

**Mémoire de Maîtrise en médecine No 2509**

# **Etude du profil d'activation des macrophages alvéolaires chez le transplanté pulmonaire**

**Etudiante**

Sandy Waelchli

**Tuteur**

Prof. Laurent Nicod  
Service de pneumologie, CHUV

**Co-tuteur**

Eric Bernasconi  
Service de pneumologie, CHUV

**Expert**

Dr Thierry Roger  
Service des maladies infectieuses, CHUV

**Lausanne, Novembre 2015**

## **Remerciements**

Je tiens à remercier tout particulièrement Eric Bernasconi pour m'avoir fait découvrir le travail de laboratoire, m'avoir aiguiller dans mes recherches ainsi que pour sa grande disponibilité durant ces nombreux mois de travail.

Je remercie également le Prof. Nicod pour sa disponibilité et pour avoir toujours répondu rapidement à mes interrogations.

Merci à Steve Casas pour sa précieuse aide lors de la rédaction de mon travail.

Merci à ma famille pour son soutien tout au long de mes études et de mon travail de master.

Finalement, je remercie Arnaud, Nicolas et Nathanaël pour ces nombreuses années d'études passées ensemble et pour leur soutien tout au long de ce travail.

## Introduction

La transplantation pulmonaire est une option thérapeutique d'ultime recours pour les patients souffrant de maladies pulmonaires telles que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la mucoviscidose, l'hypertension artérielle pulmonaire sévère et la fibrose pulmonaire. Bien que devenue une intervention établie, elle est associée chez 30 à 50% des patients à cinq ans post-greffe au développement d'une dysfonction chronique du greffon, principalement liée à une inflammation chronique et un remodelage tissulaire à l'origine d'une fibrose (1, 2).

Le principal facteur limitant la survie à long terme des patients transplantés est le rejet chronique (*Chronic Lung Allograft Disease*, CLAD), qui regroupe le syndrome de bronchiolite oblitérante (*Bronchiolitis Obliterans Syndrome*, BOS) et un syndrome restrictif (*Restrictive Allograft Syndrome*, RAS), et dont les facteurs de risques principaux sont les épisodes de rejets aigus ainsi que les infections respiratoires (3-6). Le BOS est une obstruction progressive du flux d'air dans les petites bronches due à une fibrose sous-mucosale. La définition clinique du BOS correspond à une diminution de plus de 20% du FEV<sub>1</sub> (volume expiratoire forcé) pendant plus de 3 semaines, sans amélioration sous bronchodilatateurs (7). Le RAS est caractérisé par un déclin de plus de 20% du FEV<sub>1</sub> ainsi qu'un déclin de plus de 10% de la Capacité Vitale et de la Capacité Pulmonaire Totale (syndrome restrictif) pendant plus de 3 semaines, irréversible sous bronchodilatateurs (8). À l'histologie, on observe des dommages alvéolaires diffus ainsi qu'une fibro-élastose pleuro-parenchymale (7,8). Par ailleurs, la survie est plus délicate en cas de RAS que de BOS (8).

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) des patients transplantés stables est composé en majeure partie de macrophages, les cellules les plus abondantes dans les alvéoles pulmonaires (9). La présence d'une neutrophilie constitue un facteur de risque pour le développement de CLAD. Certains patients présentant un CLAD associé à une neutrophilie au LBA récupèrent leur fonction pulmonaire sous Azithromycine ; cela décrit un nouveau type de CLAD réversible avec un traitement d'Azithromycine (10).

Les macrophages se distinguent par un véritable spectre d'activation leur permettant d'acquérir une grande plasticité fonctionnelle et de répondre aux variations du microenvironnement alvéolaire (11-14). Cependant, parallèlement au paradigme de l'activation lymphocytaire Th1/Th2, l'activation des macrophages a été décrite comme classique (macrophages de type M1) ou alternative (macrophages de type M2) (15-17). Les macrophages de type M1, généralement retrouvés en cas d'inflammation aiguë et lors de nombreuses infections, produisent des cytokines pro-inflammatoires (tels que le TNF $\alpha$ , COX2 et CXCL11 ; voir Tableau1), des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote microbicides, causant des dommages tissulaires. Les macrophages de type M2, qui constituent une classe plus hétérogène de cellules, sont impliqués dans la phase de résolution de la réaction inflammatoire, ainsi que dans la réparation et le remodelage tissulaire (notamment par la production de TIMP1, PDGFD et FN1; voir Tableau 1) (18,19).

Le degré de variabilité de l'activation des macrophages alvéolaires au cours de la période post-greffe, et en fonction de l'évolution clinique du transplanté pulmonaire, reste à être élucidé. Le rôle promoteur de certains macrophages de type M2 dans le

remodelage tissulaire soulève l'importante question de leur possible implication dans les processus de fibrogénèse associés au développement de CLAD (20-26). Des enseignements peuvent être tirés du domaine de la greffe rénale, dans laquelle le rôle des macrophages dans la dysfonction chronique du greffon a été davantage étudié. Ainsi, la fibrose rénale a pu être liée à une infiltration de macrophages pro-fibrotiques induisant le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire, le remodelage des tissus et l'angiogenèse (27,28).

