populations de lymphocytes dans le SBO reste à être déterminé.

Les études des LBA chez les greffés du poumon ont révélé des taux plus élevés de certains facteurs de croissance chez les sujets SBO, tels que le PDGF⁵⁸, l'IGF-1⁶¹, et le TGF- β ^{41;62}. Ces molécules ont des propriétés pro-fibrotiques et sont responsables d'une augmentation de l'activité proliférative des fibroblastes dans le surnageant BAL⁸⁶. Les myofibroblastes, des cellules effectrices de la fibrose par leur capacité augmentée à produire du collagène interstitiel, sont retrouvés chez les sujets

atteint du SBO⁵⁵. Le récepteur de l'IL-13 est exprimée sur les myofibroblastes, les cellules épithéliales et le muscle lisse chez les sujets atteint du SBO⁵⁵. Le LBA des sujets atteint du SBO contient de l'IL-13 biologiquement actif, associé à une surexpression de procollagène I et III⁴⁴. Récemment, le phénomène de TEM, qui sera défini en détail plus loin, a également été impliqué dans le processus fibrotique de la BO^{68;87}. Les études chez l'homme ont permis d'associer aux processus inflammatoires et fibrotiques du SBO différentes molécules et types cellulaires. Par contre les études chez l'homme ont un caractère plutôt descriptif et sont sujettes à un grand nombre de variables, environnementales ou génétiques.

1.5 Les modèles animaux

Plusieurs modèles animaux de la BO ont été développés pour mieux comprendre la physiopathologie de la BO. Parmi ceux-ci il existe un modèle de transplantation trachéale hétérotopique murin ainsi qu'un modèle de greffe pulmonaire allogénique chez le rat et le porc⁸⁸.

1.5.1 Le modèle de transplantation trachéale hétérotopique

Le modèle animal préconisé pour l'étude de la BO, utilisé dans plus de cent publications, est un modèle de transplantation trachéale hétérotopique murin⁸⁸. Dans ce modèle, une oblitération reproductible des voies aériennes transplantées, histologiquement indistinguable des lésions de la BO chez l'humain, est

systématiquement observée. Les travaux faits auprès de ce modèle ont illustré un processus pathologique en trois phases qui est reproductible temporellement. Tout d'abord, aux jours 2 ou 3, une phase ischémique marquée par une desquamation de l'épithélium respiratoire est observée au niveau de l'allogreffe⁸⁹. Cette première phase est également observable lors d'isogreffes, par contre celles-ci régénèrent complètement au bout de 7 jours tandis que les allogreffes évoluent vers une deuxième phase caractérisée par une infiltration lymphocytaire au jour 7⁸⁹. Entre les jours 7 et 21 une troisième phase est observée, lors de laquelle il y a une perte complète de l'épithélium et une oblitération fibreuse progressive de l'allogreffe⁸⁹. Il existe par contre plusieurs lacunes à ce modèle. La greffe trachéale évolue dans un contexte physiologique et immunologique très différent de celui de la transplantation pulmonaire chez l'humain. Tout d'abord la trachée greffée n'est plus une voie respiratoire fonctionnelle puisque qu'elle n'est pas exposée à l'air et aux pathogènes qui s'y retrouvent. Dans ce modèle, contrairement à la transplantation pulmonaire, l'organe n'est pas revascularisé chirurgicalement et subit des lésions d'ischémies sévères. Il existe également des différences histologiques évidentes entre la trachée et les bronchioles où la maladie est observée chez l'humain. La trachée est tapissée d'un épithélium cylindrique pseudostratifié cilié avec cellules caliciformes ainsi qu'une membrane basale épaisse contenant du cartilage. Les bronchioles sont plutôt tapissées d'un épithélium cuboïde simple non cilié qui ne contient plus de cellules caliciformes mais des cellules Clara et ne contient également plus de cartilage.

Ce modèle a néanmoins permis de mieux comprendre plusieurs aspects de la maladie et supporte largement l'implication d'une réponse alloimmune. En effet, les

isogreffes bien que subissant les mêmes dommages liés à la chirurgie et l'ischémie que l'allogreffe, ne développent jamais la pathologie. Les souris immunodéficientes SCID ou RAG -/- ne développent pas la pathologie⁹⁰ non plus et celle-ci peut également être atténuée avec l'immunosuppression⁴⁷. Les différents types cellulaires ainsi que les cytokines retrouvées dans la BO chez l'humain ont été confirmés par le modèle de transplantation trachéale hétérotopique. En effet, lorsque comparé aux isogreffes, les allogreffes trachéales, lors de la phase inflammatoire présentent un nombre élevé de cellules T CD4+ et CD8+, du marqueur classique des macrophages ED-1 (CD68 chez l'humain) et du marqueur des macrophages résidents ED-2 (CD163 chez l'humain) ainsi que des cytokines telles que MIP-2 (l'équivalent de l'IL-8 humain), MCP-1 et RANTES,^{90;91}.

Le processus fibro-oblitératif présent dans la BO a également été étudié grâce au modèle d'allogreffe trachéale. Chez les souris MMP-9 -/- déficientes en métalloprotéinase matricielle 9, l'oblitération de la greffe trachéale est atténuée, supportant les études chez l'humain⁹². Les études sur des mutants SMAD3 nuls confirment l'importance de la voie du TGF- β dans le processus fibro-oblitératif^{93;94}. Le rôle de l'épithélium bronchiolaire a également été étudié en utilisant le modèle de transplantation trachéale hétérotopique. Lorsque l'épithélium des isogreffes est dénudé par digestion enzymatique, il est possible de reproduire la fibro-oblitération observée dans les allogreffes⁹⁵. De façon globale les allogreffes trachéales présentent un nombre plus élevé de myofibroblastes, expriment plus d'actine musculaire lisse et d'ARNm de facteurs de croissance fibrogéniques tels que le PDGF et le bFGF^{90;91}.

En plus de contribuer à l'identification de plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans la BO, le modèle de transplantation trachéale a été utilisé pour mieux comprendre la contribution de certains facteurs de risque, tels que l'infection au CMV. En effet, l'infection au CMV induit une amplification de la pathologie observée dans le modèle hétérotopique trachéale chez le rat, qui peut être abolie par un traitement prophylactique associé à une inhibition de la réponse Th1⁹⁶. D'autre part, ce modèle peut servir comme étape préliminaire dans l'évaluation de l'efficacité de nouveaux agents immunosuppresseurs dans la prévention de la BO⁹⁷.

1.5.2 Les modèles de transplantations pulmonaires orthotopiques

D'autres modèles, tels que les greffes pulmonaires orthotopiques chez le rat ou le porc ont également été utilisés pour l'étude de la BO. Dans ces modèles, la chirurgie réalisée chez l'humain est simulée chez l'animal, ce qui est un défi technique chez un animal aussi petit que le rat. Chez le rat l'allogreffe pulmonaire, en absence d'immunosuppression, induit un rejet aigu qui détruit le greffon en quelques jours, tandis que l'immunosuppression permet l'acceptation à long terme de l'allogreffe⁹⁸. Dans le contexte d'une histoincompatibilité modérée l'absence d'immunosuppression ne mène pas au rejet aigu dans ce modèle mais plutôt au rejet chronique⁹⁹. Cette manifestation n'est cependant pas identique à la BO. Ce modèle permet néanmoins d'étudier la réponse alloimmune dirigée contre le collagène V, que l'on retrouve également chez l'humain et qui suggérerait l'implication d'un processus autoimmun dans la pathologie de la BO⁴⁹. Ces études ont également permis

d'élaborer des protocoles de test de tolérance induite au collagène V qui pourraient être éventuellement appliqués chez l'humain¹⁰⁰. Le modèle animal de greffe orthotopique a également permis de confirmer le reflux gastro-œsophagien comme facteur de risque dans le développement de la BO¹⁰¹.

Le porc a l'avantage d'être anatomiquement et immunologiquement similaire à l'humain⁸⁸. Toutefois, la transplantation orthotopique chez les porcs histoincompatibles induit un état de rejet chronique sans la manifestation fibrobliterative observée chez l'humain¹⁰². Pour cette raison ce modèle est presque uniquement utilisé pour l'étude de nouveaux traitements immunosuppresseurs dans le cadre d'études précliniques^{88;103}. Une lignée de porcs miniatures congéniques a été développée pour l'étude de transplantation pulmonaire dans un contexte immunologique contrôlé¹⁰⁴. L'allogreffe chez les porcs miniatures congéniques reproduit la pathologie observée chez l'humain^{104;105}. Ce modèle reste toutefois très onéreux et n'est à la disposition que d'une seule équipe, celle de David Sachs à Harvard, qui a mis près de trente ans à développer son modèle^{105;106}.

1.6 Les traitements du SBO

La prévention et le traitement du SBO restent, à ce jour, assez décevants. Puisqu'il existe un lien entre le rejet aigu et le rejet chronique du greffon pulmonaire et qu'il existe une base immunologique au rejet chronique, l'augmentation de l'immunosuppression ou le changement des médicaments immunosuppresseurs ont

été les principales stratégies utilisées pour le traitement du SBO. Cependant, le bénéfice de ces différentes modalités thérapeutiques n'est pas convaincant et les réponses positives à ce type d'approches ont une valeur surtout anecdotique⁴. Une étude a rapporté un avantage au changement de l'azathioprine (AZA) par le mofétilmycophénolate (MMF), deux inhibiteurs de la synthèse de l'ADN utilisés, entre autre, pour bloquer la prolifération leucocytaire¹⁰⁷. Tandis que d'autres études n'ont rapporté aucun bénéfice à ce changement¹⁰⁸. De façon semblable, la cyclosporine et le tacrolimus deux inhibiteurs de la calcineurine, une protéine phosphatase impliquée dans l'activation des lymphocytes par la voie calcineurine/NFAT/IL-2, ont été comparés avec des résultats mitigés^{109;110}. Finalement, peu de données supportent, de façon irréfutable, qu'une modification au régime immunosuppresseur, a un impact sur le développement ou la progression du SBO⁴. En l'absence d'une étiologie définie, certains se sont attaqués aux facteurs de risque du SBO autres que le rejet aigu et la bronchiolite lymphocytaire. Tel que mentionné précédemment, la prophylaxie contre le CMV par traitements au ganciclovir, valganciclovir ou aux IgG anti-CMV réduit l'incidence des infections au CMV, du SBO et améliore la survie à long-terme^{25;26;111}. Les traitements anti-reflux sont souvent prescrits dans le but de prévenir ou traiter le SBO. Un grand nombre de greffés pulmonaires se font prescrire, de façon empirique, des inhibiteurs de pompe à proton dans le but de prévenir le développement du SBO¹¹². Aucune étude à ce jour n'a néanmoins démontré d'association entre le traitement aux inhibiteurs de pompe à proton et une incidence moins élevée ou une stabilisation du SBO. Finalement, un des médicaments prometteurs en ce moment est l'azithromycine. L'azithromycine est un antibiotique de la famille des macrolides à large spectre ayant également des

propriétés anti-inflammatoires¹¹³. Bien que son mode d'action reste encore inconnu, plusieurs études ont démontré que le traitement à l'azithromycine peut non seulement stabiliser mais également améliorer la fonction respiratoire de certains patients atteints du SBO¹¹⁴⁻¹¹⁶.

1.7 Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus par lequel une cellule épithéliale pleinement différenciée perd son phénotype épithélial, pour acquérir les caractéristiques d'une cellule mésenchymateuse¹¹⁷. Il s'agit d'un phénomène physiologique impliqué dans l'embryogénèse humaine ainsi que dans la régénération des tissus lors de la cicatrisation. La TEM est essentielle au développement de l'embryon métazoaire en participant dans la gastrulation et dans la neurulation chez les vertébrés. Ce processus peut en revanche contribuer au développement de différentes pathologies par son rôle dans la formation de métastases tumorales et par sa participation aux processus fibrotiques en réponse aux dommages épithéliaux²⁶. Très récemment la TEM a été impliquée dans le développement du rejet chronique et participerait potentiellement au processus fibrotique dans la BO^{68;87}. Différentes voies de signalisation pouvant induire la TEM ont été identifiées. La majorité de celles-ci impliquent l'activation des récepteurs du TGF- β . Le TGF- β peut mener à la TEM notamment par l'activation des protéines SMAD, de la p38 MAP Kinase, de RhoA ou par PI3K¹¹⁸⁻¹²¹. Les voies indépendantes du TGF- β sont les voies Notch-Delta, Wnt-Frizzled et la cascade Ras-MAPK activée

par les récepteurs tyrosine kinase (RTK) et les facteurs de croissance (HGF, FGF, PDGF) qui s'y lient¹²¹. Ces voies de signalisation mènent ultimement à la répression de certains gènes épithéliaux et à l'activation de gènes mésenchymateux. Les protéines réprimées, chez les cellules épithéliales entrant en TEM, sont entre autre l'E-cadherine, la cytokératine-18 et Muc-1^{119;121}. Les protéines nouvellement produites sont le collagène type 1, le collagène type 3, l' α -actine musculaire lisse (AML) et la vimentine^{121;122}. Toutes ces protéines et plusieurs autres, environ 35 identifiées, sont des marqueurs potentiels mais non-obligatoires de la TEM. Le vaste répertoire de voies de signalisation et de changements protéiques possibles lors de la TEM rendent difficile l'attribution d'une définition moléculaire précise à ce phénomène. Récemment des efforts ont été entrepris pour classifier la TEM en différents sous-types selon le contexte biologique dans lequel ils ont lieu (embryogenèse, cancer, régénération/fibrose)¹²³. La TEM a été très clairement impliquée dans la fibrose rénale et dans un processus de cicatrisation fibrosante de la rétine¹²⁴. Un lien formel entre la TEM et les pathologies fibrotiques du poumon chez l'humain reste encore à être établis. Il a néanmoins été démontré *in vitro* que les cellules de l'épithélium alvéolaire subissent la TEM en présence de TGF- β ^{122;125}. D'autre part, une étude utilisant un modèle de fibrose pulmonaire chez la souris a clairement démontré la présence de TEM¹²⁶. Finalement, deux études ont observé l'évidence du processus de la TEM *in vivo* dans les allogreffes pulmonaires humaines. En effet, une étude anglaise a examiné l'expression d'un marqueur de la TEM, la protéine S100A4 impliquée dans la mobilité et l'adhésion cellulaire, dans des biopsies et des cellules mises en culture provenant d'allogreffe⁶⁸. Cette étude a démontré la présence élevée de la protéine S100A4 dans l'épithélium des allogreffes

en comparaison des poumons non-transplantés⁶⁸. Une co-localisation de la MMP-7, une collagénase impliquée dans la TEM, a également été observée⁶⁸. Plus récemment, une équipe australienne a examiné, par cytométrie en flux dans des cellules prélevées chez des patients greffés, l'expression de trois marqueurs de la TEM; l' α -AML, la S100A4 et un variant d'épissage de la fibronectine (ED-A FN)⁸⁷. Ces trois marqueurs ont été retrouvés en plus grande quantité dans les cellules provenant de patients ayant développé le SBO⁸⁷. Ces études nous donnent l'indice d'un rôle de la TEM dans la pathologie de la bronchiolite oblitérante, qui reste par contre à être confirmé.

1.8 Les Eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont un groupe de médiateurs lipidiques à 20 carbones dérivés de l'acide arachidonique (AA). Il s'agit d'un vaste groupe de médiateurs ayant différents effets physiologiques. En bref, l'arachidonate est libéré des phospholipides de la membrane nucléaire par la phospholipase cytosolique A2 (cPLA2). Une fois libre cet acide gras peut suivre deux voies métaboliques différentes, soit la voie des cyclooxygénases ou celle de la 5-lipoxygénase (5-LO). Les enzymes cyclooxygénases, dont il existe deux isoformes majeurs COX-1 et COX-2, sont responsables de la synthèse de la prostaglandine H2 qui est à l'origine des autres prostaglandines (PG) et des thromboxanes (TX). La 5-LO, activée par sa protéine activatrice (5-lipoxygénase-activating protein ou FLAP), quant à elle catalyse successivement la formation de l'acide 5-hydroperoxyeicosatetraénoïque (5-HPETE) puis du leucotriène A4 (LTA4).

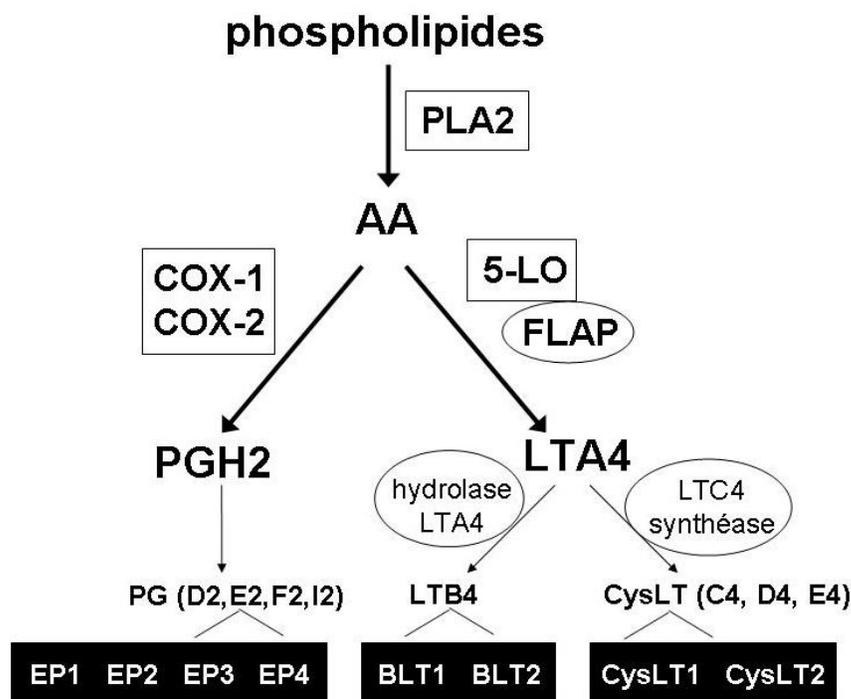


Figure 3. Voies de biosynthèse des eicosanoïdes et leurs récepteurs. La phospholipase A2 libère l'arachidonate pour être converti en PGH2 par la COX-1 et la COX-2 ou en LTA4 par la 5-LO. Les enzymes responsables de la conversion distale de l'LTA4 en LTB4 et LTC4 sont appelés hydrolase LTA4 et LTC4 synthase respectivement. Les différentes prostaglandines sont produites à partir de la PGH2 par leur prostaglandine synthase respective. Chacun des eicosanoïdes terminaux agit par liaison à un ou plusieurs récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G ; les récepteurs de la PGE2, LTB4 et des CysLT seulement sont représentés.

Les eicosanoïdes ont traditionnellement été associés à certaines fonctions telles que le message de la douleur, l'agrégation plaquettaire, la contraction de muscles lisses, la vasodilatation et l'inflammation. Des analyses plus larges des fonctions de ces médiateurs ont récemment dévoilé de nouveaux rôles tels que la

migration cellulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose¹²⁷, tous des processus centraux à la fibrogenèse et au remodelage bronchique. Les données de patients atteints de FPI et provenant de modèles animaux suggèrent qu'un déséquilibre d'eicosanoïdes contribue au développement de la fibrose pulmonaire¹²⁸. La théorie d'une balance des LT et PG régulant les événements fibrotiques dans les poumons a été formulée et propose qu'un niveau supérieur de PG aux LT favorise l'homéostasie normale, tandis qu'une condition pro-fibrotique est stimulée par un déséquilibre favorisant les LT¹²⁷.