Chez le transplanté pulmonaire, le microenvironnement alvéolaire est influencé par de très nombreux facteurs d'origine endogène ou exogène. Parmi les facteurs exogènes, les traitements médicamenteux administrés dans le but de diminuer les réponses immunes dirigées contre le greffon sont connus pour influencer le profil d'activation des macrophages. Ainsi, des études ont permis de montrer que les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone modulent un nombre important de gènes impliqués dans l'immunité, diminuant notamment la production de cytokines pro-inflammatoires, et augmentant l'expression de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et l'IL-1ra. D'autre part, les glucocorticoïdes ont été décrits comme induisant l'expression de TGF $\beta$ , un facteur impliqué tant dans des fonctions immunorégulatrices que pro-fibrotiques (29,30).

D'autres immunosuppresseurs utilisés en thérapie post-greffe ont été bien étudiés dans la dysfonction chronique du greffon suite à une transplantation rénale. Les études démontrent que certains de ces agents, notamment le tacrolimus et le mycophénolate mofétil, ont tendance à réduire le taux de TGF $\beta$  dans l'environnement rénal, conduisant à une diminution de la fibrose (31-33). Même si les effets sur la fibrose dans le domaine de la transplantation pulmonaire apparaissent moins bien documentés et plus contrastés, des bénéfices liés à une diminution de la prévalence de rejet aigu, un facteur de risque connu pour le développement de CLAD, ont été reportés (34). Le traitement de base actuellement préconisé lors de CLAD non réversible sous Azithromycine est l'introduction d'une combinaison de Tacrolimus et Mycophénolate Mofétil comme traitement immunosuppresseur, ainsi que de faibles doses de corticostéroïdes (prednisone) (35). Cependant, les effets à long terme de la combinaison de ces immunosuppresseurs sur la fibrose pulmonaire restent à être clarifiés.

Les patients transplantés sont en outre soumis à des traitements antibiotiques. Ces derniers pourraient avoir un double effet sur le profil d'activation des macrophages. D'une part, certains antibiotiques comme les macrolides exercent un effet direct sur l'état d'activation des macrophages (36,37). D'autre part, les antibiotiques ont un impact indirect sur l'activation des macrophages alvéolaires, en modifiant l'équilibre du microbiote pulmonaire, dont l'existence est dorénavant reconnue et l'influence sur les réponses immunitaires locales a été récemment établie (38).

Le but de ce travail était d'établir les bases d'un modèle d'étude *in vitro* de l'activation des macrophages alvéolaires. Au vu de la difficulté d'obtenir des macrophages issus du LBA en nombre suffisant, et étant donné la variabilité attendue du profil d'activation des macrophages alvéolaires provenant de différents patients, nous avons opté pour une approche basée sur des macrophages différenciés à partir d'une lignée monocyttaire bien établie, les cellules THP-1 (39,40). Les objectifs étaient d'obtenir une source fiable et stable de macrophages en exposant des cellules de la lignée THP-1 au facteur de différenciation M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), puis d'en vérifier le

statut de macrophage en regard des cellules THP-1 non différenciées. Les macrophages dérivés des cellules THP-1 (THP1-M) devaient également être testés quant à leur capacité de réponse à différents stimuli potentiellement rencontrés dans le poumon du transplanté pulmonaire, et connus pour leur effet inducteur de profils d'activation contrastés (inflammation, remodelage tissulaire). Enfin, l'analyse en parallèle d'une série de LBA collectés chez des patients transplantés ou non-transplantés devait permettre d'une part une comparaison du profil d'activation des macrophages alvéolaires chez ces deux groupes de patients, et d'autre part d'évaluer le degré de correspondance entre l'effet d'une immunosuppression sur les macrophages alvéolaires et celui d'un glucocorticoïde sur les THP1-M.

## **Matériel et méthodes**

### *Considérations éthiques*

Cette étude est approuvée par la Commission cantonale d'éthique de la recherche sur l'être humain. Chaque patient a été informé de l'étude et a donné son consentement écrit à l'utilisation du matériel prélevé lors du lavage broncho-alvéolaire. Les bronchoscopies sont effectuées pour des indications cliniques de routine post-transplantation ou lors d'investigation à but diagnostique chez des patients non-transplantés. Cette étude n'interfère pas avec le traitement ou le suivi du patient.

### *Patients et échantillons*

Les échantillons recueillis proviennent de 11 patients transplantés pour de multiples indications telles que mucoviscidose, fibrose idiopathique, BPCO, et autres maladies pulmonaires ainsi que de 7 patients non-transplantés subissant une bronchoscopie à but diagnostique. Les patients transplantés ont subi une greffe uni ou bi-pulmonaire.

### *Prélèvement du liquide de lavage broncho-alvéolaire*

Les patients ont subi une bronchoscopie trans-orale ou trans-nasale sous sédation en état de conscience modéré dans le cadre de la surveillance post-greffe ou dans le cadre d'investigation d'une maladie pulmonaire. La récolte du matériel broncho-alvéolaire s'effectue par l'instillation de 100ml de solution saline au niveau du lobe moyen ou de la lingula. Par la suite, dans le cadre des examens complémentaires de routine, le matériel récolté est soumis à une formule broncho-alvéolaire (répartition leucocytaire), à une mise en culture bactérienne et fongique ainsi qu'à une analyse par PCR afin de détecter une éventuelle infection virale.

Lors de chaque bronchoscopie, un échantillon de 3ml de matériel broncho-alvéolaire a été prélevé, stocké à 4°C puis centrifugé (10 minutes à 2000 x g). Le culot cellulaire a ensuite été lysé dans un tampon dénaturant préservant l'ARN (tampon RLT; Qiagen, Hilden, Germany) et le lysat a été congelé à -80°C pour conservation et utilisation ultérieure.

*Extraction et purification de l'ARN total des cellules du liquide de LBA et analyse par PCR quantitative (PCRq) de 12 gènes-cibles*

Le lysat de cellules a été transféré dans des colonnes QIAshredder (Qiagen) pour homogénéiser le matériel puis le mRNA a été extrait à l'aide des composants du kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Par la suite, la concentration de mRNA a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, Waltham, MA) et la synthèse de cDNA effectuée à l'aide du kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA).

La détermination du profil d'expression génique des cellules du LBA a été basée sur une analyse par PCRq en temps réel de l'expression de 12 gènes connus pour leur implication dans plusieurs fonctions caractéristiques des macrophages (Tableau 1).

**Tableau 1** : Liste des gènes analysés par PCRq (11,15,41,42)

<b>Fonction associée au gène chez les macrophages</b>	<b>Gènes (dénomination anglaise et symbole)</b>
Inflammation	Chemokine C-X-C motif Ligand 11 (CXCL11), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ), Cyclo-Oxygenase 2 (COX2).
Immunorégulation	Interleukin-10 (IL-10), Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1ra)
Phagocytose	Mannose Receptor C type 1 (MRC1), Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN)
Remodelage	Tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP1), Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12), Fibronectin 1 (FN1), Platelet derived growth factor D (PDGFD)

Afin de permettre des comparaisons entre différentes conditions expérimentales ou entre patients, le nombre de copies détecté pour chaque gène a été normalisé en fonction du nombre de copies du gène de référence GNB2L1, dont l'expression a été démontrée comme étant très stable dans le poumon.

*Culture de cellules THP-1, différenciation en macrophages et stimulation*

Les cellules THP-1 (TIB-202 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA ; un don du Service des maladies infectieuses, CHUV) sont des cellules de la lignée monocyttaire issues d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë. Elles ont été cultivées dans un milieu de RPMI 1640 contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS), 20  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml de pénicilline et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine (tous de Life Technologies, Carlsbad, CA) à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour la génération de macrophages THP1-M, des plaques à 24 puits ont été prétraitées avec 400 µl de FBS et mises à incuber durant 60 minutes. Les cellules THP-1 ont été centrifugées à 300 x *g* pendant 10 minutes, puis suspendues à nouveau dans un milieu de culture complété par 100 ng/ml M-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ), 20% FBS et 10 mM HEPES. Elles ont été distribuées à raison de 10<sup>5</sup> cellules par puits, et incubées pendant 7 jours à 37°C, sans changement de milieu.

Pour l'étape de stimulation, le surnageant des puits a été remplacé par du milieu X-VIVO 15 (Lonza, Bâle) dépourvu de sérum, contenant l'un des facteurs suivants :

- LPS/IFN $\gamma$  : LPS issu de *E. coli* 055:B5 (10ng/ml; Sigma, St. Louis, MO) en combinaison avec IFN $\gamma$  (20 ng/ml ; ProSpec-Tany, TechnoGene, Rehovot, Israel)
- TGF $\beta$  (20ng/ml ; eBioscience, San Diego, CA)
- Dexaméthasone : 100 nM (Sigma)

Chaque condition de stimulation a été testée en 3 réplicats. Après 18 heures de stimulation, les cellules THP1-M ont été prélevées, lysées et analysées selon la même méthode que celle utilisée pour l'analyse de l'expression génique des cellules du LBA.