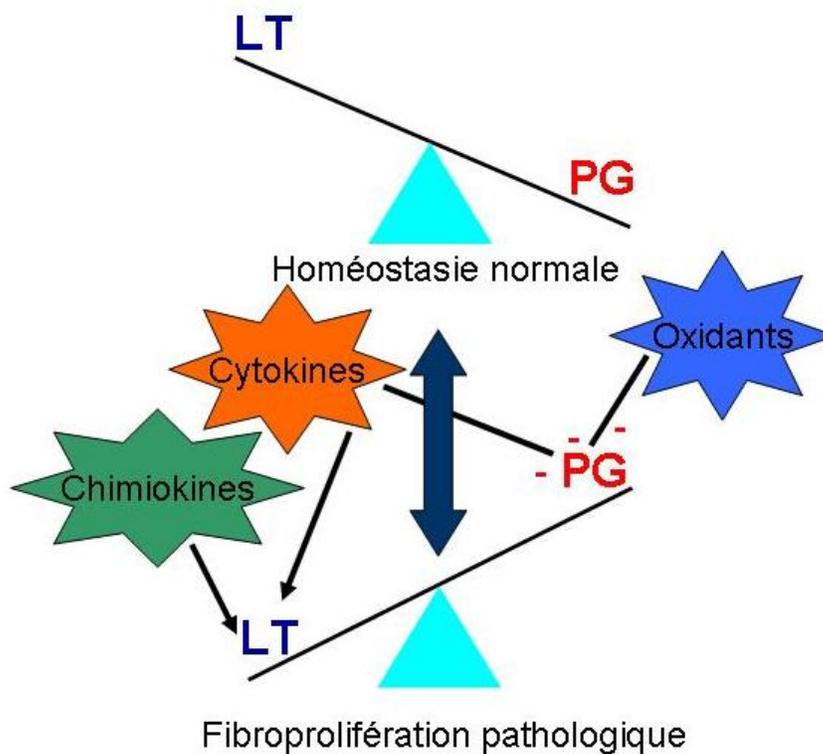


Figure 4. Rôle de la balance des eicosanoïdes dans la régulation d'événements fibrotiques du poumon. Des taux de PGs supérieurs aux taux de LTs sont associés à des conditions d'homéostasie normales dans les poumons. Toutefois, la fibroprolifération anormale est caractérisée par un déséquilibre de synthèse favorisant les LTs par rapport aux PGs. Cette balance pourrait réguler, ou être régulée par, d'autres médiateurs connus pour jouer un rôle important dans la modulation de fibrogenèse. Les flèches indiquent les effets stimulants, et les signes moins indiquent les effets inhibiteurs.

1.8.1 Leucotriènes

Les leucotriènes sont des médiateurs peptido-lipidiques impliqués principalement dans l'inflammation. Ces molécules sont majoritairement produites par les leucocytes, l'expression de la 5-LO étant en grande partie restreinte à ces cellules. Les granulocytes, les monocytes/macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes B expriment la 5-LO. L'enzyme n'est cependant pas exprimé par les lymphocytes T¹²⁹. L'expression de la 5-LO a également été identifiée dans certaines sous-populations spécifiques de cellules structurales pulmonaires. En effet, des cellules endothéliales d'artères pulmonaires en culture expriment une quantité minimale de 5-LO, qui peut générer du 5-HETE, mais pas des leucotriènes¹³⁰. Les cellules épithéliales et les fibroblastes bronchiques expriment les enzymes de la voie de biosynthèse des leucotriènes et peuvent synthétiser des leucotriènes biologiquement actifs de façon constitutive et des quantités supérieures lorsque stimulées par du LPS ou l'ionophore A23187^{131;132}. En effet la 5-LO peut être activé par l'augmentation du calcium intracellulaire ou par sa phosphorylation par les ERKs et la p38 MAPK qui peuvent être activés par le LPS. Le métabolite final de la voie de la 5-LO, le LTA₄, est un intermédiaire instable menant à la formation des deux classes de leucotriènes biologiquement actifs. Le LTB₄ produit par l'enzyme LTA₄ hydrolase, forme une classe en elle-même et a principalement un rôle chimiotactique et activateur des granulocytes¹³³. La deuxième classe est celle des cysteinyl-leucotriènes (CysLT), formée par les leucotriènes C₄, D₄ et E₄. Le LTC₄ est produit en premier lieu, par l'addition du glutathion au LTA₄ par la LTC₄ synthase. Le LTC₄ est ensuite sécrété hors de la cellule pour être pris en charge

successivement par la gamma-glutamyl leucotriénase et une dipeptidase qui le transformera en LTD4 et LTE4 respectivement. Les CysLT exercent leurs effets par l'activation de récepteurs spécifiques soit les CysLTR1 et CysLTR2. Il s'agit de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'affinité des trois types de CysLT pour le CysLTR1 est LTD4 >LTC4 >LTE4¹³⁴ et LTC4 =LTD4 >LTE4 pour le CysLTR2¹³⁵. Les CysLTR peuvent être exprimés par divers leucocytes tels que les éosinophiles, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B¹³⁶. Ces récepteurs sont aussi retrouvés dans le poumon au niveau des cellules structurales soit les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales^{137;138}. Le rôle des leucotriènes dans l'asthme est bien établi, ils sont notamment responsables de l'inflammation, de la bronchoconstriction et de l'hypersécrétion de mucus. Plusieurs études attribuent aux leucotriènes un rôle dans le remodelage bronchique de l'asthme¹³⁹⁻¹⁴¹. Le remodelage bronchique est caractérisé, entre autre, par l'épaississement de la membrane sous-épithéliale due à une hyperplasie et une hypertrophie des fibroblastes et des cellules musculaires lisses bronchiques. En effet, chez des enfants asthmatiques l'épaississement de la membrane réticulaire a été corrélé avec des taux élevés de CysLT dans le condensat d'air expiré¹³⁹. De plus, le traitement au Montelukast, un antagoniste des récepteurs des cysteinyl-leucotriènes, a été corrélé avec une diminution du nombre de myofibroblastes de la paroi bronchique chez des sujets asthmatiques¹⁴². Les effets pro-fibrotiques des leucotriènes ont été étudiés dans le contexte d'autres pathologies pulmonaires. Les leucotriènes sont retrouvés en plus grande quantité chez les patients atteints de FPI¹⁴³ et ont été liés à d'autres maladies pulmonaires présentant de la fibrose telles que l'atteinte pulmonaire de la sclérodemie¹⁴⁴, l'amiantose¹⁴⁵ et la

maladie des éleveurs de pigeons¹⁴⁶. *In vitro*, le LTD4 stimule la production de collagène et de collagénase chez les fibroblastes pulmonaires humains^{140;147}. La migration des fibroblastes humains est également potentialisée par le LTD4¹⁴⁸. Les cellules épithéliales stimulées par du LTC4 produisent du TGF- β , qui est un contributeur majeur de la fibrogénese¹⁴⁹. Dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris l'inactivation des gènes de la 5-LO¹⁵⁰ et de la LTC4 synthase¹⁵¹ ainsi que l'inhibition pharmacologique de la 5-LO et l'antagonisme des récepteurs des cysteinyl-leucotriènes¹⁵² protège contre la fibrose. L'antagonisme des récepteurs des cysteinyl-leucotriènes réduit et inverse également l'hyperplasie des cellules musculaires lisses et la fibrose sous-épithéliale dans un modèle d'asthme murin^{153;154}.

D'autre part, quelques études se sont penchées sur l'implication des leucotriènes dans la transplantation pulmonaire. Dans un modèle de greffe pulmonaire canin, des taux élevés de LTC4 ont été retrouvés dans le sang et le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) immédiatement après la reperfusion¹⁵⁵. Dans une étude pilote, le Montelukast, un antagoniste des récepteurs des CysLT, a été testé comme un complément au traitement standard chez 19 patients souffrant de la maladie du greffon contre l'hôte (GvH), suite à une greffe de moelle osseuse, dont cinq patients avaient une BO parmi leurs manifestations du GvH. Le Montelukast a eu un effet bénéfique au niveau de toutes les atteintes de la maladie permettant ainsi la diminution du traitement immunosuppresseur. Il était intéressant de noter que trois patients présentant une BO ont montré une amélioration significative dont 2 ont présenté une amélioration drastique de la fonction pulmonaire¹⁵⁶.

1.8.2 Prostaglandines

Les prostaglandines sont un groupe important d'eicosanoïdes, ayant diverses fonctions chez l'humain. Elles sont produites par l'oxydation séquentielle de l'AA par les cyclooxygénases (COX-1 et la COX-2), puis par une prostaglandine synthase terminale^{157;158}. Les effets physiologiques des prostaglandines sont très vastes et incluent la régulation de la contraction¹⁵⁹ et du relâchement¹⁶⁰ musculaire lisse, la régulation de l'agrégation plaquettaire¹⁶¹, la régulation de certains processus inflammatoires¹⁵⁸ et le contrôle de la croissance cellulaire¹⁶². Les facteurs déterminant le signal final comprennent la concentration relative locale de prostaglandines, l'expression relative et l'affinité de liaison du ligand des récepteurs prostanoïdes individuels, le type de cellules impliquées et le contexte physiologique de la cellule. Les prostaglandines manifestent leur activité biologique, grâce à l'activation d'une famille sélective de récepteurs membranaires couplés aux protéines G, les récepteurs aux prostanoïdes (DP1-2, EP1-4, FP)¹⁵⁸. Les prostaglandines agissent localement sur leurs récepteurs exprimés par de nombreuses cellules et sur différents types cellulaires. Ce grand nombre de cibles et la complexité générale du système des récepteurs des prostaglandines, rendent l'attribution d'un rôle spécifique des prostaglandines dans la fibrose et l'inflammation du poumon très difficile. Selon le récepteur stimulé et le contexte pathologique les prostaglandines peuvent avoir, dans le poumon des effets soit pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire¹⁶³. En effet, la PGD2 est considérée pro-inflammatoire dans un contexte d'inflammation allergique et d'asthme, mais peut inhiber l'inflammation dans d'autres contextes. La PGE2 a un effet anti-inflammatoire dans le contexte de l'inflammation allergique et de l'asthme,

mais peut stimuler l'inflammation aiguë par son effet vasodilatateur¹⁶³. Les effets des prostaglandines dans les processus fibrotiques du poumon sont plus explicites. Un effet anti-fibrotique est particulièrement reconnu pour la PGE2. En effet, la PGE2 inhibe la prolifération, la migration, la différenciation en myofibroblastes et la synthèse de collagène chez les fibroblastes pulmonaires humains^{127;162;164;165}. En transplantation pulmonaire, la PGE2 a été étudiée en tant qu'immunosuppresseur dans différents modèles de greffes animales. Chez le rat, le 16,16-diméthyl-PGE2 (dmPGE2), un analogue synthétique stable de la PGE2, utilisé seul permet de prolonger l'acceptation d'allogreffes cardiaques et d'allogreffes de l'intestin en combinaison d'une faible dose de cyclosporine^{166;167}. De plus, dans un modèle de greffe cardiaque murine, des analogues spécifiques des récepteurs EP2 et EP4 ont également prolongé l'acceptation du greffon¹⁶⁸. La PGE1 réduit les lésions d'ischémie-reperfusion par son effet vasodilatateur lorsqu'elle est ajoutée à la solution de préservation d'organe qui tend à avoir un effet vasoconstricteur causé par sa haute concentration en potassium¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Plus récemment, la réduction des lésions d'ischémie-reperfusion et l'amélioration de la fonction pulmonaire attribuée à la PGE1 a été associée à son effet anti-inflammatoire¹⁷².

1.9 Rationnelle

La bronchiolite oblitérante est l'obstacle majeur à la survie à long terme post transplantation pulmonaire. Afin qu'il soit un jour possible de prévenir ou guérir cette pathologie il est essentiel de pousser plus loin l'étude sur les facteurs en cause dans sa pathogénèse et de découvrir les marqueurs précoces de son développement. Le concept étiologique actuel présente le SBO comme un processus de réparation tissulaire anormal en réponse à un état inflammatoire chronique ou aigu et répété. Il s'agit d'une pathologie impliquant certainement des facteurs alloimmuns, non-alloimmuns et peut-être même autoimmuns. Il reste à savoir quelle est la contribution exacte des différentes cellules et voies immunitaires à la réponse alloimmune, ainsi que l'apport des facteurs non-alloimmuns tels que les infections, le reflux gastro-oesophagien et l'ischémie-reperfusion. Les mécanismes derrière la composition et l'origine des lésions fibrotiques dans la BO chez l'homme n'ont également pas été entièrement caractérisées. L'implication de la TEM dans le développement du rejet chronique a été proposée et participe potentiellement au processus fibrotique dans la BO^{68;87}. Différents facteurs fibrotiques, principalement le TGF- β , ont déjà été étudiés dans le contexte du SOB. Toutefois, d'autres molécules méritent d'être étudiées, notamment les eicosanoïdes. Les eicosanoïdes sont des médiateurs régulant diverses fonctions biologiques dont l'inflammation et les réponses fibroprolifératives. Les leucotriènes et les prostaglandines ont des effets opposés dans la régulation de ces événements. Une balance favorisant les leucotriènes aurait un effet, non-seulement pro-inflammatoire mais également pro-fibrotique et pourrait jouer un rôle dans le développement de la BO.

1.10 Hypothèse et objectifs

1.10.1 Hypothèse de recherche

Nous proposons qu'un déséquilibre des eicosanoïdes favorisant les CysLT par rapport au PGE2 existe dans le poumon transplanté et qu'il est impliqué dans la pathologie de la BO. Nous proposons également que les CysLT participent au processus fibroprolifératif de la BO en induisant la TEM.

1.10.2 Objectifs

L'objectif général de notre étude était : Étudier l'implication des eicosanoïdes dans la pathologie de la BO.

Les objectifs spécifiques de notre étude étaient :

- 1- De déterminer, prospectivement, les taux de CysLT et de PGE2 dans le surnageant de lavages broncholavéolaires provenant de sujets humains greffés du poumon, ainsi que leurs corrélations cliniques.
- 2- D'examiner le rôle des CysLT dans la transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*.

Chapitre 2

La balance Cysteinyl-Leucotriènes/Prostaglandine E2 post transplantation pulmonaire

Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs

Le rejet de greffe chronique du greffon pulmonaire est défini cliniquement par le syndrome de bronchiolite oblitérante (SBO). Cette pathologie inflammatoire et fibroproliférative est une cause majeure de mortalité chez les receveurs de greffe de poumon. Certaines études suggèrent qu'un déséquilibre des eicosanoïdes, particulièrement entre les leucotriènes et les prostaglandines, pourrait favoriser le remodelage et la fibrose pulmonaire. Les niveaux d'eicosanoïdes pulmonaires post-greffe restent à être identifiés. Nous avons émis l'hypothèse qu'un déséquilibre de cystéinyl leucotriènes (CysLT) sur le PGE2 existe dans le poumon transplanté et pourrait être impliqué dans la pathogenèse du SBO.

Ce chapitre décrit le profil des eicosanoïdes retrouvé dans le poumon greffé humain et certaines associations cliniques notables. Des niveaux élevés des CysLT et du PGE2 sont retrouvés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de sujets greffés. D'autre part, un déséquilibre favorisant les CysLT est retrouvé dans une partie des sujets. Ce déséquilibre culmine à un an post-greffe et est associé à deux facteurs de risque du SBO; les infections au CMV et la colonisation par l'*Aspergillus*. Une tendance à l'association entre ce déséquilibre et le rejet chronique lui-même a également été observée, malgré une petite taille d'échantillon.

Dr Céline Bergeron a élaboré l'hypothèse de recherche ainsi que le protocole initial de recherche. Le Dr Bergeron a également supervisé les travaux et a participé à la rédaction finale du manuscrit. Dr Charles Poirier, directeur du programme de

transplantation pulmonaire du Québec, était notre personne ressource au département de pneumologie et d'endoscopie à l'hôpital Notre-Dame et a participé à l'élaboration de la banque d'échantillons de lavages broncho-alvéolaires et de biopsies transbronchiques de la cohorte de sujets transplantés du poumon du CHUM. J'ai procédé au traitement et à la mise en banque des échantillons de LBA, réalisé la majorité des expériences de laboratoire, fait des ajustements et des ajouts au protocole, procédé à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit. Madame Sawsan Al-Mot a effectué des comptes différentiels. Areej Al-Rabea, étudiante à la maîtrise a procédé au traitement et à la mise en banque de quelques échantillons de LBA. Elise O'Carroll, étudiante stagiaire de premier cycle, a recueilli les données cliniques à partir de la base de données « Transplant ». Ce projet est financé par une subvention pour un projet de recherche initié par l'investigateur (Dr Céline Bergeron) par la compagnie Merck dans le cadre de leur programme de « Medical school grant ».

Résumé français

Introduction: Des études antérieures ont associé un déséquilibre des leucotriènes (LT) par rapport aux prostaglandines (PG) au remodelage bronchique et à la fibrose pulmonaire. Le syndrome de bronchiolite oblitérante (SOB), le corolaire clinique du rejet de greffe pulmonaire chronique, est une cause majeure de mortalité chez les greffés du poumon. Au niveau histopathologique, cette maladie se manifeste par l'inflammation bronchiolaire et un processus fibroproliférative qui mène ultimement à l'oblitération des bronchioles. Les niveaux de LT et PG dans les poumons, suite à la transplantation chez l'humain, restent à être identifiés. Nous proposons qu'un déséquilibre de cystéinyl leucotriènes (CysLT) sur la PGE2 existe dans le poumon transplanté et pourrait être impliqué dans la pathogenèse du rejet chronique pulmonaire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons déterminé les niveaux de CysLT et PGE2 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) provenant de sujets transplantés ainsi que leurs corrélations cliniques. **Matériel et Méthodes:** Des échantillons de liquide de LBA ont été obtenus de 30 greffés différents totalisant 41 échantillons prélevés à des temps post greffe allant de 1 à 275 semaines. Après traitement, les surnageants de LBA ont été congelés à -80 °C et analysés ultérieurement par l'EIA pour quantifier les niveaux de CysLT et PGE2. Les niveaux d'eicosanoïdes ont été évalués dans le temps et en relation aux données cliniques. **Résultats:** Nous avons découvert des taux de CysLT et PGE2 supérieurs à la normale dans les LBA des greffés. Un pic prédominant de CysLT sur PGE2 est observé à 52 ± 16 semaines post-greffe. La totalité (6) des infections pulmonaires au cytomégalovirus humain (CMV) ont été associées à un $\text{CysLT/PGE2} > 1$. Un ratio

supérieur à 1 a également été associé à la colonisation précoce par *Aspergillus* et une tendance favorisant un $\text{CysLT/PGE}_2 > 1$ a été observée avec le rejet chronique pulmonaire. Les ratios CysLT/PGE_2 étaient stables dans le temps avec un ratio < 1 chez 14 sujets (16 BAL) et > 1 chez 16 sujets (25 BAL). **Conclusions:** L'équilibre entre les CysLT et la PGE_2 chez les greffés évolue pour favoriser les CysLT environ un an post-greffe. Notre étude établit un lien entre un $\text{CysLT/PGE}_2 > 1$ et deux facteurs de risque du rejet chronique, l'infection au CMV et la colonisation à *Aspergillus*. Un suivi à long terme post-greffe de ces patients nous permettra d'associer plus résolument le rejet chronique avec ce changement de l'équilibre des eicosanoïdes et de vérifier son importance comme événement post-greffe dans le développement du rejet chronique d'allogreffe pulmonaire.