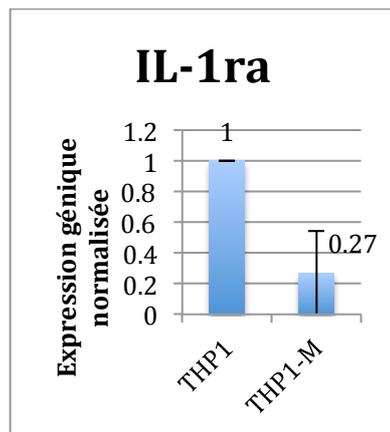
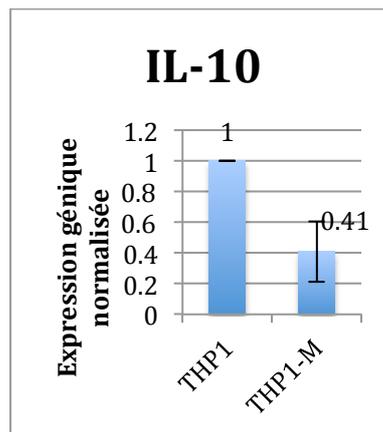
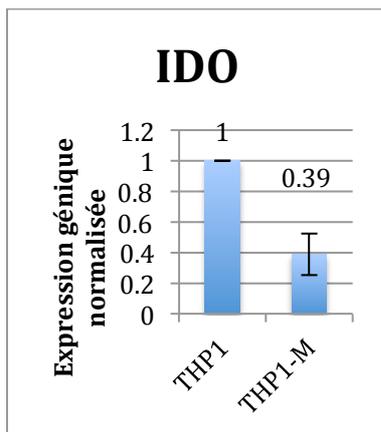
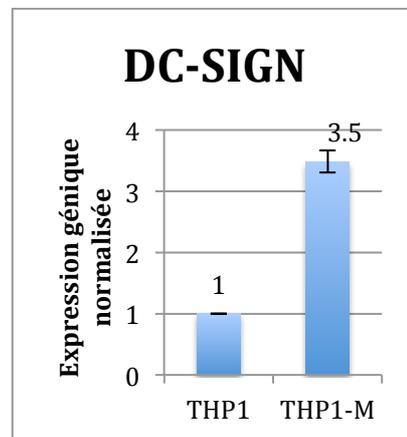
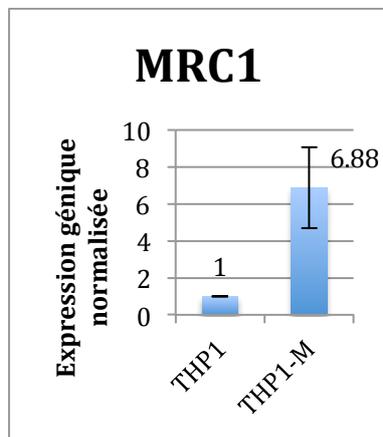
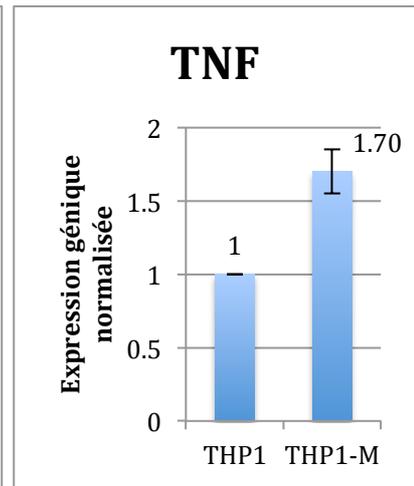
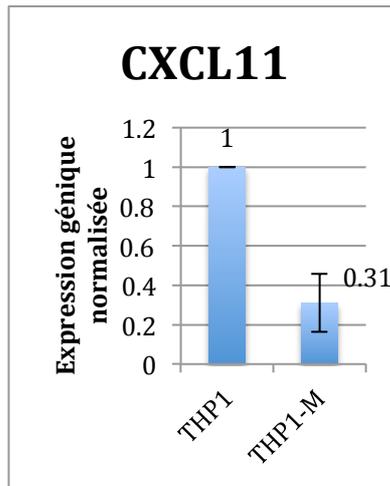
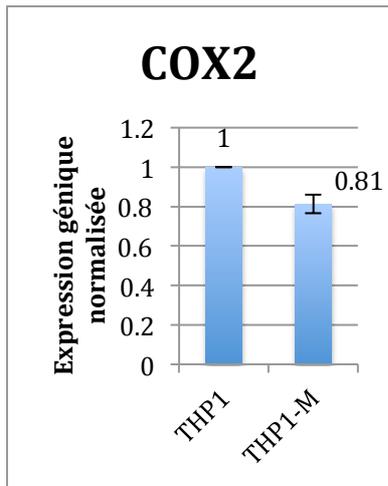
## Résultats

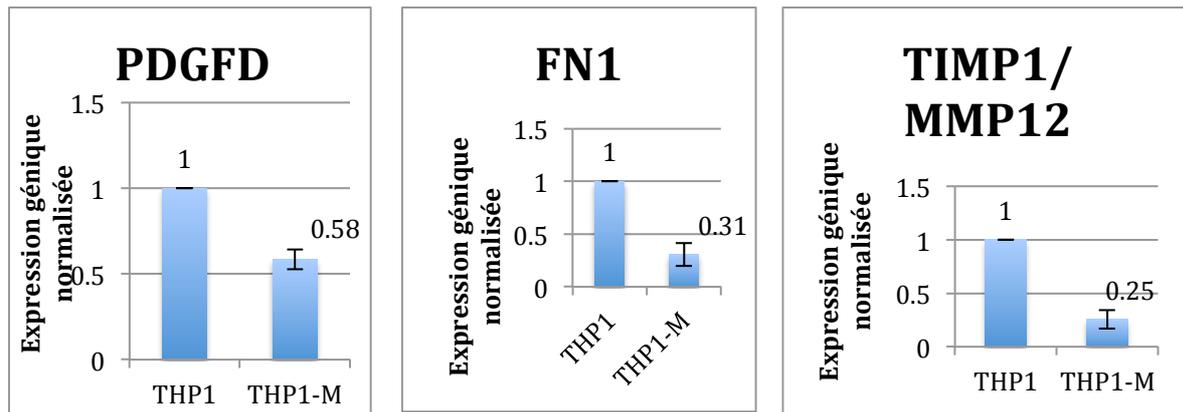
*L'exposition de monocytes THP-1 au M-CSF entraîne une différenciation efficace en macrophages THP1-M.*

Les cellules THP-1 utilisées dans le cadre de ce travail, sont des cellules dérivées de la lignée monocyttaire, précurseur des macrophages. En vue d'obtenir une source stable de macrophages pouvant être utilisés dans notre modèle de stimulation *in vitro*, les monocytes THP-1 ont été exposés au M-CSF, un facteur connu de différenciation des macrophages.