Cysteinyl Leukotrienes/Prostaglandin E2 Balance Following Lung Transplantation

Stanislaw Ptaszynski, BSc¹, Elise O'Carroll¹, Sawsan Al-Mot, BSc¹, Areej Al-Rabea, BSc¹, Charles Poirier, MD, FRCPC² and Celine Bergeron, MD, FRCPC, MSc^{1,2}

¹Centre de recherche CHUM- Hôtel-Dieu, Montréal, Québec, Canada

²Quebec Lung transplantation Clinic, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author : Céline Bergeron, MD, FRCPC, MSc

CHUM-Hotel-Dieu

3840 St-Urbain

Montreal, Quebec, Canada

H2W 1T8

Tel: 514-890-8000 ext 15639

Fax: 514-412-7123

Abstract

Purpose: Previous studies on lung matrix remodelling mediators suggest that an imbalance of leukotrienes (LT) over prostaglandins (PG) could promote fibrosis. Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), which terms chronic lung transplant rejection and characterized by being a fibroproliferative disease, is a leading cause of mortality in lung transplant recipients (LTRs). Human lung LT and PG levels following transplantation are yet to be identified. We propose that an imbalance of Cysteinyl Leukotrienes (CysLT) over PGE2 exists in the transplanted lung and could be implicated in the pathogenesis of chronic lung rejection. In order to test this hypothesis, we have determined the levels of CysLTs and PGE2 in human transplanted lung bronchoalveolar lavage fluid (BALf) samples and their clinical correlations. **Methods and Materials:** BALf samples were obtained from 30 different LTRs totalling 41 samples that range from 1 to 275 weeks post transplantation. After processing, BAL supernatants were frozen at -80°C and subsequently analyzed by EIA to quantify CysLTs and PGE2 levels. Eicosanoid levels were evaluated over time and correlated with clinical data. **Results:** We found high average levels of CysLT and PGE2 in LTR BALf. CysLT/PGE2 ratios were stable over time with a ratio <1 in 14 subjects (16 BAL) and >1 in 16 subjects (25 BAL). A predominant peak of CysLT over PGE2 was observed at 52 ± 16 weeks post transplantation. All active human cytomegalovirus (CMV) lung infections (6) were associated with a CysLT/PGE2 > 1 . A ratio over 1 was also associated with early *Aspergillus* colonisation and a trend favouring a CysLT/PGE2 > 1 was observed with chronic lung rejection. **Conclusions:** The CysLT to PGE2 balance shifts towards

CysLT in LTRs around one year post transplantation. Our study demonstrates a link between a CysLT/PGE2 >1 and two risk factors for chronic rejection; CMV infection and *Aspergillus* colonisation. A long term post transplant follow up of these patients will allow us to link more robustly chronic rejection with this eicosanoid balance shift and ascertain it as a significant post transplantation event in the development of chronic lung allograft rejection.

Abbreviations used: 5-LO: 5-lipoxygenase, BALf: bronchoalveolar lavage fluid, BO: bronchiolitis obliterans, BOS: bronchiolitis obliterans syndrome, CHUM: Centre Hospitalier de l'Université de Montreal, CMV: cytomegalovirus, CysLT: cysteinyl leukotriene, COPD: chronic obstructive pulmonary diseases, LT: leukotriene, LTR: lung transplant recipient, PG: prostaglandins, TGF-beta: transforming growth factor beta.

Introduction

Lung transplantation is often the only therapeutic alternative for many end stage lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cystic fibrosis or idiopathic pulmonary fibrosis. With the progress of surgical techniques, organ preservation techniques and development of new and improved immunosuppressant regimens, short and medium term post transplant survival is now comparable to that of other solid organ transplants. However the long term survival after a lung transplant, which stands around 50% after 5 years, is the worst among all solid organ transplants mainly due to the development of chronic lung transplant rejection. Chronic lung rejection; a progressive and irreversible loss of pulmonary function, is defined histologically by the presence of bronchiolitis obliterans (BO) and clinically as bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). BO is characterised by an inflammatory and fibroproliferatif process which leads to a partial and ultimately a complete obstruction of the small airways. Acute lung rejection, lymphocytic bronchitis/bronchiolitis, gastro-oesophageal reflux, human leukocyte antigen (HLA) mismatches and cytomegalovirus (CMV) pneumonitis have been reported as risk factors for BOS^{1;2}. Other potential risk factors such as CMV infection without pneumonitis, other types of viral, bacterial and fungal infections, and longer graft ischemic time have been reported as well. The exact mechanisms behind this pathology are still poorly understood and early markers of the development of this disease are still unknown.

Eicosanoids are mediators derived from the metabolism of arachidonic acid. This group of molecules is generally split into two major subgroups that often have opposite effects, leukotrienes (LTs) and prostaglandins (PGs). Leukotrienes mainly exert functions within the immune system, usually as pro-inflammatory mediators, but have other roles, namely they act within the lung to increase vascular permeability, mucus secretion, and are potent bronchoconstrictors³. Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) also have known remodelling properties, and have been involved in airway goblet cells and airway smooth muscle hyperplasia, angiogenesis and fibrosis by activating fibroblast proliferation and collagen synthesis^{4;5}. *In vitro*, LTD₄ stimulates collagen production from human lung fibroblasts⁶ and synergize with growth factors to induce proliferation of human bronchial fibroblasts. Epithelial cells stimulated with LTC₄ produce TGF-beta, which activates fibroblasts⁷. In the lung, PGE₂ mediates opposite effects to leukotrienes. It has an anti-inflammatory and bronchodilating effects, increases microvascular permeability and is anti-fibrotic^{5;8;9}. *In vitro*, PGE₂ inhibits fibroblast proliferation, fibroblast differentiation into myofibroblast and collagen synthesis^{10;11}. The theory of a LT to PG balance regulating fibrotic events in the lungs has been formulated, proposing that a higher level of PGs over LTs favours normal homeostatic conditions whereas fibrotic conditions are promoted by the opposite conditions.

Lung transplantation in animal models has reported high level of LTC₄ in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALf) immediately after reperfusion¹². In a pilot study montelukast, a leukotriene receptor antagonist was tested as an addition to standard treatment in 19 patients suffering from graft versus host disease, of which five

patients developed BO. Montelukast had a beneficial effect in all organ involvements allowing the decrease of the immunosuppressive regimen. Most interestingly, three patients with BO showed significant improvement of which 2 had a dramatic improvement in pulmonary function¹³. The eicosanoid profile in human lungs after transplantation is still to be determined. We propose that an imbalance of CysLTs over PGs occurs in the transplanted lung and could be implicated in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans. In order to test this hypothesis, our aim was to determine the CysLTs and PGE2 levels in human transplanted lung BAL fluid and their clinical correlations.

Methods

Subjects

This study was carried out on the lung transplant recipient (LTR) population of the province of Quebec, Canada, which is followed entirely at hospital Notre-Dame of the Centre Hospitalier Universitaire de Montreal (CHUM). All samples were obtained from the CHUM lung transplant recipient transbronchial biopsy and BAL sample bank. The first 41 BAL samples available were analysed with exclusion of subjects on anti-leukotrienes or non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). This study has been performed with local ethic approval. Clinical data were obtained from the lung transplant databank, including gender, age, transplantation type, date of transplantation, original disease, active CMV infections, *Aspergillus* colonisation, acute lung rejection and chronic lung rejection.

Bronchoscopy

Bronchoalveolar lavage fluid (BALf) was obtained from right or left middle lobe by flexible bronchoscopy. BALf from single lung transplant recipients was only collected in the transplanted lung. The lavage consisted of 3 injections of 50ml of warm sterile saline. Aspirates were pooled, 30ml were used for clinical testing and any excess was kept in the sample bank.

BAL processing

Specimens were transported on ice and processed within 4h of collection. The recovered fluid was filtered and centrifuged at 800g for 10 min at 4°C. Supernatants

were immediately frozen at -80°C for further analysis. Cell pellets were resuspended in PBS, centrifuged onto glass slides (Cytospin) and stained with Hema-3 (Fisher, Kalamazoo, US) to allow differential cell count. Four hundred leukocytes were counted and the results were expressed as total leukocyte count after the percentage of each leukocyte was multiplied by total cell count.

PGEM assay

PGEM, a stable metabolite of 13,14-dihydro-15-keto PGA2 and 13,14-dihydro-15-keto PGE2, was used as a surrogate marker of PGE2. PGEM was quantified in BAL supernatants using the PGEM EIA kit from Cayman Chemical (cat# 514531) according to the manufacturer protocol.

CysLT assay

CysLT was extracted from samples using C-18 SPE cartridges from Cayman Chemical (cat# 400020). CysLT was quantified using the CysLT EIA kit from Cayman Chemical (cat# 520501) according to the manufacturer protocol.

Clinical data analysis

Samples were separated into 2 groups, according to their CysLT/PGE2 ratio; higher or lower than 1. These 2 groups were evaluated to establish peak overtime and to determine a correlation with known BOS associated risk factors, including acute lung rejection, CMV infections and *Aspergillus* colonisation.

Statistical analysis

Demographic data are presented as individual values or as median with minimum-maximum range. BAL eicosanoid levels are presented as mean \pm standard error. The hypothesis of ratio stability between samples was confirmed using a general linear model tested by Friedman's non parametric test. This allowed us to consider a single sample per subject. The last sample was considered unless previous samples were associated to a clinical condition, in which case the last sample associated to the clinical condition was considered. CysLT/PGE2 ratios and population characteristics were tested for independence using the Student *t*-test, the chi-squared test and the Fisher's exact test. To assess correlations between clinical data and CysLT/PGE2 ratios Fisher's exact test and Kaplan-Meier survival curve analysis were used. Survival curves of clinical conditions for both groups were compared by means of Mantel-Cox log-rank testing. Differential cell counts were compared between clinical groups using Mann-Whitney U test and between ratio groups using Student's *t* test. For all tests, a P-value of 0.05 or less was considered for statistical significance.

Results

Demographic characteristics of studied population

A total of 41 BALf samples from 30 subjects were studied. Demographic characteristics of the studied population are presented in Table III. There were more male subjects than female subjects, 20 versus 10. There was also a sizeable difference in the transplantation type of our subject population with 25 bilateral lung transplantations and only 5 single lung transplantations. The median age at the moment of the transplantation was 50.00 (23-67) years and the 41 samples included in our study were collected between 0.86 and 275.14 week post transplant with a median of 36.29 weeks. The majority 15 (50%) of subjects had cystic fibrosis as their original disease, 8 (27%) had COPD, 5 (17%) had IPF and 2 (7%) received lung transplant for bronchiectasis. A single sample was available for 22 subjects, 5 subjects had 2 successive samples taken and 3 had 3 successive samples. Of the 30 subjects included in this study only 3 were clinically diagnosed with chronic lung rejection before or after their BALf sample was obtained, of whom 2 were diagnosed with BOS and 1 with chronic vascular rejection.

CysLT and PGE2 in BALf after lung transplantation

The mean of the CysLT levels in the 41 samples studied was lower than the mean of the PGE2 levels with averages of 96.12 ± 173.69 pg/ml and 134.08 ± 367.29 pg/ml respectively. The highest level of PGE2 was observed early post-transplantation in a limited number of patients. The highest level of CysLT were also documented early

post-transplantation but a second peak was observed after one year post-transplantation (Figure 5).

CysLT/PGE2 ratio in BALf after lung transplantation

Subjects were separated according to their CysLT/PGE2 ratio, 14 subjects had a ratio <1 whereas 16 had a ratio >1 . Subject characteristics according to their ratio; CysLT/PGE2 < 1 or CysLT/PGE2 > 1 , are presented in Table IV. Among the 8 patients with multiple samples, 7 showed a consistency over time in CysLT/PGE2 ratio, and statistical analysis supports the stability of the ratio over time. Both groups were independent from the demographic characteristics when tested, including gender, age at transplantation, underlying lung transplantation and type of lung transplantation. The analysis of CysLT/PGE2 ratios overtime revealed an imbalance favouring CysLT at one year post transplantation (± 16 weeks) (Figure 6). More precisely, all 9 samples collected at that time had a ratio over 1 (Figure 6). The samples collected early post transplant (0-36 weeks) were evenly distributed between both ratio groups, whereas most of the samples (62 %) collected later than 68 weeks post-transplant had a ratio lower than 1.

Clinical correlations

Clinical data were analyzed for correlations with eicosanoid levels or CysLT/PGE2 ratios. Four conditions were examined: acute lung rejection, active CMV infections, *Aspergillus* colonisation and chronic lung rejection. Unfortunately, only one sample

was associated with a concomitant acute lung rejection episode, preventing statistical analysis. This single sample was associated with a CysLT/PGE2 ratio <1 .

All active CMV infections were associated with a CysLT/PGE2 ratio >1 . These samples had markedly higher CysLT levels than PGE2 levels with an average of 159.72 ± 42.76 pg/ml and 13.22 ± 2.15 pg/ml respectively. These samples were also distributed evenly through the early (<36 wk.), middle (36-68 wk.) and late (>68 wk.) post-transplant time periods. The association of CMV infection and CysLT/PGE2 >1 was statistically significant ($p=0,045$), as tested by Fisher's exact test. The probability of demonstrating a CMV infection with time for both ratios was, as expected, significantly different with $p=0.022$ when analyzed with Kaplan-Meier curves (Figure 7).

The average CysLT level in samples associated with *Aspergillus* colonisation was 135.01 ± 23.63 pg/ml, again much higher than the average PGE2 level which was 37.49 ± 4.73 pg/ml. A total of 9 patients were diagnosed at least once with an *Aspergillus* colonisation concomitantly to a BALf sample we obtained. Four had a ratio <1 and five had a ratio >1 , this difference was not significant. However the Kaplan-Meier curves differed significantly ($p=0.030$), suggesting the earlier onset of *Aspergillus* colonisation in patients with a ratio >1 (Figure 8).

Patients with chronic lung rejection had higher levels of CysLTs than PGE2, with an average of 90.52 ± 34.35 pg/ml and 66.81 ± 22.82 pg/ml respectively ($p=0.76$). Out of the 3 patients diagnosed with chronic rejection 2 had a ratio >1 the other had a ratio

<1. There was no significant difference when tested by the Fisher's exact test or the log rank test of Kaplan-Meier survival curves (Figure 9). Nevertheless, the survival curve analysis showed a marked difference between both ratios nearing significance ($p=0,067$).

Inflammatory pattern in BALf

The differential cell counts of the CysLT/PGE2 < 1 and CysLT/PGE2 > 1 groups are represented in Table V. There was no significant difference between eosinophils, neutrophils, macrophages or lymphocytes for both groups. Associations with clinical conditions were also considered. The only significant association was a lower lymphocyte level in patients with chronic lung rejection ($p=0.041$) (Table VI).

Discussion

We hypothesized that an imbalance of CysLTs over PGE2 exists in the transplanted lung with implications in chronic lung rejection. Since bronchoscopy is an invasive procedure, that carries a small but definite risk of pneumothorax or significant bleeding, and requires the expertise of a physician and medical staff, it is usually not advocated to perform this procedure purely for research purposes. For this reason we have only obtained excess samples from patients already undergoing bronchoscopy for clinical purposes. Both CysLT and PGE2 levels in LTRs are relatively high when compared to healthy subjects^{14;15;18-20}. Also, when CysLT/PGE2 ratios were analyzed a shift in the balance is observed one year post-transplant. A ratio over 1 is also associated with CMV infections, a major BOS risk factor. The group of patients having a higher balance of CysLT/PGE2 has an earlier onset of *Aspergillus*. A trend favouring a CysLT/PGE2 > 1 was observed with chronic lung rejection. Unusually, the inflammatory profile of these 2 groups is not significantly different. The different conditions studied are not associated with a particular inflammatory profile with the exception of chronic lung rejection which is associated with a lower lymphocyte count.

BAL eicosanoid levels have been reported for numerous lung pathologies. Reported BAL cysteinyl leukotriene levels in asthmatics subjects are as high as 616 pg/ml when challenged and around 60-80 pg/ml at baseline^{14;15}. Reported CysLTs levels in healthy subjects are much lower, often under 10pg/ml^{16;17}. In COPD subjects, BALf CysLT levels were comparable to healthy subjects and were relatively resistant to

inhaled corticosteroid therapy¹⁸. Our results reveal that CysLT levels in lung transplant recipients are higher than what is found in baseline asthmatic subjects and substantially higher than what is reported for healthy subjects and COPD subjects, which is often under 10pg/ml^{16;17}. Lung PGE2 levels differ greatly depending on the pathology, ranging from 838 pg/ml in eosinophilic bronchitis, to 43-62 pg/ml in COPD^{18;19}. However, our results demonstrate much higher PGE2 levels than what is reported for healthy subjects which are lower than 10 pg/ml¹⁸⁻²⁰.

Despite the immunosuppression status of the LTRs, the transplanted lung clearly features a different eicosanoid profile from the normal lung. Fifty three percent of our subjects presented a ratio of CysLT/PGE2 over 1. The imbalance in this portion of LTRs might predispose them to chronic lung rejection, and might be influenced by miscellaneous factors, including airway infections and the immunosuppressive regiment. Our Kaplan-Meier analysis of chronic rejection illustrated a trend suggesting a possible link with eicosanoid imbalance, which could be confirmed by a larger sample size. Studies have revealed that the induction of enzymes implicated in the synthesis of PGE2, such as COX-2 (cyclooxygenase-2) and mPGES-1 (microsomal prostaglandin E synthase-1), by different cytokines is inhibited by glucocorticosteroids²¹. On the other hand, glucocorticosteroids upregulate enzymes involved in the synthesis of CysLTs^{22;23}. In our study the immunosuppressive drugs prescribed varied from one subject to the other depending on their post-transplant course, with the exception of prednisone which was prescribed to all subjects. It is very likely that the use of this glucocorticosteroid has, in addition to other factors, an

impact on the eicosanoid balance in LTRs. With a bigger sample population it will be possible to study the eicosanoid balance in light of different treatment courses.

The onset time of chronic lung rejection after a lung transplant can be significantly variable from one patient to another. Although there is no established figure, most studies agree on a BOS onset time post-transplantation of 16 to 20 months²⁴, and will affect 41% LTRs at 5 year post-transplantation²⁵. Interestingly, our study reveals a peak in the number of samples with a ratio of CysLT/PGE2 >1 around one year post transplantation. This could suggest that the eicosanoid imbalance, peaking ahead of the onset of chronic allograft lung rejection, is part of a biological event leading towards the development of the pathology. However, most of the samples collected after 68 weeks post-transplantation had a CysLT/PGE2 ratio lower than one. It is possible that the eicosanoid imbalance is an early and transient process which leads to the development of BOS. We further performed correlation between the evolution of eicosanoid levels and known risk factor associated with BOS. After statistical confirmation of ratio stability over time, we separated the samples into 2 groups according to CysLT/PGE2 ratio allowing us to quickly correlate different clinical data with an eicosanoid imbalance. Several conditions and events have been identified as risk factors of BOS after lung transplantation. Acute lung rejection is probably the most important risk factor for BOS and has been the subject of many publications^{2;26;27}. Unfortunately from our 41 samples only one was collected during an episode of acute lung rejection, which prevents us from making any correlation with an eicosanoid imbalance.

CMV infection has been numerously linked with chronic rejection in the lung transplant population^{28;29}. The underlying mechanisms by which CMV contributes to chronic lung rejection have not been identified as to this day. The inflammatory response to the virus as an etiological factor is often implied, but has seldom been investigated. Studies have associated elevated chemokine levels in LTR BALf in response to CMV infection with increased mortality post transplant and BOS development³⁰. Our results demonstrate a clear link between active CMV infections and CysLT/ PGE2 >1. Recently CMV infection was associated with the upregulation of 5-LO *in vitro*³¹. In that study, CysLT synthesis was unaffected. However, *in vivo* the interactions with leukocytes, which are the main source of CysLTs, could mediate an increase in lung CysLT. Studies have described PGE2 production to be favoured by CMV infection and that PGE2 is as an effector in CMV pathogenesis. We observe the opposite with low levels of PGE2 in patients with active CMV infections³². We suggest that the LTR response to CMV infection differ from healthy individual with a predominant CysLT production over PG. This difference might be attributed either to an individual predisposition, or to the immunosuppressive status of the LTRs, or a combination of factors.

Although *Aspergillus* colonization burdens a large portion of LTRs it has only been very recently considered as a risk factor for BOS. One recent study by Weigt et al. reports *Aspergillus* colonisation as a risk for BOS³³. Our results associate an early onset of *Aspergillus* colonisation with a higher balance of CysLTs. *Aspergillus* colonisation has been linked with the release of pro-inflammatory cytokines and epithelial damage resulting in airway remodelling³⁴. On the other hand, eosinophils

stimulated with IgG-*Aspergillus fumigatus* antigen immune complexes generate LTC₄ in vitro³⁵. It remains to be established how lung eicosanoids levels are related to *Aspergillus* colonisation kinetics. *Aspergillus* colonisation might have a causative effect in the eicosanoid imbalance or might be a hallmark of an altered immune state that is also manifested by the eicosanoid imbalance. *Aspergillus* colonisation is also closely related to the immunosuppression status³⁶. The mechanisms by which immunosuppressive drugs favour *Aspergillus* colonisation in LTRs are still poorly understood since animal model does not always reflect what is observed in human beings^{37,38}.

Eicosanoid, leukotrienes in particular, are mainly produced by inflammatory cells. We were therefore expecting to find irregularities in BAL cellular profiles associated with samples presenting an eicosanoid imbalance. Our analysis however did not reveal any significant associations between BAL leukocyte profiles and an eicosanoid imbalance. We have on the other hand found a significant association between chronic rejection and a lower lymphocyte count. This is very surprising since chronic rejection is a pathology initiated by an inflammatory state. It is possible that the inflammatory state had ended and gave way to the fibroproliferative phase of the disease in our subjects at the moment of collection of the sample.

The observed eicosanoid imbalance could possibly be re-established in LTRs with anti-leukotriene drugs. Different studies have demonstrated these drugs to be non-toxic and to have beneficial effects in the settings of organ transplantation or fibrotic pulmonary pathologies. In a small group of patients, Montelukast, a leukotriene

receptor antagonist, was found to improve graft versus host disease manifestations, including BO¹³. In an experimental model of cyclosporine nephrotoxicity montelukast had a protective effects in the kidney and this toxicity-sparing effect was observed in humans^{13;39}. Others have revealed an anti-fibrotic and anti-remodelling properties of montelukast in asthmatic subjects and in a murine model of pulmonary fibrosis^{40;41}. These findings as well as our results argue in favour of a potential role of anti-leukotriene drugs in post-transplantation therapy.

We have demonstrated that the transplanted lung possesses a specific eicosanoid profile. However, the small sample size did not allow us to make robust associations with chronic rejection. Nevertheless, significant association was observed between the CysLT/PG ration and known BOS risk factors. A large proportion of our samples were obtained early post-transplantation, this factor contributed in reducing the amount of sample from subjects with chronic rejection. On the other hand, taking in consideration the stability of the ratio overtime, it will be possible to follow the evolution of these patients for further analysis.

In conclusion, our study is the first to describe the eicosanoid profile in the transplanted lung. An eicosanoid imbalance peaks in time at one year post transplant and is associated with known BOS risk factors, including CMV infections and *Aspergillus* colonisation. A long term post transplant follow up of these patients will allow us to link more robustly chronic rejection with this eicosanoid balance shift and ascertain it as a significant post transplantation event in the development of chronic lung allograft rejection.

Acknowledgments:

Merck Frosst for the Investigator Initiated Study Program holds by CB. CB is a recipient of a « chercheur-boursier clinicien » of the « Fonds de Recherche en Santé du Québec ». SP was a recipient of the Quebec respiratory health network training program stipendium. We also express thanks to M. Miguel Chagnon from University of Montreal for the statistical analysis.

Tableau III. Demographic characteristics of studied population.

Characteristics	
Number of patients	30
Gender male / female	20 / 10
Transplant type SLT / BLT	5 / 25
Median age at transplant (range)	50.00 (23 - 67)
Number of BALf	41
Median weeks post transplant (range)	36.29 (0.86 – 275.14)
Pre-transplant disease n (%)	
Chronic obstructive pulmonary disease	8 (27)
Cystic fibrosis	15 (50)
Idiopathic pulmonary fibrosis	5 (17)
Bronchiectasis	2 (7)

SLT, Single Lung Transplant; BLT, Bilateral Lung Transplant.

Tableau IV. Characteristics of the studied population according to CysLT/PGE2 ratio.

Characteristics	CysLT/PGE2 < 1	CysLT/PGE2 > 1	P value
Number of patients	14	16	-
Gender male / female	13/1	9/10	0.076 & 0.237 ^a
Transplant type SLT / BLT	1/13	4/15	0.647 & 0.720 ^a
Median age at transplant (range)	45.5 (26-65)	52.3 (23-67)	0.4119 ^b
Samples size	16	25	-
Median weeks post transplant (range)	47.43 (0.86- 275.1)	47.07 (1.71-87.43)	0.1026 ^b
Pre-transplant disease n (%)			
Chronic obstructive pulmonary disease	3 (21)	5 (31)	
Cystic fibrosis	8 (57)	7 (44)	0.6362 ^d
Idiopathic pulmonary fibrosis	2 (14)	3 (19)	
Other	1 (7)	1 (6)	

SLT, Single Lung Transplant; BLT, Bilateral Lung Transplant.

^a Gender and transplant type were analysed by Fisher's exact test

Median age at transplant was analysed by two-tailed Student's *t*-test ^c with or ^b without Welch's correction

^d Pre-transplant disease was analysed by chi-squared test

Tableau V. Bronchoalveolar lavage fluid cellular profile according to CysLT/PGE2 ratio.

	CysLT/PGE2 < 1	CysLT/PGE2 > 1	P
	mean (range)	mean (range)	value
Total cell count x10 ⁵ cells	236.94 (4.47-1731.10)	63.76 (4.70-672.24)	
Eosinophils x10 ⁵ cells	0.53 (0.00-3.39)	0.30 (0.00-4.31)	0.7171
Percentage (%)	0.69 (0.00-6.16)	0.27 (0.00-0.91)	
Neutrophils x10 ⁵ cells	218.79 (0.04-1711.60)	44.40 (0.30-599.75)	0.8516
Percentage(%)	28.57 (0.25-98.87)	30.40 (0.51-89.22)	
Macrophages x10 ⁵ cells	16.77 (4.03-47.49)	18.45 (3.46-63.86)	0.7238
Percentage(%)	69.12 (1.00-98.87)	67.81 (9.50-99.11)	
Lymphocytes x10 ⁵ cells	0.85 (0.00-8.48)	0.60 (0.00-4.31)	0.6474
Percentage(%)	1.62 (0.00-5.73)	1.52 (0.00-5.19)	

P value calculated by Student's t test

Tableau VI. Bronchoalveolar lavage fluid cellular profile according to clinical conditions

	P	value	P	value	P	value	P	value
	Eosinophils		Neutrophils		Macrophages		Lymphocytes	
Chronic rejection	0.054		0.604		0.809		0.041	
CMV	0.625		0.487		0.889		0.522	
<i>Aspergillus</i>	0.657		0.455		0.483		0.533	

P values were calculated by Mann-Whitney U test

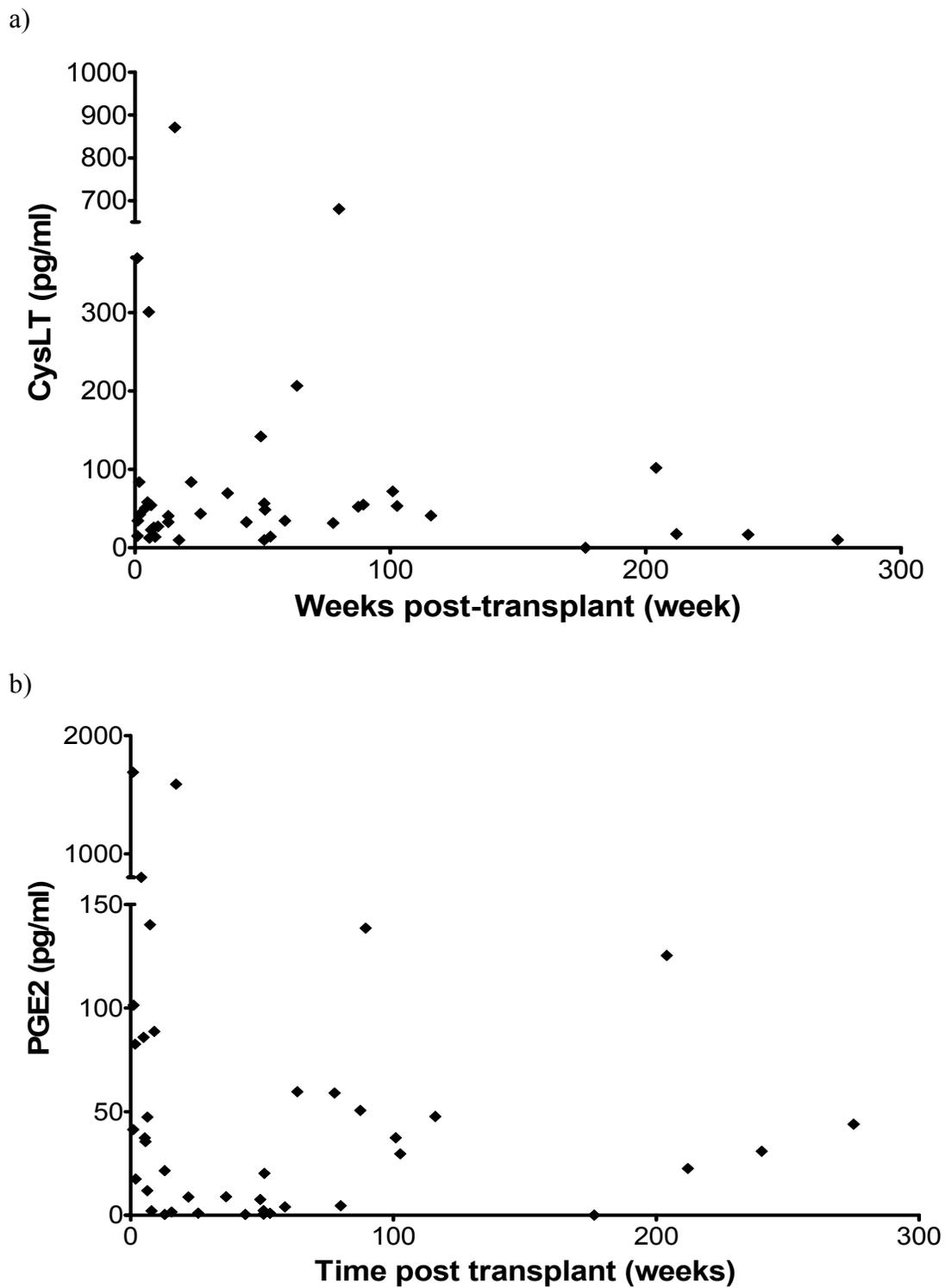


Figure 5. Eicosanoid levels post-transplantation

41 BALf samples from 30 different LTRs were collected at different times post-transplantation (0.86 – 275.14 weeks) and quantified for CysLTs (a) and PGE2 (b).

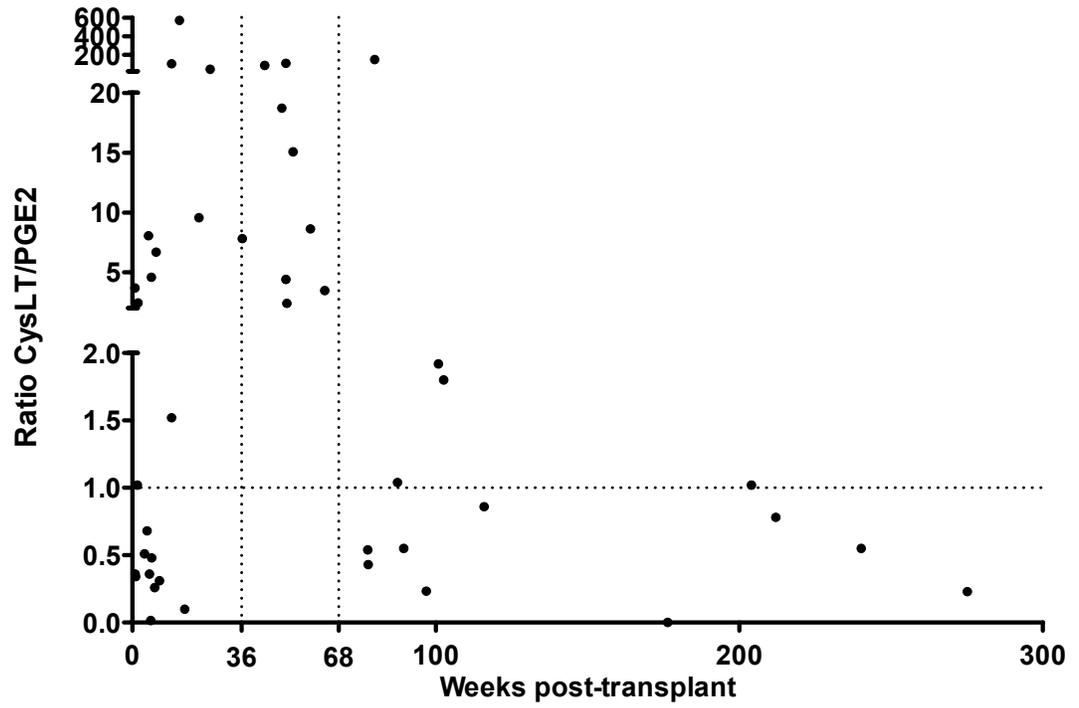


Figure 6. CysLT/PGE2 ratio post-transplantation

For each sample CysLT/PGE2 ratio was calculated. At 52 week \pm 16 all 9 samples had a ratio >1 .

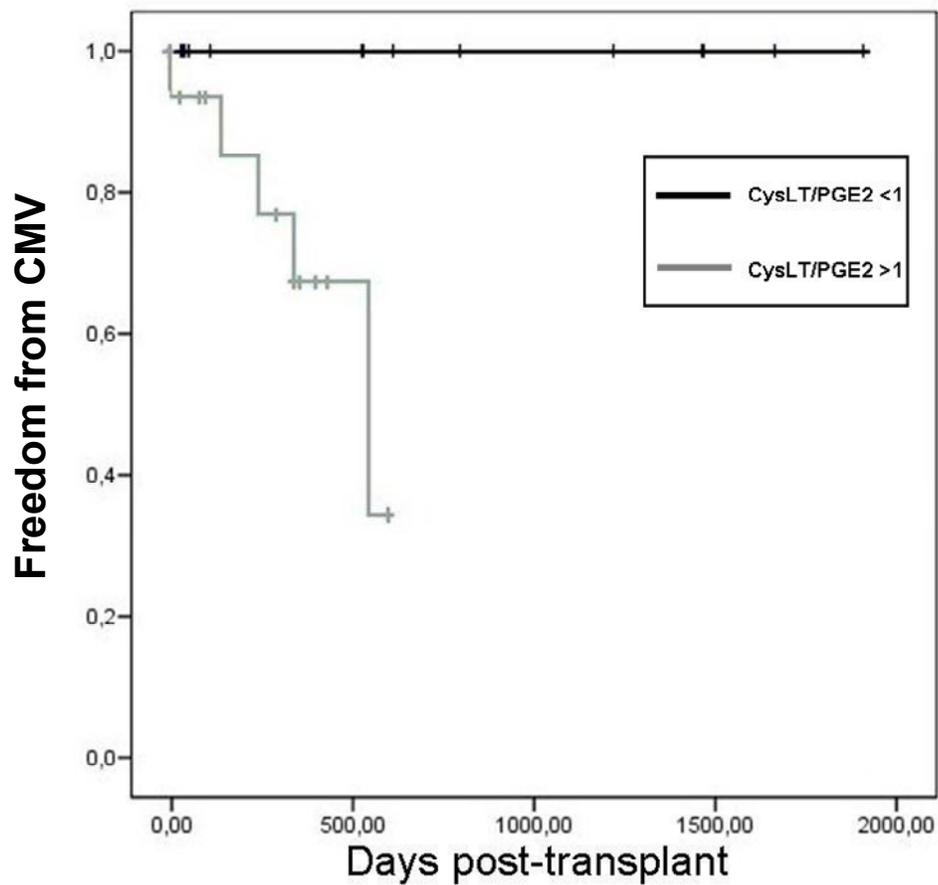


Figure 7. Kaplan–Meier representation of freedom from CMV infection according to CysLT/PGE2 ratio. CysLT <1: dark, CysLT >1: light. The difference between these groups was significant ($p=0.022$) when tested by means of Mantel-Cox log-rank testing.

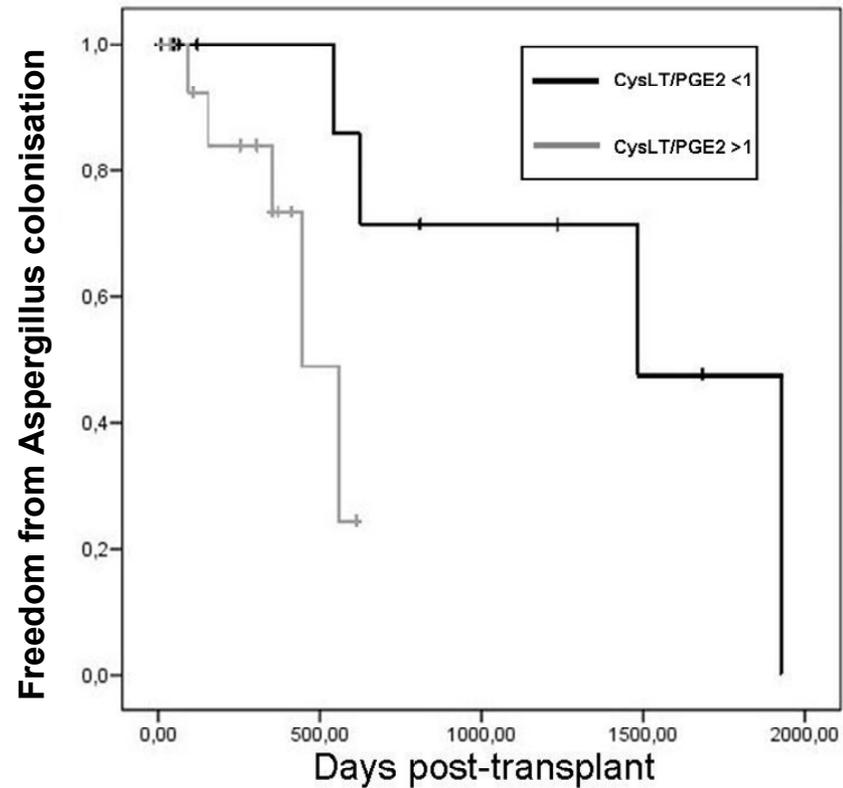


Figure 8. Kaplan–Meier representation of freedom from *Aspergillus* colonisation according to CysLT/PGE2 ratio. CysLT <1: dark, CysLT >1: light. The difference between these groups was significant ($p=0.030$) when tested by means of Mantel-Cox log-rank testing.

References

- (1) Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC et al. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(1):108-121.
- (2) Estenne M, Maurer JR, Boehler A et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(3):297-310.
- (3) Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy* 2009; 64(6):823-839.
- (4) Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA et al. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(1 Suppl):S18-S34.
- (5) Charbeneau RP, Peters-Golden M. Eicosanoids: mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108(6):479-491.
- (6) Asakura T, Ishii Y, Chibana K et al. Leukotriene D4 stimulates collagen production from myofibroblasts transformed by TGF-beta. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(2):310-315.
- (7) Yoshisue H, Kirkham-Brown J, Healy E et al. Cysteinyl leukotrienes synergize with growth factors to induce proliferation of human bronchial fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(1):132-140.
- (8) Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA et al. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE2. *Trends Immunol* 2004; 25(1):40-46.

- (9) Jones RL, Qian Y, Wong HN et al. Prostanoid action on the human pulmonary vascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24(12):969-972.
- (10) Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C et al. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(2):L405-L413.
- (11) Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J et al. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(5):537-544.
- (12) Shimizu N, Kita T, Aoe M et al. Changes in levels of arachidonic acid metabolites in blood and bronchoalveolar lavage fluid after warm ischemia-reperfusion of lung. *Acta Med Okayama* 1991; 45(6):417-422.
- (13) Or R, Gesundheit B, Resnick I et al. Sparing effect by montelukast treatment for chronic graft versus host disease: a pilot study. *Transplantation* 2007; 83(5):577-581.
- (14) Wenzel SE, Larsen GL, Johnston K et al. Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(1):112-119.