Comme indiqué dans la figure 1, le profil d'activation des macrophages THP1-M s'est avéré très différent de celui des monocytes THP-1, soulignant l'efficacité de l'étape de différenciation. Les différences observées dans le niveau d'expression génique ont en effet varié en fonction des gènes considérés. Ainsi, l'expression des gènes COX2, TNF $\alpha$  et CXCL11 associés à un profil inflammatoire s'est révélée respectivement stable, augmentée et diminuée. Les marqueurs associés au remodelage tissulaire (PDGFD, FN1 et le rapport TIMP1/MMP12) présentent eux une diminution coordonnée de leur expression chez les cellules THP1-M. L'expression des gènes impliqués dans la phagocytose, tel que MRC1 et DC-SIGN a nettement augmenté chez les cellules différenciées THP1-M tandis que celle des cytokines inflammatoires IDO, IL-10 et IL-1ra a quant à elle diminué par rapport aux cellules non-différenciées.

Ces résultats montrent l'efficacité de la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages THP1-M, suite à l'exposition au M-CSF. En effet, un profil d'expression génique différent de celui des cellules THP-1 non-différenciées est retrouvé chez les macrophages THP1-M. De plus, leurs résultats indiquent que les différences observées dans le profil d'activation génique lors de ce processus ne s'inscrivent pas dans le cadre de l'acquisition d'un profil de macrophages de type M1 ou M2.





**Figure 1.** Evaluation de l'efficacité de la différenciation de monocytes THP-1 en macrophages THP1-M. Le profil d'activation génique dans les 2 types cellulaires a été déterminé sur la base de l'analyse par PCRq de l'expression d'un set de 12 gènes-cibles (Tableau 1). Les valeurs, corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1, ont été normalisées en fonction du taux d'expression déterminé dans les monocytes THP-1. Les valeurs représentent la moyenne et la déviation standard d'une expérience menée avec 3 réplicats.

*Les macrophages THP1-M sont capables de répondre de manière distincte à des facteurs stimulant l'inflammation ou le remodelage tissulaire.*

L'objectif futur de cette étude étant d'évaluer les effets de facteurs présents dans le poumon du transplanté pulmonaire sur les macrophages THP1-M, il était important de tester la capacité de réponse de ces cellules à des stimuli bien déterminés.

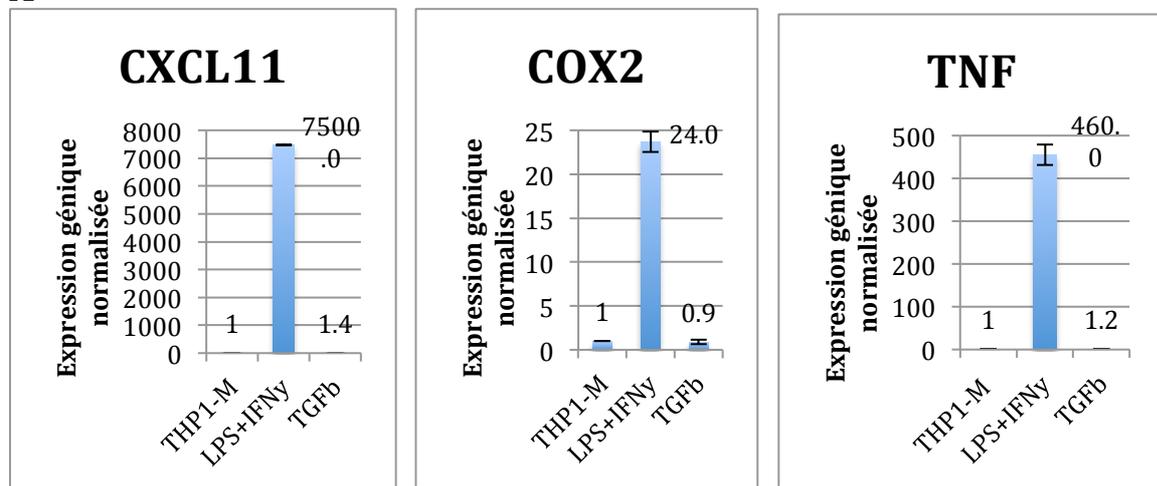
L'exposition de macrophages à un mélange d'IFN $\gamma$  et de LPS, une molécule de la paroi des bactéries Gram négatives, est reconnue pour son effet inducteur d'une réponse pro-inflammatoire. L'élévation très marquée de l'expression des gènes TNF $\alpha$ , COX2 et CXCL11 chez les THP1-M stimulés par le mélange IFN $\gamma$  et LPS démontre clairement leur capacité de répondre à un stimulus inflammatoire (Fig. 2A). Cette augmentation s'est révélée suivie par celle de l'expression du gèneIDO impliqué dans l'immunorégulation, un phénomène connu chez les macrophages de type M1 (43), s'inscrivant dans leur capacité de prévenir une réponse inflammatoire trop importante (Fig. 2B). L'expression de MRC1, une cytokine impliquée dans la fonction de phagocytose des macrophages s'est montrée augmentée lors d'une stimulation pro-inflammatoire (Fig. 2C). Dans ces conditions, le rapport TIMP1/MMP12 s'est avéré très nettement diminué (Fig. 2D). Comparant l'expression du gène TIMP1, dont le produit prévient la dégradation de la matrice extracellulaire, à celle du gène MMP12, dont le produit exerce une fonction opposée de par ses propriétés enzymatiques, ce rapport a été décrit comme reflétant les caractéristiques du macrophage à contribuer au remodelage tissulaire (44). De plus, la légère baisse d'expression du gène PDGFD s'inscrit dans la diminution des gènes impliqués dans le remodelage tissulaire provoquée par une stimulation pro-inflammatoire (Fig. 2D). Ces observations indiquent par conséquent la capacité des macrophages THP1-M à acquérir une polarisation de type M1.