- (15) Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O et al. Leukotrienes, LTC₄ and LTB₄, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84(1):19-26.
- (16) Kim CK, Koh JY, Han TH et al. Increased levels of BAL cysteinyl leukotrienes in acute [corrected] RSV bronchiolitis. *Acta Paediatr* 2006; 95(4):479-485.
- (17) Piotrowski WJ, Antczak A, Marczak J et al. Eicosanoids in exhaled breath condensate and BAL fluid of patients with sarcoidosis. *Chest* 2007; 132(2):589-596.
- (18) Verhoeven GT, Garrelds IM, Hoogsteden HC et al. Effects of fluticasone propionate inhalation on levels of arachidonic acid metabolites in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mediators Inflamm* 2001; 10(1):21-26.
- (19) Sastre B, Fernandez-Nieto M, Molla R et al. Increased prostaglandin E₂ levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy* 2008; 63(1):58-66.
- (20) LeFever A, Funahashi A. Elevated prostaglandin E₂ levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with bronchogenic carcinoma. *Chest* 1990; 98(6):1397-1402.
- (21) Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H et al. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 2001; 167(1):469-474.

- (22) Riddick CA, Ring WL, Baker JR et al. Dexamethasone increases expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in human monocytes and THP-1 cells. *Eur J Biochem* 1997; 246(1):112-118.
- (23) Zaitse M, Hamasaki Y, Aoki Y et al. A novel pharmacologic action of glucocorticosteroids on leukotriene C4 catabolism. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(1):122-124.
- (24) Boehler A, Estenne M. Post-transplant bronchiolitis obliterans. *Eur Respir J* 2003; 22(6):1007-1018.
- (25) Trulock EP, Christie JD, Edwards LB et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(8):782-795.
- (26) Bando K, Paradis IL, Similo S et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110(1):4-13.
- (27) Yousem SA, Dauber JA, Keenan R et al. Does histologic acute rejection in lung allografts predict the development of bronchiolitis obliterans? *Transplantation* 1991; 52(2):306-309.
- (28) Girgis RE, Tu I, Berry GJ et al. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(12):1200-1208.

- (29) Keenan RJ, Lega ME, Dummer JS et al. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 1991; 51(2):433-438.
- (30) Weigt SS, Elashoff RM, Keane MP et al. Altered levels of CC chemokines during pulmonary CMV predict BOS and mortality post-lung transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8(7):1512-1522.
- (31) Qiu H, Straat K, Rahbar A et al. Human CMV infection induces 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 2008; 205(1):19-24.
- (32) Hooks JJ, Chin MS, Srinivasan K et al. Human cytomegalovirus induced cyclooxygenase-2 in human retinal pigment epithelial cells augments viral replication through a prostaglandin pathway. *Microbes Infect* 2006; 8(8):2236-2244.
- (33) Weigt SS, Elashoff RM, Huang C et al. *Aspergillus* colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2009; 9(8):1903-1911.
- (34) Tomee JF, Wierenga AT, Hiemstra PS et al. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis* 1997; 176(1):300-303.

- (35) Cromwell O, Moqbel R, Fitzharris P et al. Leukotriene C4 generation from human eosinophils stimulated with IgG-*Aspergillus fumigatus* antigen immune complexes. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82(4):535-543.
- (36) Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell* 2007; 6(11):1953-1963.
- (37) Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 125(1-2):47-70.
- (38) Balloy V, Huerre M, Latge JP et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 2005; 73(1):494-503.
- (39) Atakan A, Arikan H, Macunluoglu B et al. Renal protective effects of leukotriene receptor blockers in an experimental model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2008; 40(1):279-284.
- (40) Izumo T, Kondo M, Nagai A. Cysteinyl-leukotriene 1 receptor antagonist attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Life Sci* 2007; 80(20):1882-1886.
- (41) Kelly MM, Chakir J, Vethanayagam D et al. Montelukast treatment attenuates the increase in myofibroblasts following low-dose allergen challenge. *Chest* 2006; 130(3):741-753.

Chapitre 3

Le rôle des CysLT dans la transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*

Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs

La bronchiolite oblitérante est un important facteur limitant à la survie à long terme suivant la transplantation pulmonaire. La bronchiolite oblitérante est caractérisée par une inflammation des voies respiratoires, suivi d'un processus fibroproliférative qui mène finalement à l'oblitération des bronchioles. Il a été suggéré que le processus fibroproliférative soit une conséquence d'une réparation tissulaire anormale. La BO a récemment été associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les leucotriènes sont des médiateurs lipidiques fréquemment liés au processus fibrotique. Nous proposons que le LTD4 induise la TEM dans les cellules épithéliales bronchiques, contribuant au processus de fibrose dans la bronchiolite oblitérante.

Ce chapitre présente les effets du LTD4, le CysLT ayant la plus grande affinité aux récepteurs des CysLT, dans la modulation de l'expression des marqueurs de la TEM dans des cellules bronchiques humaines. En résumé, la stimulation par le LTD4 à la capacité de réprimer les marqueurs épithéliaux (E-cadhérine et cytokératine) au niveau protéique. Nos paramètres expérimentaux ne nous ont cependant pas permis d'observer la stimulation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (collagène I et α -SMA) par le LTD4.

Dr Céline Bergeron a élaborée l'hypothèse de recherche ainsi que le protocole initial de recherche. Cette portion du projet est également financée par Merck, faisant

partie de la même subvention décrite dans le chapitre 2. Le Dr Bergeron a également supervisé les travaux et a participé à la rédaction finale du manuscrit. J'ai réalisé la majorité des expériences de laboratoire, procédé à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit. Areej Al-Rabea, étudiante à la maîtrise a contribué à certaines expériences d'immunofluorescence.

Résumé français :

Introduction : La bronchiolite oblitérante est la principale cause de morbidité et de mortalité tardive suivant la transplantation pulmonaire. Cette pathologie se caractérise par une inflammation des voies respiratoires, suivie d'un processus fibroprolifératif menant à l'oblitération des bronchioles. La BO a récemment été associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les leucotriènes sont des médiateurs lipidiques associées à plusieurs maladies ayant une composante fibrotique. Nous proposons que le LTD4, un cysteinyl-leucotriène, induise la TEM dans les cellules épithéliales bronchiques, contribuant au processus de fibrose dans la bronchiolite oblitérante. **Matériel et Méthode :** Afin de vérifier notre hypothèse nous avons stimulé des cellules bronchiolaires humaines avec différentes concentrations de LTD4. Par la suite l'expression de marqueurs de la TEM a été évaluée par PCR en temps réel et par immunofluorescence. **Résultats :** La stimulation des cellules bronchiolaires humaines par le LTD4 a la capacité de réprimer les marqueurs épithéliaux (E-cadhérine et cytokératine) au niveau protéique. Par contre, nos paramètres expérimentaux ne nous ont pas permis d'observer la stimulation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (collagène I et α -SMA) par le LTD4. **Conclusion :** Des nouvelles expériences, qui prendraient en compte les éventuels effets synergiques d'autres médiateurs, des temps de stimulation plus longs et/ou la co-stimulation par des immunosuppresseurs, sont nécessaires afin de déterminer si le CysLT contribue réellement à la TEM dans les voies respiratoires.

**Leukotrienes and airway epithelial to mesenchymal transition – implications in
Broncholitis Obliterans**

**Stanislaw Ptaszynski, Areej Al Rabea, Céline Bergeron
Centre de recherche CHUM- Hotel-Dieu, Montreal, Quebec, Canada**

Introduction

Lung transplantation is the only therapeutic alternative for many end-stage lung diseases. Improvements in organ preservation and lung transplantation techniques as well as better immunosuppressive regimen have permitted an increased short and medium term post transplant survival. However, long term survival is still a major limitation, and stands around 50% at 5-year post-transplantation, mainly due to bronchiolitis obliterans¹. Bronchiolitis obliterans (chronic lung rejection) is the main cause of long term mortality after a lung transplant. This pathology is characterized by airway infiltration of leukocytes, followed by a fibroproliferative process leading ultimately to the obliteration of respiratory and terminal bronchioles. The fibroproliferative course observed in the peripheral airways of bronchiolitis obliterans is marked by the formation of fibrous polyps in the luminal and by features of remodeling such as increased subepithelial collagen deposition, thickening of the reticular membrane, myofibroblast transdifferentiation and increased airway vascular area²⁻⁵. Airway epithelial damage is observed in bronchiolitis obliterans and the fibroproliferative process is thought to be an anomalous healing response and has been recently suggested to involve epithelial-mesenchymal transition (EMT)⁶. EMT is a process by which cells lose their epithelial phenotype to acquire mesenchymal properties⁷. This process has mostly been studied as a mechanism underlying fibrosis in renal and lens epithelium but has been linked to fibrosis in the lung as well⁷. Leukotrienes are proinflammatory mediators well known for their implications in asthma pathogenesis that have also been frequently linked with fibrosis⁸. Studies have reported high levels of cysteinyl leukotrienes in the broncho-alveolar lavage fluid and in the blood of transplanted animals⁹. We suggest that LTD4 induces epithelial to

mesenchymal transition in bronchial epithelial cells, contributing to the remodeling process of bronchiolitis obliterans. Our aim was to study the mRNA expression of EMT markers, in human airway epithelial cells in the presence of cysteinyl leukotrienes.

Methods

Cell culture

Human small airway epithelial cells (SAEC) were grown in complete epithelial cell (Lonza) until confluence. At 100% confluence complete medium was aspirated and replaced with RPMI containing increasing doses of LTD₄ (0, 1, 10, 100, and 1000 ng/ml) with a positive control (TGF- β , 10ng/ml) for a period of 24h (RNA) and 48h (protein). Cells from 3 different individuals were used to obtain a biological triplicate (n=3).

Detection of EMT at mRNA level by real-time PCR analysis

Total RNA was extracted (RNeasy kit; Qiagen) cDNA synthesized (SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen). Collagen IA1 and α -SMA (alpha-smooth muscle actin) mRNA expression was measured using real-time RT-PCR (SYBR Green PCR Master Mix; Invitrogen). Relative expression of gene transcripts was expressed in X folds of the negative control (RPMI) and normalized to beta-2-microglobulin expression (B2MG).

Detection of EMT at protein level by immunofluorescence

Immunofluorescence stainings using mouse monoclonal antibodies against alpha-

smooth muscle actin (Sigma), collagen I (Abcam), cytokeratin and E-Cadherin, and goat anti-mouse secondary antibody marked with Alexa 488 (Invitrogen) on SAEC grown in chamber slides (Labtek) was performed to assess protein expression and cellular morphology. Counterstaining with Hoechst is done to allow nuclear identification. Slides are analyzed with fluorescent microscopy, in which nuclei appear blue and specific signals appear green.

Statistical analysis

Data is expressed in means \pm SEM. A paired Student's *t* test was used to determine which groups showed significant differences. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

We examined if LTD4 could promote the transition of airway cells from an epithelial phenotype to a mesenchymal phenotype, as denoted by the expression of increased levels of α -SMA and collagen IA1. Serum-starved, human small airway epithelial cells express little collagen and α -SMA mRNA at baseline but exhibit marked induction following incubation with TGF- β 1, as it is demonstrate in Figures 10 and 11 . By incubating these cells for 24h with different doses of LTD4 we assessed its ability to induce EMT. As illustrated in Figures 10 and 11, LTD4 does not promote significantly the expression of collagen IA1 and α -SMA mRNA when compared to RPMI alone. At the highest and non physiological dose of 1000ng/ml, LTD4 seems to decrease the expression of α -SMA (Figure 11). However this decrease is not statistically significant ($p=0,08$). The protein expression of EMT markers was then

assessed by immunofluorescence (Figure 12). At baseline (RPMI), human small airway epithelial cells express low level of mesenchymal markers (collagen and α -SMA proteins) and high level of epithelial markers (cytokeratin and E-Cadherin). When stimulated by TGF- β 1 for 48 hours, a decreased in cytokeratin and E-Cadherin protein expression is observed, whereas collagen I and α -SMA protein expression is unaffected (Figure 12). Both LTD4 concentrations of 10 and 100 ng/ml did not increased the protein expression of collagen I and α -SMA. However, a decreased in epithelial markers is observed with both LTD4 concentration (Figure 12).

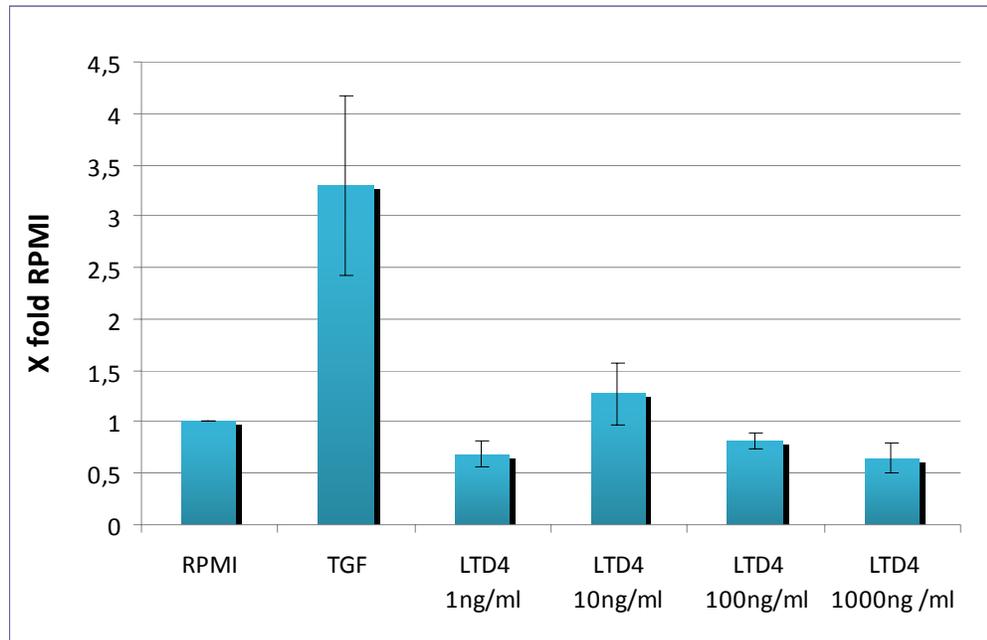


Figure 10. Effect of LTD4 on collagen IA1 transcript expression in human small airway epithelial cells. SAEC cells were grown to confluence in complete medium. The medium was replaced with RPMI alone, containing TGF- β 1 (10 ng/ml) or LTD4 at increasing doses (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml or 1000ng/ml). Cells were incubated for 24 h and harvested for real-time PCR analysis. Mean \pm SEM, paired t test (n=3).

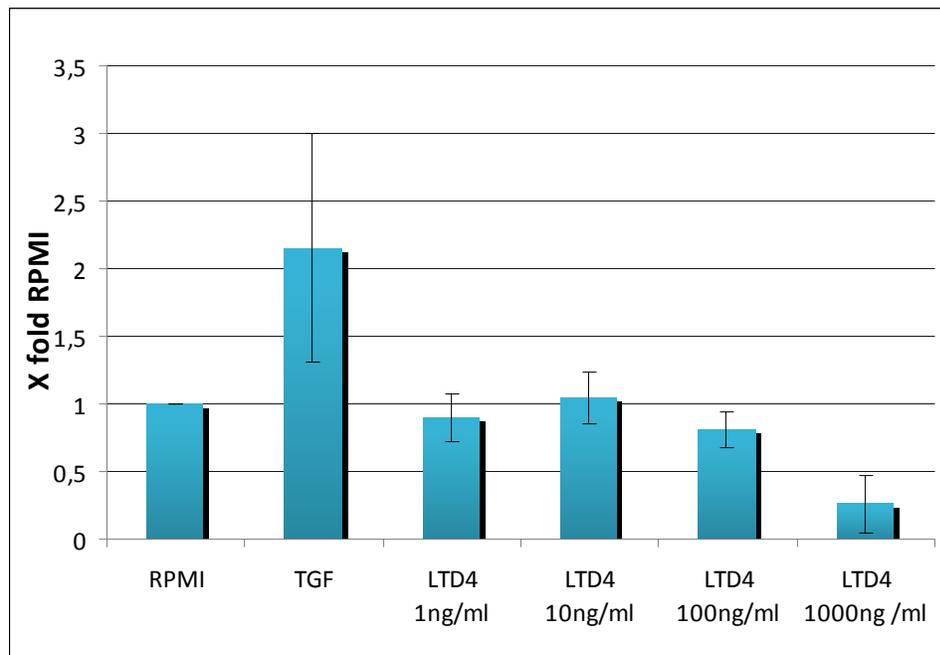


Figure 11. Effect of LTD4 on alpha-smooth muscle actin transcript expression in human small airway epithelial cells. SAEC cells were grown to confluence in complete medium. The medium was replaced with RPMI alone, containing TGF- β 1 (10 ng/ml) or LTD4 at increasing doses (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml or 1000ng/ml). Cells were incubated for 24 h and harvested for real-time PCR analysis. Mean \pm SEM, paired t test (n=3).

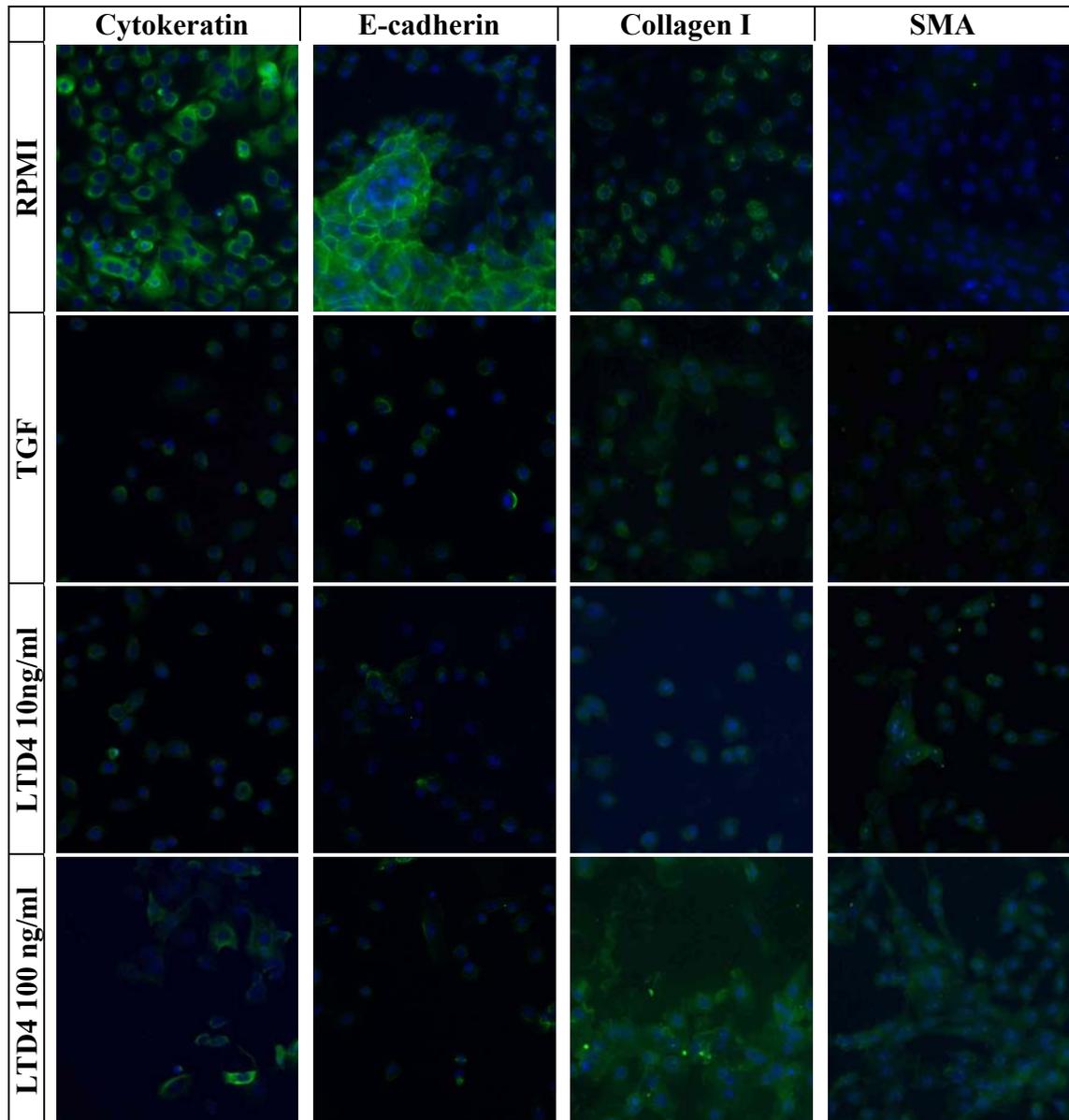


Figure 12. Effect of LTD4 on EMT protein markers expression.

Immunofluorescence staining of SAEC stimulated with increasing doses of LTD4 (10 ng/ml and 100 ng/ml) for a period of 48h with a negative control (RPMI) and a positive control (TGF- β 10ng/ml). The cells were stained with anti-Ecadherin, anti-cytokeratin, anti- α -SMA, anti-collagen I primary antibodies and Alexa-488 conjugated secondary antibody, with a Hoechst counterstaining (n=3).

Discussion

We do not provide evidence that CysLTs can promote mesenchymal markers in cultured human small airway epithelial cells. However, we demonstrate a decrease in the epithelial markers expression. Our results suggest that CysLTs might initiate the EMT process and that a longer stimulation time and/or a co-mediator are required to express the complete EMT phenotype. However achieving longer stimulation will be challenging. Indeed, to eliminate any possible contribution of growth factors found in serum to the process of EMT, we serum-starved our cells. We have, however, noticed high levels of cell death in SAEC when serum starvation exceeded 72 hours. A gradual starvation, to avoid the shock of the sudden withdrawal of serum, could enable us to achieve a longer stimulation time. At high dose LTD4 demonstrates a trend in suppression of the expression of collagen IA1 and α -SMA mRNA, this trend is however not statistically significant ($p=0,08$). This trend could be explained by an oxidative effect of CysLTs at high doses or some other effect that is not mediated by the CysLT receptors and that could affect the expression of some genes such as collagen I and α -SMA¹⁰. Studies have shown that LTC4 is able to suppress NF- κ B activation by changing the intracellular GSH/GSSG ratio, and therefore downregulate the expression of collagen and α -SMA¹⁰. Furthermore these high doses largely exceed what is found in human lungs, which is in the picomolar range, as well as the EC50 of CysLTs (LTD4 = 2.5 nM, LTC4 = 24 nM, LTE4 = 240 nM) and therefore are not physiologically relevant¹¹⁻¹³. Also, the constrained *in vitro* setting of our experiment does not account for cell to cell interaction and other factors which could be crucial to the process of EMT. *In vitro* cell culture experiments have limitations in reflecting *in vivo* biology; this may be particularly true in studies of EMT and more

so in the context of lung transplantation where the human lung homeostasis is affected by multiple factors such as immunosuppression and specific immune profile associated with alloreactivity. Other groups have shown in animals the importance of CysLTs in airway remodeling, however, its role was upstream from that of EGF receptor¹⁴. The existence of a paracrine cascade mediating the process of EMT and involving EGF or another growth factor is possible and could call for longer stimulation time. Consequently, it remains unknown if CysLT stimulation as the potential to contribute to EMT in small airway epithelial cell and *in vivo* during bronchiolitis obliterans. Further experimentation, which would take into account possible synergistic effects of other mediators, longer stimulation time and/or co-stimulations with immunosuppressive drugs, are necessary in order to determine if CysLTs can contribute to EMT in the airways.

References

- (1) Burton CM, Carlsen J, Mortensen J et al. Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(7):681-686.
- (2) Zhang S, Smartt H, Holgate ST et al. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an *in vitro* co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest* 1999; 79(4):395-405.

- (3) Belperio JA, Keane MP, Burdick MD et al. Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1150-1162.
- (4) Ward C, De SA, Fisher AJ et al. Reticular basement membrane thickening in airways of lung transplant recipients is not affected by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(12):1905-1909.
- (5) Ramirez AM, Shen Z, Ritzenthaler JD et al. Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: tgf-beta signaling through smad3-dependent and -independent pathways. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2080-2088.
- (6) Ward C, De SA, Fisher AJ et al. A descriptive study of small airway reticular basement membrane thickening in clinically stable lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(5):533-537.
- (7) Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(4):377-382.
- (8) Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA et al. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(1 Suppl):S18-S34.
- (9) Shimizu N, Kita T, Aoe M et al. Changes in levels of arachidonic acid metabolites in blood and bronchoalveolar lavage fluid after warm ischemia-reperfusion of lung. *Acta Med Okayama* 1991; 45(6):417-422.

- (10) Wang J, Mochizuki H, Todokoro M et al. Does leukotriene affect intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells? *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(4):821-828.
- (11) Sarau HM, Ames RS, Chambers J et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 1999; 56(3):657-663.
- (12) Wenzel SE, Larsen GL, Johnston K et al. Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(1):112-119.
- (13) Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O et al. Leukotrienes, LTC4 and LTB4, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84(1):19-26.
- (14) Tamaoka M, Hassan M, McGovern T et al. The epidermal growth factor receptor mediates allergic airway remodelling in the rat. *Eur Respir J* 2008; 32(5):1213-1223.

Chapitre 4

Discussion

Nous avons émis l'hypothèse qu'un déséquilibre des CysLT sur le PGE2 existe dans le poumon transplanté avec des implications dans le rejet chronique pulmonaire. L'analyse des échantillons de LBA de greffés nous a permis de quantifier précisément les niveaux des CysLT et de PGE2 retrouvées dans le poumon à un moment précis. Chez les greffés, les niveaux des CysLT et de PGE2, sont élevés par rapport à ce qui est rapporté pour les sujets sains. D'autre part, lorsque les ratios CysLT/PGE2 ont été analysés, un changement dans l'équilibre a été observé à un an post-transplantation. Un ratio supérieur à 1 a également été associé aux infections à CMV, un important facteur de risque du SBO. Une apparition plus précoce de la colonisation par *Aspergillus* était associée à un ratio de CysLT/PGE2 supérieur à 1. Une tendance favorisant un ratio CysLT/PGE2 >1 été observée avec le rejet chronique. Curieusement, le profil inflammatoire du LBA de ces 2 groupes n'était pas significativement différent. Les différentes conditions cliniques étudiées n'ont pas été associées à un profil inflammatoire particulier non plus, à l'exception du rejet chronique pulmonaire qui était associé à un compte inférieur de lymphocytes. Notre seconde hypothèse proposait l'implication des CysLT dans le processus fibrotique de la BO par l'activation de la TEM. Les paramètres expérimentaux de notre étude ne nous ont pas permis de démontrer l'induction de l'expression des marqueurs mésenchymateux par les CysLT. Toutefois, la stimulation par les CysLT avait la capacité de réprimer certains marqueurs du phénotype épithélial chez les cellules SAEC.

4.1 Déséquilibre d'eicosanoïdes dans le poumon greffé

Nous avons démontrés la présence de taux élevés de CysLT et de PGE2 dans les poumons des sujets greffés. En effet, les taux observés étaient plus élevés comparativement à ce qui a déjà été rapporté chez les sujets sains. Donc, une grande quantité de médiateurs inflammatoires de type CysLT et PGE2 est présente dans les poumons des greffés pulmonaires malgré l'état hautement immunosupprimé. Les CysLT sont des médiateurs contribuant de façon importante à la pathologie de l'asthme et ont la capacité de recruter des cellules inflammatoires, d'induire la bronchoconstriction, l'hypersécrétion du mucus et l'œdème dans le poumon¹⁴¹. Les taux moyens de CysLT dans le poumon d'un sujet asthmatique varient beaucoup, d'environ 40 pg/ml à plus de 600 pg/ml selon le type d'asthme et l'état du sujet (provoqué ou non)^{173;174}. Il existe peu de données pour les pathologies autres que l'asthme. Toutefois les taux moyens de CysLT qui ont été rapportés chez les sujets sains se situent souvent en dessous de 10 pg/ml^{175;176}, ce qui est largement inférieur à ce que nous avons trouvé pour les sujets transplantés qui étaient de $96,12 \pm 173,69$ pg/ml. Les taux moyens que nous avons retrouvés chez les sujets transplantés étaient également plus hauts que ce qui est retrouvé dans certaines pneumopathologies telles que la sarcoïdose (27.82 ± 6.65 pg/mL) et les infections au virus respiratoire syncytial (21.9 ± 23.3 pg/ml)^{175;176}. Les taux de PGE2 pulmonaires que nous avons trouvés chez les sujets transplantés étaient de $134,08 \pm 367,29$ pg/ml, ce qui est largement supérieur à ce qui est rapporté pour les sujets sains, qui se situent également autour de 10 pg/ml^{177;179}. Selon la pathologie, les taux de PGE2 diffèrent grandement, allant de 838 pg/ml dans la bronchite éosinophilique à 43-62 pg/ml dans la MPOC^{177 178}. Nos

résultats présentent donc des taux d'eicosanoïdes irréguliers et peut-être même pathologiques dans les poumons de patients greffés du poumon.

4.2 Rôle des glucocorticostéroïdes dans le déséquilibre des eicosanoïdes

Dans le traitement de l'asthme les corticostéroïdes permettent de contrôler l'inflammation qui contribue au remodelage, mais ne ciblent pas spécifiquement ce processus. Donc, le remodelage bronchique persiste malgré un contrôle optimal de l'inflammation chez les sujets asthmatiques¹⁸⁰. D'autre part, les corticostéroïdes ne réduisent pas les taux pulmonaires des CysLT chez les sujets asthmatiques¹⁸¹. Dans les modèles d'asthme chez l'animal, les antagonistes des récepteurs des CysLT ont montré une capacité à prévenir et même inverser le remodelage bronchique^{153;154}. Tout comme les sujets asthmatiques, les sujets transplantés ont des taux élevés d'eicosanoïdes pulmonaires malgré l'immunosuppression. Il est donc possible que les taux élevés de CysLT que nous avons trouvés chez les sujets transplantés pourraient avoir un rôle important dans le processus fibrotique de la BO, semblablement au rôle des eicosanoïdes dans le remodelage bronchique dans l'asthme.

Le poumon transplanté démontre clairement un profil d'eicosanoïdes différent de celui du poumon normal et ceci malgré l'état d'immunosuppression des greffés. Cinquante-trois pour cent de nos sujets présentaient un ratio de CysLT/PGE2 plus élevé que 1. Ce déséquilibre pourrait prédisposer les greffés au rejet chronique pulmonaire, et pourrait être influencés par divers facteurs, y compris les infections des voies respiratoires et les immunosuppresseurs. Notre analyse de Kaplan-Meier du

rejet chronique illustre une tendance suggérant un lien possible avec un déséquilibre des eicosanoïdes, ce qui pourrait être confirmé par un échantillon plus important (Figure 9, p. 70). Des études ont révélé que l'induction des enzymes impliquées dans la synthèse de la PGE2, tels que COX-2 et la PGE synthase microsomale (mPGES-1), par différentes cytokines est inhibée par les glucocorticostéroïdes¹⁸². Il est possible de présumer que la PGE2 serait partiellement inhibée chez les greffés par la prise de corticostéroïdes ce qui favoriserait un ratio CysLT/PGE2 >1. D'autre part, les glucocorticoïdes peuvent stimuler l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de CysLT. En effet, le dexaméthasone stimule, de façon dose-dépendante, l'expression de la 5-LO et de FLAP dans les monocytes *in vitro*¹⁸³. Dans notre étude, les médicaments immunosuppresseurs prescrits varient d'un sujet à l'autre en fonction de leurs parcours post-greffe, à l'exception de la prednisone, qui a été prescrite à tous les sujets. Il est très probable que l'utilisation de ce glucocorticostéroïde, en plus d'autres facteurs, ait un impact sur l'équilibre des eicosanoïdes chez les greffés.

4.3 Associations avec les facteurs de risque du SBO et le temps post-greffe

L'avènement du rejet chronique pulmonaire après une greffe de poumons varie d'un patient à l'autre. Par contre, bien qu'il n'existe aucun chiffre établi, plusieurs études s'accordent sur un temps post-greffe de 16 à 20 mois pour l'apparition du rejet chronique⁷, qui affectera 41% des greffés à 5 années post-transplantation¹⁸⁴. Il est intéressant de voir qu'à environ un an post-greffe notre étude révèle un pic dans le nombre d'échantillons ayant un ratio de CysLT/PGE2 > 1. Ceci pourrait suggérer que le déséquilibre des eicosanoïdes en faveur des CysLT qui

atteint un sommet avant l'apparition de rejet chronique, est impliqué dans un événement biologique en amont qui pourrait conduire au développement de la pathologie. Cependant, la plupart des échantillons prélevés après 68 semaines post-transplantation avaient un ratio inférieur à un CysLT/PGE2. Il est possible que le déséquilibre des eicosanoïdes soit un processus précoce et transitoire qui conduit au développement du SBO. D'autre part, nous avons effectué des corrélations entre l'évolution des taux d'eicosanoïdes et des facteurs de risque connus associés à la BO. Nous avons tout d'abord confirmé la stabilité des taux d'eicosanoïdes chez les sujets à travers le temps. Ensuite, nous avons séparé les échantillons en deux groupes en fonction du rapport CysLT/PGE2, ce qui nous a permis de corréler rapidement différentes données cliniques, avec un déséquilibre des eicosanoïdes. Plusieurs conditions et événements ont été identifiés comme facteurs de risque de la BO, dont le rejet aigu, les infections au CMV et la colonisation par *Aspergillus*. Le rejet aigu pulmonaire est probablement le plus important facteur de risque pour la BO et a fait l'objet de nombreuses publications^{14,16,20,185}. De nos 41 échantillons seulement un échantillon a été prélevé au cours d'un épisode de rejet aigu, ce qui nous empêche de faire une corrélation avec un déséquilibre des eicosanoïdes et les épisodes de rejet aigu.

4.3.1 Association du déséquilibre d'eicosanoïdes avec l'infection au CMV

L'infection au CMV a souvent été liée au rejet chronique chez les receveurs de greffe pulmonaire^{9,10,186}. Les mécanismes sous-jacents par lesquels l'infection au CMV contribue au rejet chronique des poumons n'ont pas été identifiés à ce jour.

L'implication de la réponse inflammatoire au virus comme un facteur étiologique est souvent mis de l'avant, mais un lien clair n'a jamais été établi. Des études ont associé des taux élevés de chimiokines dans le LBA de greffés en réponse à l'infection à CMV avec l'augmentation de la mortalité post greffe et le développement de la BO¹². Nos résultats démontrent un lien clair ($p = 0,022$) entre les infections au CMV et le ratio CysLT/PGE2 > 1 (Figure 7, p. 68). Récemment, l'infection au CMV a été associée à la stimulation de l'expression de la 5-LO *in vitro*¹¹. Dans cette étude, la synthèse CysLT restait toutefois inchangée. Cependant, *in vivo* les interactions avec les leucocytes, qui sont la principale source de CysLT, pourraient mener à une augmentation de CysLT pulmonaires. D'autres études ont décrit que l'infection au CMV peut favoriser la production de la PGE2 et celle-ci est impliqué dans la pathogenèse du CMV¹³. Les résultats rapportés ici démontrent plutôt le contraire, avec de faibles taux de PGE2 chez les patients présentant une infection au CMV. Cette différence nous suggère que la réponse à l'infection au CMV chez les greffés pourrait être différente de celle d'individus en bonne santé. En effet chez les greffés l'infection au CMV se traduirait par une production de CysLT prédominante sur la production de PGs. Cette différence pourrait être expliquée par le contexte inflammatoire propre à l'allogreffe, par la prise chronique de glucocorticostéroïdes ainsi que d'autres immunosuppresseurs, ou par une combinaison de tous ces facteurs.

4.3.2 Association du déséquilibre d'eicosanoïdes avec la colonisation à l'*Aspergillus*

Bien qu'une grande partie des greffés du poumon soient colonisés par de l'*Aspergillus*, ce fardeau n'a été que très récemment considéré comme un facteur de risque de la BO. Une étude récente de Weigt *et al.* démontre que la colonisation à *Aspergillus* est un facteur de risque de la BO³¹. Dans cette étude la colonisation par *Aspergillus* était fortement associée à la morbidité et à la mortalité associée au SBO. D'autre part, l'analyse de régression multivariée de Cox présentait la colonisation par *Aspergillus* comme un facteur de risque distinct dans le développement du SBO, indépendant du rejet aigu. Dans cette étude, la colonisation par l'*Aspergillus* était visible autour de 3 mois post-greffe et précédait de 6 à 9 mois le diagnostic du SBO³¹. Nos résultats associent la colonisation précoce par *Aspergillus* avec un ratio d'eicosanoïdes plus élevé que 1 (Figure 8, p. 69; p = 0,03). La colonisation par *Aspergillus* a été liée à la libération de cytokines pro-inflammatoires et au détachement de cellules épithéliales des voies respiratoires entraînant du remodelage¹⁸⁷. Par ailleurs, les éosinophiles stimulés *in vitro* par des complexes IgG-antigène d'*Aspergillus fumigatus* produisent du LTC4¹⁸⁸. Il reste à savoir comment les taux d'eicosanoïdes du poumon sont liés à la cinétique de colonisation par *Aspergillus*. Cette colonisation pourrait être une des causes du déséquilibre des eicosanoïdes. De plus, elle pourrait également n'être que l'indice d'un état immunitaire altéré qui se manifeste par ce déséquilibre. La colonisation par *Aspergillus* est étroitement liée à l'état d'immunosuppression¹⁸⁹. Les mécanismes par lesquels les médicaments immunosuppresseurs favoriseraient la colonisation par l'*Aspergillus* chez les greffés du poumon sont encore mal compris. Les phagocytes et les granulocytes sont importants dans la défense contre les infections fongiques. En effet, les facteurs de risque pour l'aspergillose pulmonaire invasive sont entre autre

les neutropénies sévères et la granulomatose septique chronique, une maladie caractérisée par l'incapacité de produire des anions superoxyde par les phagocytes^{190;191}. Les corticostéroïdes réduisent la capacité des macrophages et des neutrophiles à freiner le processus invasif d'*Aspergillus* en agissant sur leur capacité de produire des dérivés réactifs de l'oxygène^{192;193}. Les lymphocytes semblent être moins importants dans la défense contre les infections pulmonaires fongiques puisque l'immunosuppression induite par la cyclosporine ne semble pas avoir de rôle dans le développement de l'aspergillose¹⁹⁴.

4.4 Association au profil inflammatoire du LBA

Les eicosanoïdes et les leucotriènes en particulier, sont principalement produits par les cellules inflammatoires. Nous nous attendions donc à trouver des irrégularités dans les profils cellulaires des LBA associés à des échantillons présentant un déséquilibre des eicosanoïdes. Notre analyse n'a toutefois révélé aucune association significative entre les profils leucocytaires des LBA et un déséquilibre des eicosanoïdes. Nous avons en revanche trouvé une association significative entre le rejet chronique et un nombre plus faible de lymphocytes (Tableau VI, p. 65; $p = 0,041$). Cela est très surprenant étant donné que le rejet chronique est une pathologie déclenchée par un état inflammatoire initial et que l'infiltration lymphocytaire est un des traits marquants de la pathologie. Il est cependant possible que l'état inflammatoire était achevé et a fait place à la phase fibroproliférative de la maladie chez nos sujets au moment de la collecte de l'échantillon. En effet, lorsque l'état inflammatoire est observé selon le temps post greffe, il semble y avoir une baisse de

l'inflammation neutrophilique avec le temps. D'autre part, il se peut qu'un état inflammatoire subsiste au niveau du tissu et ne soit pas révélé dans comptes cellulaires du LBA. En effet, certaines études ont rapporté une corrélation avec l'infiltration neutrophilique au niveau de la paroi bronchique par analyse de biopsies endobronchiques⁷⁸. Tel que mentionné plus tôt, les cellules structurales peuvent synthétiser des CysLT et pourraient être à l'origine du déséquilibre.