Les macrophages THP1-M ont par ailleurs été exposés au TGF $\beta$ , une cytokine bien décrite pour son implication dans la réparation tissulaire, ainsi que dans le remodelage anormal lié à la fibrose (25,45). Dans ces conditions, le niveau d'expression des gènes

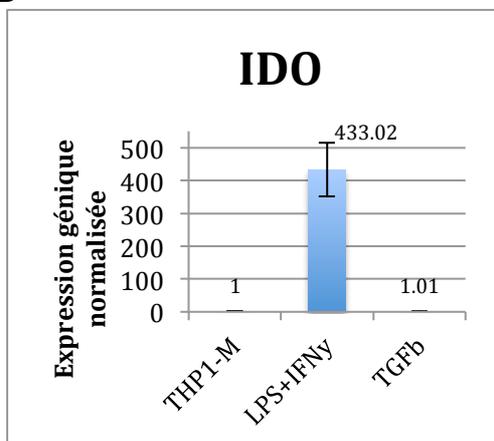
COX2 et TNF $\alpha$  liés à l'inflammation, et celui des gènes MRC1 et IDO liés à l'immunorégulation, s'est avéré constant en présence ou absence de stimulation. En net contraste et en accord avec les données de la littérature, le niveau d'expression du gène PDGFD et le rapport d'expression entre les gènes TIMP1 et MMP12 se sont avérés nettement augmentés en présence de TGF $\beta$ , comparativement aux cellules non stimulées.

En conséquence, cette expérience de stimulation a permis de démontrer que les macrophages THP1-M présentent une grande plasticité d'activation, aussi bien dans des conditions pro-inflammatoires, par l'acquisition d'un profil de macrophages de type M1, que dans des conditions favorisant le remodelage tissulaire, par l'acquisition d'un profil de macrophages de type M2.

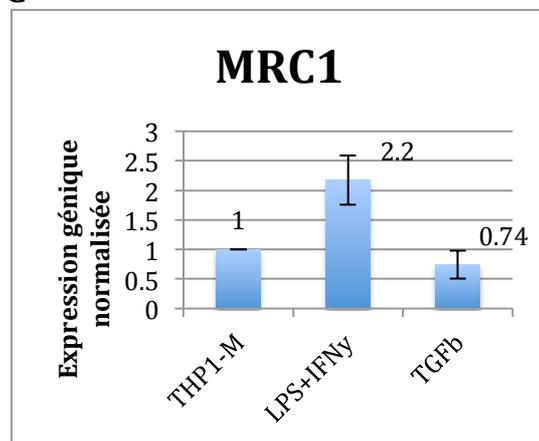
**A**

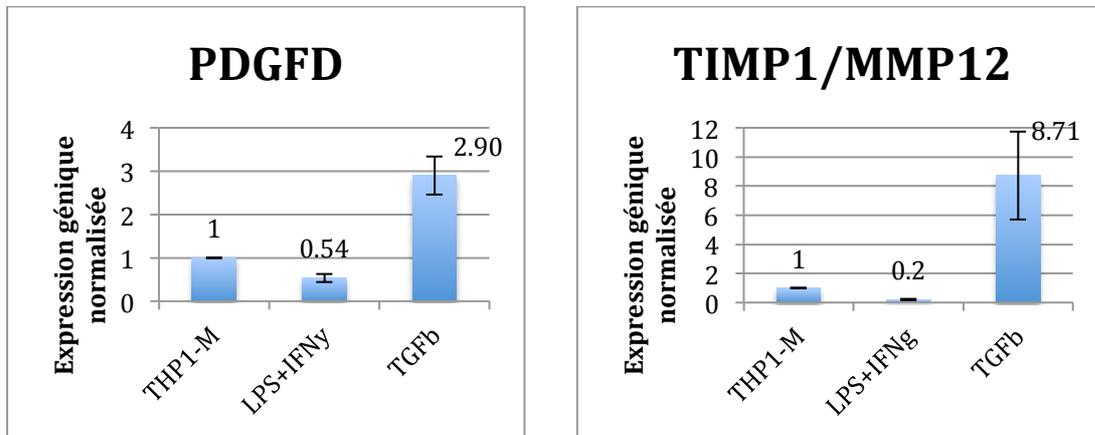


**B**



**C**



**D**

**Figure 2.** Evaluation de la réponse des macrophages THP1-M à des facteurs stimulant l'inflammation (LPS+IFN $\gamma$ ) ou le remodelage tissulaire (TGF $\beta$ ).