4.5 Rôle éventuel des antagonistes des CysLT dans le déséquilibre des eicosanoïdes

Le déséquilibre des eicosanoïdes observé pourrait éventuellement être rétabli chez les greffés avec des médicaments anti-leucotriènes. Différentes études ont démontré que ces médicaments sont non toxiques et peuvent avoir des effets bénéfiques dans les paramètres de la transplantation d'organe ou des pathologies fibrotiques pulmonaires. Dans un petit groupe de patients, le Montelukast, un antagoniste des récepteurs des leucotriènes, s'est révélé efficace dans le traitement des manifestations de la maladie du greffon contre l'hôte, incluant la BO¹⁵⁶. Dans un modèle expérimental de la néphrotoxicité à la cyclosporine le Montelukast avait un effet protecteur pour le rein et cet effet antitoxique a été observé chez l'homme^{156;195}. D'autres études ont révélé des propriétés anti-fibrotiques et anti-remodelage du Montelukast chez des sujets asthmatiques et dans un modèle murin de fibrose pulmonaire^{196;142}. Ces résultats ainsi que les résultats de la présente étude plaident en

faveur d'un rôle potentiel des médicaments anti-leucotriènes dans un traitement post-transplantation.

4.6 Le rôle des CysLT dans le processus de TEM *in vitro*

Les récepteurs des CysLT sont présents dans le poumon tant sur les leucocytes que sur les cellules structurales tel que les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales^{137;138}. Chez les patients asthmatiques, les CysLT sont impliqués dans le remodelage des bronches et leur effet fibrosant dans le poumon a été confirmé par l'étude de différentes maladies fibrotiques¹³⁹⁻¹⁴¹. D'autre part la TEM, un mécanisme menant à la fibrose, a été proposé comme étant impliqué dans le développement de la BO. Notre étude n'a, par contre, pas été en mesure de démontrer que les CysLT peuvent stimuler l'expression des marqueurs mésenchymateux dans les cellules épithéliales bronchiolaires. Cependant une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux est observée suggérant que les CysLT pourraient amorcer le processus de la TEM et qu'un temps de stimulation plus long et/ou l'aide de co-médiateurs permettrait possiblement d'exprimer le phénotype complet de la TEM. D'autre part, à forte dose, le LTD4 démontre une tendance à la répression de l'expression des ARNm codants pour le collagène IA1 et l' α -actine musculaire lisse. Cela pourrait s'expliquer par un effet oxydatif des CysLT à doses élevées ou un autre effet qui n'est pas médiée par les récepteurs CysLT et qui pourrait influencer sur l'expression de certains gènes tels que le collagène I¹⁹⁷. Une autre contrainte au cadre *in vitro* de notre expérience est que ce type d'étude ne tient pas compte des interactions de cellules à cellules et d'autres facteurs qui pourraient être cruciaux pour

le processus de la TEM. Les expériences de cultures cellulaires *in vitro* ont des limitations à reproduire la biologie *in vivo*, ce qui pourrait être particulièrement le cas de notre étude de la TEM. Dans le contexte de la transplantation pulmonaire, l'homéostasie du poumon est affectée par de multiples facteurs tels que l'immunosuppression et le profil immunitaire spécifique associé à l'alloréactivité qu'on ne peut reproduire *in vitro*. D'autres groupes ont démontré, chez les animaux, l'importance des CysLT dans le remodelage des voies respiratoires, par contre, l'action de ceux-ci était en amont de celle du récepteur de l'EGF¹⁹⁸. Par conséquent, le potentiel des CysLT à initier la TEM chez les SAEC ou d'autres cellules épithéliales des voies aériennes ainsi qu'*in vivo* au cours de la BO reste inconnu. De nouvelles expériences, prendraient en compte les effets synergiques éventuels avec d'autres médiateurs, une stimulation plus longue et/ou une stimulation en présence d'immunosuppresseurs, sont nécessaires afin de déterminer si les CysLT peuvent réellement contribuer à la TEM dans les voies respiratoires. Le prolongement des temps de stimulation sera par contre problématique. En effet, pour éliminer toute contribution possible au processus de TEM des facteurs de croissances retrouvé dans le sérum, nous devons stimuler dans un milieu non complété. Nous avons, cependant, remarqués des niveaux élevés de mort cellulaire chez les SAEC lorsque la privation de sérum dépassait 72h. Une privation de sérum graduelle, pour éviter le choc de la privation de sérum soudaine, pourrait nous permettre d'arriver à des temps de stimulation plus long.

Le rôle des CysLT est, néanmoins, bien connu dans les processus de remodelage et de la fibrose. Les CysLT pourraient donc tout de même participer à la

pathogénèse de la BO en agissant par d'autres mécanismes que la TEM. Les CysLT pourraient, tel qu'observé dans le contexte de l'asthme, agir sur d'autres cellules structurales notamment les fibroblastes et les myofibroblastes^{142;148}. Les CysLT pourraient avoir un effet activateur sur les fibroblastes et myofibroblastes pulmonaires, induisant la prolifération, la migration ou la synthèse de produits de la matrice extracellulaire, ou encore un effet chimiotactique pour recruter des fibrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses circulants. Les cellules musculaires lisses sont capables de se différencier en myofibroblastes et pourraient potentiellement participer au processus fibrotique identifié dans la BO¹⁹⁹.

4.7 Limitations de l'étude

Nous avons démontré que le poumon greffé possède un profil d'eicosanoïdes spécifique, différent de celui des sujets sains. Par contre, bien que nous ayons démontré une tendance suggérant une association entre le déséquilibre d'eicosanoïdes et le rejet chronique, la petite taille de notre échantillon nous a empêché de démontrer une association significative ($p=0,067$). Néanmoins, des associations significatives ont été observées entre les ratios CysLT/PGE2 et les facteurs de risque connus de la BO. Une grande partie de nos échantillons a été obtenue assez tôt post-greffe, en raison d'un biais induit par le calendrier du suivi post-greffe. En effet, tôt post-greffe les patients greffés sont suivis plus fréquemment. Ce facteur a contribué à réduire la quantité d'échantillon de sujets ayant un rejet chronique. D'autre part, en prenant en considération la stabilité des ratios à travers le temps, il sera possible de suivre l'évolution de ces patients pour une analyse ultérieure. Nous n'avons également pas

pu démontrer la capacité du LTD4 à stimuler le processus complet de la TEM. Cependant nous avons été capables de démontrer une initiation du processus de la TEM par la stimulation au LTD4. L'hypothèse subsiste, que les CysLT soient impliqués, par le processus de la TEM, dans les événements fibrotiques de la BO (Figure 13, p.107). Des modifications au protocole expérimental nous permettrons, à l'avenir, de prouver cette hypothèse.

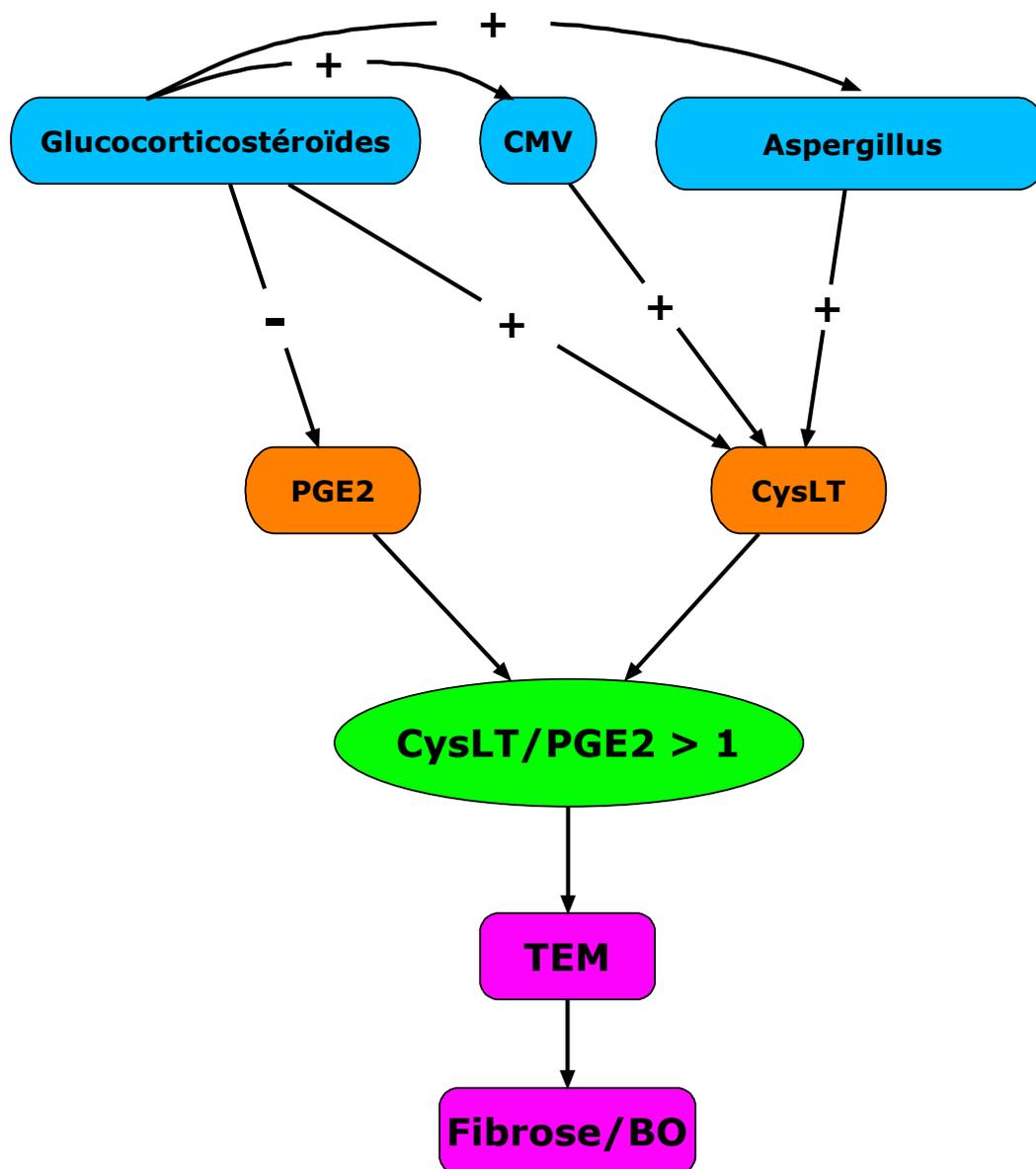


Figure 13. Mécanisme proposé pour l'implication de la balance CysLT/ PGE2 dans la pathogénèse de la BO. Les glucocorticostéroïdes induisent une immunosuppression qui favorise les infections au CMV et à l'*Aspergillus*, stimulent la synthèse des CysLT et inhibent également la synthèse de PGE2. La présence d'*Aspergillus* et du CMV stimule la synthèse de CysLT par les cellules épithéliales ou par les leucocytes. Ce qui mène à un ratio favorisant les CysLT et conduit à la fibrose de la BO par le processus de la TEM.

Chapitre 5

Conclusion

Notre étude est la première à décrire le profil des eicosanoïdes dans le poumon greffé et à examiner l'induction de la TEM par les CysLT dans des cellules pulmonaires. Nous avons révélé, chez les greffés du poumon, un déséquilibre des eicosanoïdes pulmonaires qui culmine à un an post-greffe. Ce déséquilibre, favorisant les CysLT sur la PGE2, est associé à des facteurs de risque de la BO, notamment les infections à CMV et la colonisation par *Aspergillus*. Malgré une petite taille d'échantillon, une tendance à l'association entre le déséquilibre CysLT/PGE2 et le rejet chronique a été observée. Un suivi à long terme post-greffe de ces patients nous permettra de lier plus robustement le rejet chronique avec ce changement de l'équilibre des eicosanoïdes et de certifier son rôle comme un événement décisif post-transplantation dans le développement du rejet chronique de l'allogreffe pulmonaire.

De plus, nous avons démontrés la capacité des CysLT à réprimer l'expression des marqueurs protéiques épithéliaux dans des cellules de l'épithélium pulmonaire humain. Même si, dans notre contexte expérimental, la stimulation aux CysLT n'induisent pas l'expression des marqueurs mésenchymateux, la répression du phénotype épithélial pourrait possiblement indiquer le début du processus de la TEM. L'élaboration de nouveaux paramètres expérimentaux permettrait potentiellement de confirmer cette hypothèse.

Les observations cumulées dans ce mémoire dévoilent une altération du profil des eicosanoïdes chez les greffés pulmonaires et un rôle potentiel dans la pathologie de la BO. Ces observations ouvrent la porte à de nouvelles investigations qui pourront certifier l'importance des eicosanoïdes dans cette pathologie. Les résultats

présentés dans ce mémoire, comme les résultats d'autres études motivent l'élaboration d'une étude clinique étudiant l'effet des antagonistes des CysLT chez les greffés du poumon. L'efficacité et la sécurité de ces médicaments a été prouvé dans le contexte de l'asthme et poserait un risque minimal chez les greffés. En effet, les antagonistes des CysLT sont sans effets adverses dans la grande majorité des cas, même en surdose et pourraient éventuellement être prescrits comme supplément au traitement régulier advenant la découverte d'effets bénéfiques dans le contexte d'une étude clinique. La corrélation établie entre le débalancement d'eicosanoïdes et l'infection au CMV est très intéressant et pourrai également être d'avantage étudiée dans un cadre *in vitro*. En effet, il serait intéressant d'étudier la modulation de la production d'eicosanoïdes *in vitro* chez différents types cellulaires présents dans le poumon, par l'infection au CMV.

Bibliographie

- (1) Woo MS. Overview of lung transplantation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35(3):154-163.
- (2) Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med* 1982; 306(10):557-564.
- (3) Christie JD, Edwards LB, Aurora P et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-sixth official adult lung and heart-lung transplantation Report-2009. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28(10):1031-1049.
- (4) Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC et al. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(1):108-121.
- (5) Boehler A, Kesten S, Weder W et al. Bronchiolitis obliterans after lung transplantation: a review. *Chest* 1998; 114(5):1411-1426.
- (6) Sharples LD, McNeil K, Stewart S et al. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(2):271-281.
- (7) Boehler A, Estenne M. Post-transplant bronchiolitis obliterans. *Eur Respir J* 2003; 22(6):1007-1018.

- (8) Kramer MR, Stoehr C, Whang JL et al. The diagnosis of obliterative bronchiolitis after heart-lung and lung transplantation: low yield of transbronchial lung biopsy. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12(4):675-681.
- (9) Cooper JD, Billingham M, Egan T et al. A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12(5):713-716.
- (10) Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Badier M et al. Early detection of airway involvement in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. Functional and bronchoalveolar lavage cell findings. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(6):1924-1929.
- (11) Ouwens JP, van der Mark TW, Koeter GH et al. Bronchiolar airflow impairment after lung transplantation: an early and common manifestation. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(10):1056-1061.
- (12) Boehler A, Estenne M. Obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(2):133-139.
- (13) Girgis RE, Tu I, Berry GJ et al. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(12):1200-1208.

- (14) Jackson CH, Sharples LD, McNeil K et al. Acute and chronic onset of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS): are they different entities? *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(6):658-666.
- (15) Ross DJ, Marchevsky A, Kramer M et al. "Refractoriness" of airflow obstruction associated with isolated lymphocytic bronchiolitis/bronchitis in pulmonary allografts. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16(8):832-838.
- (16) Husain AN, Siddiqui MT, Holmes EW et al. Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(3):829-833.
- (17) Heng D, Sharples LD, McNeil K et al. Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(12):1255-1263.
- (18) Sundaresan S, Mohanakumar T, Smith MA et al. HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 1998; 65(5):648-653.
- (19) Girnita AL, McCurry KR, Zeevi A. Increased lung allograft failure in patients with HLA-specific antibody. *Clin Transpl* 2007;231-239.
- (20) Bando K, Paradis IL, Similo S et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110(1):4-13.

- (21) Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP et al. Cytomegalovirus infection and pneumonitis. Impact after isolated lung transplantation. Washington University Lung Transplant Group. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(4):1017-1023.
- (22) Kroshus TJ, Kshetry VR, Savik K et al. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114(2):195-202.
- (23) Johansson I, Martensson G, Andersson R. Cytomegalovirus and long-term outcome after lung transplantation in Gothenburg, Sweden. *Scand J Infect Dis* 2010; 42(2):129-136.
- (24) Duncan SR, Paradis IL, Yousem SA et al. Sequelae of cytomegalovirus pulmonary infections in lung allograft recipients. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146(6):1419-1425.
- (25) Soghikian MV, Valentine VG, Berry GJ et al. Impact of ganciclovir prophylaxis on heart-lung and lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(9):881-887.
- (26) Chmiel C, Speich R, Hofer M et al. Ganciclovir/valganciclovir prophylaxis decreases cytomegalovirus-related events and bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46(6):831-839.

- (27) Speich R, Thurnheer R, Gaspert A et al. Efficacy and cost effectiveness of oral ganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *Transplantation* 1999; 67(2):315-320.
- (28) Neurohr C, Huppmann P, Leuchte H et al. Human herpesvirus 6 in bronchalveolar lavage fluid after lung transplantation: a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome? *Am J Transplant* 2005; 5(12):2982-2991.
- (29) Vos R, Vanaudenaerde BM, De Vleeschauwer SI et al. De novo or persistent pseudomonal airway colonization after lung transplantation: importance for bronchiolitis obliterans syndrome? *Transplantation* 2008; 86(4):624-625.
- (30) Botha P, Archer L, Anderson RL et al. *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2008; 85(5):771-774.
- (31) Weigt SS, Elashoff RM, Huang C et al. *Aspergillus* colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2009; 9(8):1903-1911.
- (32) Thabut G, Mal H, Cerrina J et al. Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(7):786-791.
- (33) Fiser SM, Tribble CG, Long SM et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(4):1041-1047.

- (34) Brugiere O, Thabut G, Suberbielle C et al. Relative impact of human leukocyte antigen mismatching and graft ischemic time after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27(6):628-634.
- (35) Berkowitz N, Schulman LL, McGregor C et al. Gastroparesis after lung transplantation. Potential role in postoperative respiratory complications. *Chest* 1995; 108(6):1602-1607.
- (36) D'Ovidio F, Keshavjee S. Gastroesophageal reflux and lung transplantation. *Dis Esophagus* 2006; 19(5):315-320.
- (37) Rinaldi M, Martinelli L, Volpato G et al. Gastro-esophageal reflux as cause of obliterative bronchiolitis: a case report. *Transplant Proc* 1995; 27(3):2006-2007.
- (38) D'Ovidio F, Mura M, Tsang M et al. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129(5):1144-1152.
- (39) Cantu E, III, Appel JZ, III, Hartwig MG et al. J. Maxwell Chamberlain Memorial Paper. Early fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Surg* 2004; 78(4):1142-1151.
- (40) Ely LK, Burrows SR, Purcell AW et al. T-cells behaving badly: structural insights into alloreactivity and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2008; 20(5):575-580.

- (41) Elssner A, Jaumann F, Dobmann S et al. Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* 2000; 70(2):362-367.
- (42) Scholma J, Slebos DJ, Boezen HM et al. Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(6):2221-2225.
- (43) Reynaud-Gaubert M, Marin V, Thirion X et al. Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(7):721-730.
- (44) Keane MP, Gomperts BN, Weigt S et al. IL-13 is pivotal in the fibro-obliterative process of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Immunol* 2007; 178(1):511-519.
- (45) Smith GN, Jr., Mickler EA, Payne KK et al. Lung transplant metalloproteinase levels are elevated prior to bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2007; 7(7):1856-1861.
- (46) Elssner A, Vogelmeier C. The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Infect Dis* 2001; 3(3):168-176.

- (47) Belperio JA, Keane MP, Burdick MD et al. Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1150-1162.
- (48) Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA et al. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 1995; 96(1):107-116.
- (49) Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest* 2007; 117(11):3498-3506.
- (50) Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Dupont LJ et al. Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro: a potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(11):1280-1283.
- (51) Serrick C, Adoumie R, Giaid A et al. The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *Transplantation* 1994; 58(11):1158-1162.
- (52) Wilkes DS, Heidler KM, Bowen LK et al. Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology of acute lung allograft rejection, and deposition of IgG2a in recipient murine lungs. *J Immunol* 1995; 155(5):2775-2783.