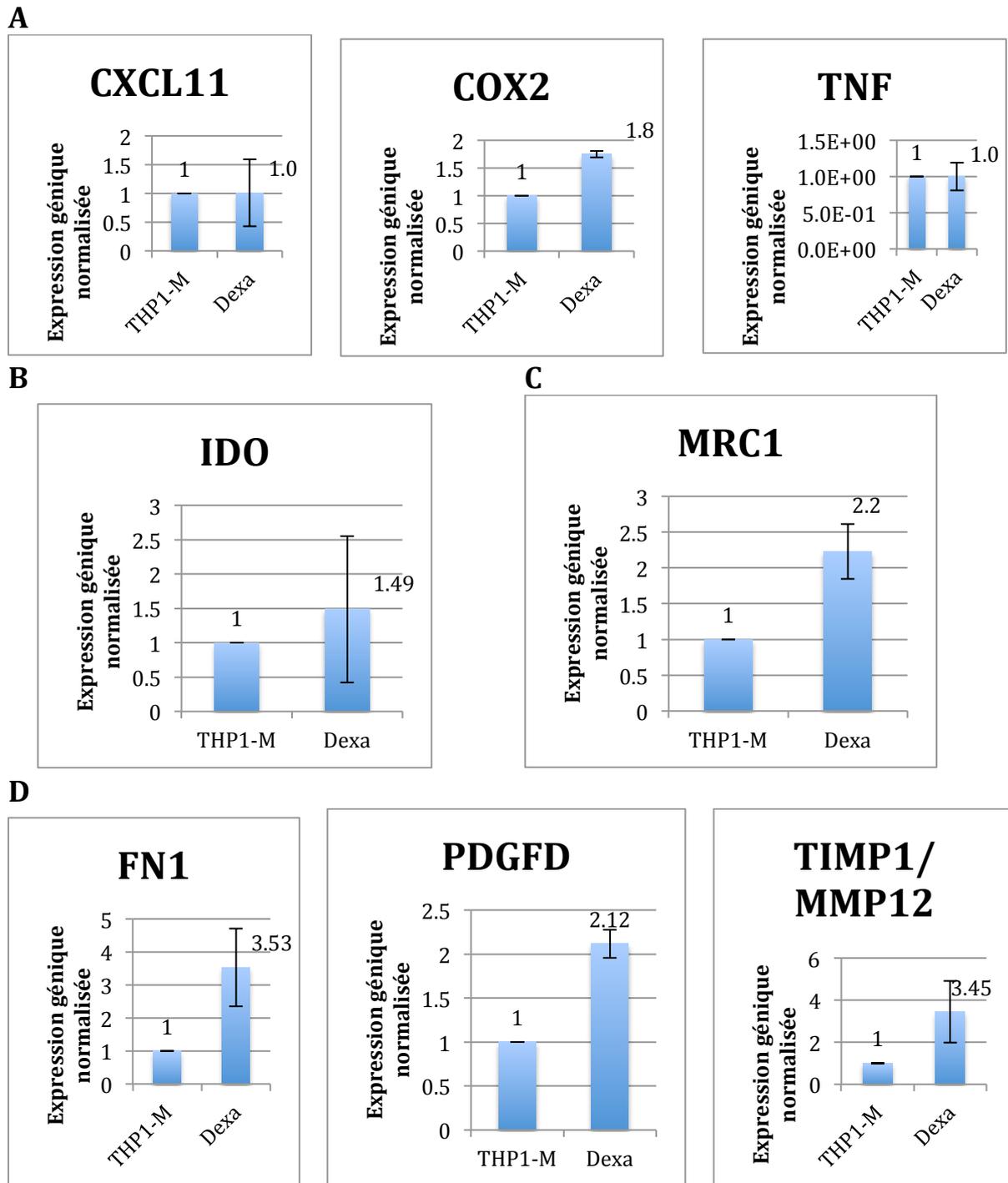
Analyse par PCRq de l'expression d'une sélection de gènes impliqués dans (A) l'inflammation, (B) l'immunorégulation (C) la phagocytose et (D) le remodelage tissulaire, permettant d'établir le profil d'activation des macrophages THP1-M. Les valeurs, corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1, ont été normalisées en fonction du taux d'expression déterminé chez les macrophages THP1-M non stimulés. Les valeurs représentent la moyenne et la déviation standard d'une expérience menée avec 3 réplicats.

#### *Les macrophages THP1-M répondent à la dexaméthasone.*

Les glucocorticoïdes, dont la prednisone fait partie du traitement de première intention chez le patient transplanté pulmonaire, sont connus pour moduler le profil d'activation des macrophages. La sensibilité aux glucocorticoïdes des cellules utilisées dans notre modèle de stimulation *in vitro* en substitut des macrophages alvéolaires devait donc être testée et confirmée. La dexaméthasone étant le glucocorticoïde prototypique testé dans un nombre important d'études *in vitro*, elle a été sélectionnée comme premier choix, afin de comparer ses effets à ceux précédemment reportés.

En accord avec la littérature, les résultats indiquent que les macrophages THP1-M répondent à la dexaméthasone par une augmentation du taux d'expression des gènes associés au remodelage tissulaire (Fig. 3D), tout en influant peu sur celui des gènes impliqués dans l'inflammation (Fig. 3A). Globalement, le profil d'activation se rapproche ainsi de celui précédemment observé suite à la stimulation par le TGF $\beta$ , même si la modulation différente de certains gènes tel que MRC1 (comparer Fig. 3C et Fig. 2C), rappelle que les voies d'activation sont bien distinctes.