- (53) Ross DJ, Moudgil A, Bagga A et al. Lung allograft dysfunction correlates with gamma-interferon gene expression in bronchoalveolar lavage. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(7):627-636.
- (54) Meloni F, Vitulo P, Cascina A et al. Bronchoalveolar lavage cytokine profile in a cohort of lung transplant recipients: a predictive role of interleukin-12 with respect to onset of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23(9):1053-1060.
- (55) Lama VN, Harada H, Badri LN et al. Obligatory role for interleukin-13 in obstructive lesion development in airway allografts. *Am J Pathol* 2006; 169(1):47-60.
- (56) Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Am J Transplant* 2006; 6(4):724-735.
- (57) Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(6):748-753.
- (58) Hertz MI, Henke CA, Nakhleh RE et al. Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(21):10385-10389.

- (59) Kallio EA, Koskinen PK, Aavik E et al. Role of platelet-derived growth factor in obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(4):1324-1332.
- (60) Alho HS, Maasilta PK, Vainikka T et al. Platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, and connective tissue growth factor in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Exp Lung Res* 2007; 33(6):303-320.
- (61) Charpin JM, Stern M, Grenet D et al. Insulinlike growth factor-1 in lung transplants with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(6):1991-1998.
- (62) El Gamel A, Sim E, Hasleton P et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(9):828-837.
- (63) Corbel M, Belleguic C, Boichot E et al. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18(1):51-61.
- (64) Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(4):383-388.
- (65) Hubner RH, Meffert S, Mundt U et al. Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur Respir J* 2005; 25(3):494-501.

- (66) Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M et al. Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 1998; 48(12):954-963.
- (67) Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(2):163-176.
- (68) Ward C, Forrest IA, Murphy DM et al. Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax* 2005; 60(10):865-871.
- (69) Brocker V, Langer F, Fellous TG et al. Fibroblasts of recipient origin contribute to bronchiolitis obliterans in human lung transplants. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(11):1276-1282.
- (70) Riise GC, Andersson BA, Kjellstrom C et al. Persistent high BAL fluid granulocyte activation marker levels as early indicators of bronchiolitis obliterans after lung transplant. *Eur Respir J* 1999; 14(5):1123-1130.
- (71) Zheng L, Walters EH, Ward C et al. Airway neutrophilia in stable and bronchiolitis obliterans syndrome patients following lung transplantation. *Thorax* 2000; 55(1):53-59.
- (72) Digiovine B, Lynch JP, III, Martinez FJ et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation: role of IL-8. *J Immunol* 1996; 157(9):4194-4202.

- (73) Devouassoux G, Drouet C, Pin I et al. Alveolar neutrophilia is a predictor for the bronchiolitis obliterans syndrome, and increases with degree of severity. *Transpl Immunol* 2002; 10(4):303-310.
- (74) Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K et al. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* 1991; 17(1):17-23.
- (75) Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Geudens N et al. Macrolides inhibit IL17-induced IL8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells. *Am J Transplant* 2007; 7(1):76-82.
- (76) Beeh KM, Kornmann O, Lill J et al. Induced sputum cell profiles in lung transplant recipients with or without chronic rejection: correlation with lung function. *Thorax* 2001; 56(7):557-560.
- (77) Devouassoux G, Pison C, Drouet C et al. Early lung leukocyte infiltration, HLA and adhesion molecule expression predict chronic rejection. *Transpl Immunol* 2001; 8(4):229-236.
- (78) Zheng L, Whitford HM, Orsida B et al. The dynamics and associations of airway neutrophilia post lung transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(3):599-608.
- (79) Leonard CT, Soccacal PM, Singer L et al. Dendritic cells and macrophages in lung allografts: A role in chronic rejection? *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(4 Pt 1):1349-1354.

- (80) Yousem SA, Ray L, Paradis IL et al. Potential role of dendritic cells in bronchiolitis obliterans in heart-lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1990; 49(3):424-428.
- (81) Taylor PM, Rose ML, Yacoub MH. Expression of MHC antigens in normal human lungs and transplanted lungs with obliterative bronchiolitis. *Transplantation* 1989; 48(3):506-510.
- (82) Milne DS, Gascoigne AD, Wilkes J et al. MHC class II and ICAM-1 expression and lymphocyte subsets in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. *Transplantation* 1994; 57(12):1762-1766.
- (83) Duncan SR, Leonard C, Theodore J et al. Oligoclonal CD4(+) T cell expansions in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(10):1439-1444.
- (84) Hodge G, Hodge S, Reynolds P et al. Intracellular cytokines in blood T cells in lung transplant patients--a more relevant indicator of immunosuppression than drug levels. *Clin Exp Immunol* 2005; 139(1):159-164.
- (85) Zheng L, Orsida B, Whitford H et al. Longitudinal comparisons of lymphocytes and subtypes between airway wall and bronchoalveolar lavage after human lung transplantation. *Transplantation* 2005; 80(2):185-192.
- (86) Jonosono M, Fang KC, Keith FM et al. Measurement of fibroblast proliferative activity in bronchoalveolar lavage fluid in the analysis of

- obliterative bronchiolitis among lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(10):972-985.
- (87) Hodge S, Holmes M, Banerjee B et al. Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. *Am J Transplant* 2009; 9(4):727-733.
- (88) Sato M, Keshavjee S, Liu M. Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9(9):1981-1987.
- (89) Boehler A, Chamberlain D, Kesten S et al. Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation* 1997; 64(2):311-317.
- (90) Neuringer IP, Mannon RB, Coffman TM et al. Immune cells in a mouse airway model of obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(3):379-386.
- (91) Hele DJ, Yacoub MH, Belvisi MG. The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res* 2001; 2(3):169-183.
- (92) Fernandez FG, Campbell LG, Liu W et al. Inhibition of obliterative airway disease development in murine tracheal allografts by matrix metalloproteinase-9 deficiency. *Am J Transplant* 2005; 5(4 Pt 1):671-683.

- (93) Ramirez AM, Shen Z, Ritzenthaler JD et al. Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: tgf-beta signaling through smad3-dependent and -independent pathways. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2080-2088.
- (94) Ramirez AM, Takagawa S, Sekosan M et al. Smad3 deficiency ameliorates experimental obliterative bronchiolitis in a heterotopic tracheal transplantation model. *Am J Pathol* 2004; 165(4):1223-1232.
- (95) Adams BF, Brazelton T, Berry GJ et al. The role of respiratory epithelium in a rat model of obliterative airway disease. *Transplantation* 2000; 69(4):661-664.
- (96) Tikkanen JM, Kallio EA, Bruggeman CA et al. Prevention of cytomegalovirus infection-enhanced experimental obliterative bronchiolitis by antiviral prophylaxis or immunosuppression in rat tracheal allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(4):672-679.
- (97) Fahrni JA, Berry GJ, Morris RE et al. Rapamycin inhibits development of obliterative airway disease in a murine heterotopic airway transplant model. *Transplantation* 1997; 63(4):533-537.
- (98) Romaniuk A, Prop J, Petersen AH et al. Expression of class II major histocompatibility complex antigens by bronchial epithelium in rat lung allografts. *Transplantation* 1987; 44(2):209-214.
- (99) Matsumura Y, Marchevsky A, Zuo XJ et al. Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two

- experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation* 1995; 59(11):1509-1517.
- (100) Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA et al. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation* 2002; 73(4):500-505.
- (101) Li B, Hartwig MG, Appel JZ et al. Chronic aspiration of gastric fluid induces the development of obliterative bronchiolitis in rat lung transplants. *Am J Transplant* 2008; 8(8):1614-1621.
- (102) Schmid RA, Kwong K, Boasquevisque CH et al. A chronic large animal model of lung allograft rejection. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2):1521.
- (103) Warnecke G, Avsar M, Steinkamp T et al. Tacrolimus versus cyclosporine induction therapy in pulmonary transplantation in miniature swine. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 28(3):454-460.
- (104) Allan JS, Wain JC, Schwarze ML et al. Obliterative bronchiolitis develops in miniature swine transplanted across a minor histocompatibility barrier. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2):358-359.
- (105) Allan JS, Wain JC, Schwarze ML et al. Modeling chronic lung allograft rejection in miniature swine. *Transplantation* 2002; 73(3):447-453.
- (106) Sachs DH, Leight G, Cone J et al. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* 1976; 22(6):559-567.

- (107) Speich R, Boehler A, Thurnheer R et al. Salvage therapy with mycophenolate mofetil for lung transplant bronchiolitis obliterans: importance of dosage. *Transplantation* 1997; 64(3):533-535.
- (108) McNeil K, Glanville AR, Wahlers T et al. Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients. *Transplantation* 2006; 81(7):998-1003.
- (109) Fan Y, Xiao YB, Weng YG. Tacrolimus versus cyclosporine for adult lung transplant recipients: a meta-analysis. *Transplant Proc* 2009; 41(5):1821-1824.
- (110) Hachem RR, Yusef RD, Chakinala MM et al. A randomized controlled trial of tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(10):1012-1018.
- (111) Ruttman E, Geltner C, Bucher B et al. Combined CMV prophylaxis improves outcome and reduces the risk for bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) after lung transplantation. *Transplantation* 2006; 81(10):1415-1420.
- (112) Blondeau K, Mertens V, Vanaudenaerde BA et al. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J* 2008; 31(4):707-713.
- (113) Verleden GM, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ et al. Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(5):566-570.

- (114) Yates B, Murphy DM, Forrest IA et al. Azithromycin reverses airflow obstruction in established bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(6):772-775.
- (115) Gerhardt SG, McDyer JF, Girgis RE et al. Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(1):121-125.
- (116) Verleden GM, Dupont LJ. Azithromycin therapy for patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 2004; 77(9):1465-1467.
- (117) Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005; 233(3):706-720.
- (118) Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M et al. Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 2001; 276(50):46707-46713.
- (119) Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3):L525-L534.
- (120) Lee YJ, Han HJ. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3{beta}, Snail1, and {beta}-catenin in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009.

- (121) Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(2):131-142.
- (122) Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005; 166(5):1321-1332.
- (123) Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1420-1428.
- (124) Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y et al. Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol* 2004; 164(2):651-663.
- (125) Kasai H, Allen JT, Mason RM et al. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 2005; 6:56.
- (126) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(35):13180-13185.
- (127) Huang SK, White ES, Wettlaufer SH et al. Prostaglandin E2 induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J* 2009; 23: 4317-4326.
- (128) Charbeneau RP, Peters-Golden M. Eicosanoids: mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108(6):479-491.

- (129) Radmark O, Werz O, Steinhilber D et al. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(7):332-341.
- (130) Zhang YY, Walker JL, Huang A et al. Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem J* 2002; 361(Pt 2):267-276.
- (131) Jame AJ, Lackie PM, Cazaly AM et al. Human bronchial epithelial cells express an active and inducible biosynthetic pathway for leukotrienes B4 and C4. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(6):880-892.
- (132) James AJ, Penrose JF, Cazaly AM et al. Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway. *Respir Res* 2006; 7:102.
- (133) Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(2):173-178.
- (134) Sarau HM, Ames RS, Chambers J et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 1999; 56(3):657-663.
- (135) Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(39):30531-30536.
- (136) Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK et al. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(1):226-233.

- (137) Chibana K, Ishii Y, Asakura T et al. Up-regulation of cysteinyl leukotriene 1 receptor by IL-13 enables human lung fibroblasts to respond to leukotriene C4 and produce eotaxin. *J Immunol* 2003; 170(8):4290-4295.
- (138) Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 1999; 399(6738):789-793.
- (139) Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN et al. Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res* 2006; 7:63.
- (140) Asakura T, Ishii Y, Chibana K et al. Leukotriene D4 stimulates collagen production from myofibroblasts transformed by TGF-beta. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(2):310-315.
- (141) Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA et al. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(1 Suppl):S18-S34.
- (142) Kelly MM, Chakir J, Vethanayagam D et al. Montelukast treatment attenuates the increase in myofibroblasts following low-dose allergen challenge. *Chest* 2006; 130(3):741-753.
- (143) Wilborn J, Bailie M, Coffey M et al. Constitutive activation of 5-lipoxygenase in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1996; 97(8):1827-1836.

- (144) Kowal-Bielecka O, Distler O, Kowal K et al. Elevated levels of leukotriene B4 and leukotriene E4 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma lung disease. *Arthritis Rheum* 2003; 48(6):1639-1646.
- (145) Garcia JG, Griffith DE, Cohen AB et al. Alveolar macrophages from patients with asbestos exposure release increased levels of leukotriene B4. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(6):1494-1501.
- (146) Selman M, Barquin N, Sansores R et al. Increased levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage from patients with pigeon breeder's disease. *Arch Invest Med (Mex)* 1988; 19(2):127-131.
- (147) Medina L, Perez-Ramos J, Ramirez R et al. Leukotriene C4 upregulates collagenase expression and synthesis in human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1224(2):168-174.
- (148) Kato J, Kohyama T, Okazaki H et al. Leukotriene D4 potentiates fibronectin-induced migration of human lung fibroblasts. *Clin Immunol* 2005; 117(2):177-181.
- (149) Perng DW, Wu YC, Chang KT et al. Leukotriene C4 induces TGF-beta1 production in airway epithelium via p38 kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(1):101-107.
- (150) Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T et al. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2):229-235.

- (151) Beller TC, Friend DS, Maekawa A et al. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(9):3047-3052.
- (152) Failla M, Genovese T, Mazzon E et al. Pharmacological inhibition of leukotrienes in an animal model of bleomycin-induced acute lung injury. *Respir Res* 2006; 7:137.
- (153) Henderson WR, Jr., Tang LO, Chu SJ et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(1):108-116.
- (154) Henderson WR, Jr., Chiang GK, Tien YT et al. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(7):718-728.
- (155) Shimizu N, Kita T, Aoe M et al. Changes in levels of arachidonic acid metabolites in blood and bronchoalveolar lavage fluid after warm ischemia-reperfusion of lung. *Acta Med Okayama* 1991; 45(6):417-422.
- (156) Or R, Gesundheit B, Resnick I et al. Sparing effect by montelukast treatment for chronic graft versus host disease: a pilot study. *Transplantation* 2007; 83(5):577-581.
- (157) Powell WS. EICOSANOIDS AND THE LUNG. In: Hamid Q, Shannon J, Martin J, editors. *Physiological Basis of Respiratory Disease*. Pmph USA, 2005: 495-508.

- (158) Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294(5548):1871-1875.
- (159) Myatt L, Lye SJ. Expression, localization and function of prostaglandin receptors in myometrium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70(2):137-148.
- (160) Sweatman WJ, Collier HO. Effects of prostaglandins on human bronchial muscle. *Nature* 1968; 217(5123):69.
- (161) Singh J, Zeller W, Zhou N et al. Antagonists of the EP(3) Receptor for Prostaglandin E(2) Are Novel Antiplatelet Agents That Do Not Prolong Bleeding. *ACS Chem Biol* 2009; 4 (2):115–126.
- (162) Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C et al. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(2):L405-L413.
- (163) Park GY, Christman JW. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290(5):L797-L805.
- (164) Fine A, Poliks CF, Donahue LP et al. The differential effect of prostaglandin E2 on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1989; 264(29):16988-16991.

- (165) White ES, Atrasz RG, Dickie EG et al. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast migration by E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32(2):135-141.
- (166) Kamei T, Callery MP, Flye MW. Intra-graft delivery of 16, 16-dimethyl PGE2 induces donor-specific tolerance in rat cardiac allograft recipients. *Transplantation* 1991; 51(1):242-246.
- (167) Koh IH, Kim PC, Chung SW et al. The effects of 16, 16 dimethyl prostaglandin E2 therapy alone and in combination with low-dose cyclosporine on rat small intestinal transplantation. *Transplantation* 1992; 54(4):592-598.
- (168) Nomi T, Sho M, Akahori T et al. Protective effect of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 in alloimmune response in vivo. *Transplant Proc* 2006; 38(10):3209-3210.
- (169) Kimblad PO, Sjoberg T, Massa G et al. High potassium contents in organ preservation solutions cause strong pulmonary vasoconstriction. *Ann Thorac Surg* 1991; 52(3):523-528.
- (170) Chiang CH, Wu K, Yu CP et al. Hypothermia and prostaglandin E(1) produce synergistic attenuation of ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(4):1319-1323.
- (171) Boasquevisque CH, Yildirim E, Waddel TK et al. Surgical techniques: lung transplant and lung volume reduction. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(1):66-78.

- (172) de Perrot M, Fischer S, Liu M et al. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001; 72(9):1505-1512.
- (173) Wenzel SE, Larsen GL, Johnston K et al. Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(1):112-119.
- (174) Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O et al. Leukotrienes, LTC4 and LTB4, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84(1):19-26.
- (175) Kim CK, Koh JY, Han TH et al. Increased levels of BAL cysteinyl leukotrienes in acute [corrected] RSV bronchiolitis. *Acta Paediatr* 2006; 95(4):479-485.
- (176) Piotrowski WJ, Antczak A, Marczak J et al. Eicosanoids in exhaled breath condensate and BAL fluid of patients with sarcoidosis. *Chest* 2007; 132(2):589-596.
- (177) Sastre B, Fernandez-Nieto M, Molla R et al. Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy* 2008; 63(1):58-66.
- (178) Verhoeven GT, Garrelds IM, Hoogsteden HC et al. Effects of fluticasone propionate inhalation on levels of arachidonic acid metabolites in patients

- with chronic obstructive pulmonary disease. *Mediators Inflamm* 2001; 10(1):21-26.
- (179) LeFever A, Funahashi A. Elevated prostaglandin E2 levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with bronchogenic carcinoma. *Chest* 1990; 98(6):1397-1402.
- (180) Royce SG, Tang ML. The effects of current therapies on airway remodeling in asthma and new possibilities for treatment and prevention. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2(2):169-181.
- (181) Dworski R, Fitzgerald GA, Oates JA et al. Effect of oral prednisone on airway inflammatory mediators in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(4 Pt 1):953-959.
- (182) Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H et al. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 2001; 167(1):469-474.
- (183) Riddick CA, Ring WL, Baker JR et al. Dexamethasone increases expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in human monocytes and THP-1 cells. *Eur J Biochem* 1997; 246(1):112-118.
- (184) Trulock EP, Christie JD, Edwards LB et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(8):782-795.

- (185) Yousem SA, Dauber JA, Keenan R et al. Does histologic acute rejection in lung allografts predict the development of bronchiolitis obliterans? *Transplantation* 1991; 52(2):306-309.
- (186) Keenan RJ, Lega ME, Dummer JS et al. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 1991; 51(2):433-438.
- (187) Tomee JF, Wierenga AT, Hiemstra PS et al. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis* 1997; 176(1):300-303.
- (188) Cromwell O, Moqbel R, Fitzharris P et al. Leukotriene C4 generation from human eosinophils stimulated with IgG-*Aspergillus fumigatus* antigen immune complexes. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82(4):535-543.
- (189) Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell* 2007; 6(11):1953-1963.
- (190) Duong M, Ouellet N, Simard M et al. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis* 1998; 178(5):1472-1482.
- (191) Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(7):707-717.
- (192) Roilides E, Uhlig K, Venzon D et al. Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte-induced damage of

Aspergillus fumigatus hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun* 1993; 61(11):4870-4877.

- (193) Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun* 2003; 71(6):3034-3042.
- (194) Berenguer J, Allende MC, Lee JW et al. Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(3):1079-1086.
- (195) Atakan A, Arikan H, Macunluoglu B et al. Renal protective effects of leukotriene receptor blockers in an experimental model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2008; 40(1):279-284.
- (196) Izumo T, Kondo M, Nagai A. Cysteinyl-leukotriene 1 receptor antagonist attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Life Sci* 2007; 80(20):1882-1886.
- (197) Wang J, Mochizuki H, Todokoro M et al. Does leukotriene affect intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells? *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(4):821-828.
- (198) Tamaoka M, Hassan M, McGovern T et al. The epidermal growth factor receptor mediates allergic airway remodelling in the rat. *Eur Respir J* 2008; 32(5):1213-1223.

- (199) Tanyel FC, Muftuoglu S, Dagdeviren A et al. Myofibroblasts defined by electron microscopy suggest the dedifferentiation of smooth muscle within the sac walls associated with congenital inguinal hernia. *BJU Int* 2001; 87(3):251-255.