Si elles devaient être confirmées dans des expériences menées ultérieurement avec de la prednisone, ces données apporteraient une indication supplémentaire sur l'important potentiel des macrophages THP1-M dans un modèle d'activation *in vitro* impliquant différents facteurs présents dans les voies aériennes du patient transplanté pulmonaire.



**Figure 3.** Evaluation de la réponse des macrophages THP1-M à la dexaméthasone.

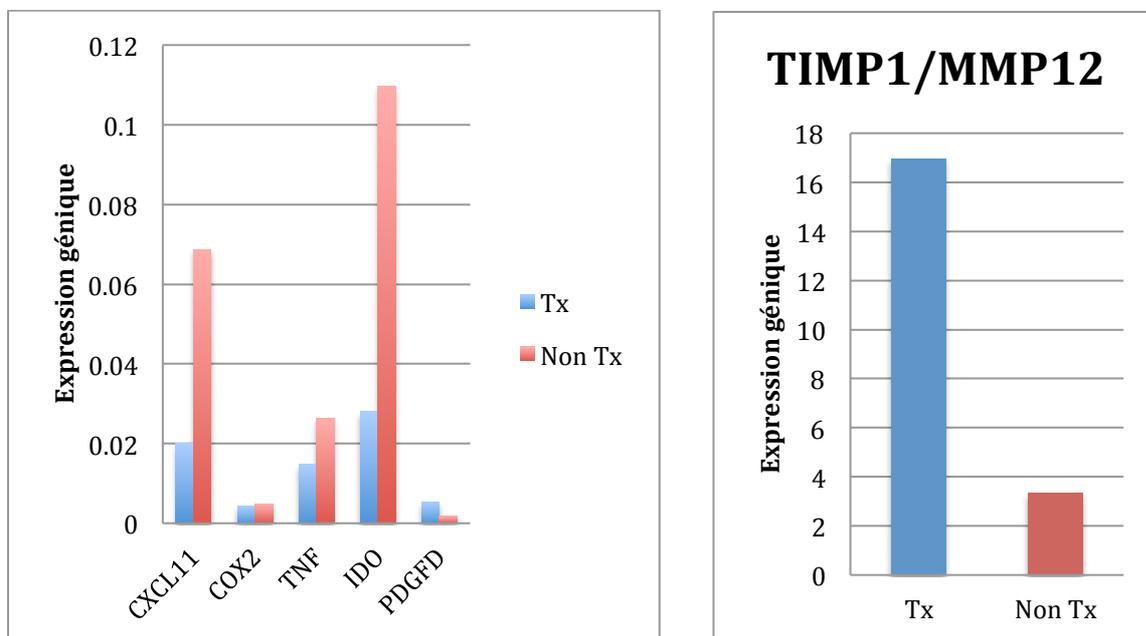
Analyse par PCRq de l'expression d'une sélection de gènes impliqués dans (A) l'inflammation, (B) l'immunorégulation, (C) la phagocytose et (D) le remodelage tissulaire, permettant d'établir le profil d'activation des macrophages THP1-M. Les valeurs, corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1, ont été normalisées en fonction du taux d'expression déterminé chez les macrophages THP1-M non stimulés. Les valeurs représentent la moyenne et la déviation standard d'une expérience menée avec 3 réplicats.

*Le profil d'activation des macrophages alvéolaires présente des similitudes avec celui des macrophages THP1-M et varie en fonction du contexte clinique*

Le prélèvement d'échantillons de liquide de LBA offre l'avantage de donner accès aux cellules présentes dans les voies aériennes inférieures. Postulant que la plasticité du profil d'activation des cellules présentes dans le liquide de LBA devrait permettre de refléter différentes situations cliniques, nous avons analysé 11 échantillons provenant de patients transplantés, et 7 échantillons collectés chez des patients non-transplantés lors d'exams à but diagnostique.

De manière très intéressante, malgré la multitude de facteurs stimulant les cellules *in vivo*, des profils d'activation distincts présentant des similitudes avec ceux obtenus chez les macrophages THP1-M stimulés *in vitro* ont pu être observés chez certains patients. Ainsi, illustrant l'impact du traitement immunosuppresseur, le taux d'expression des gènes CXCL11 et IDO s'est avéré nettement diminué chez les patients transplantés pulmonaires, comparé aux patients non-transplantés (Fig. 4). En outre, le taux d'expression du gène PDGFD et le rapport d'expression TIMP1/MMP12 supérieurs chez les patients transplantés correspondent aux observations précédemment effectuées chez les macrophages THP1-M, en présence ou absence de dexaméthasone.

Ces données montrent que malgré d'importantes différences interindividuelles, l'impact du traitement immunosuppresseur chez le transplanté pulmonaire se retrouve clairement dans le profil d'activation des cellules isolées du liquide de LBA. Elles valident en outre l'utilisation des macrophages THP1-M comme substitut des macrophages alvéolaires, dans un modèle de stimulation *in vitro* incluant notamment l'utilisation de glucocorticoïdes.

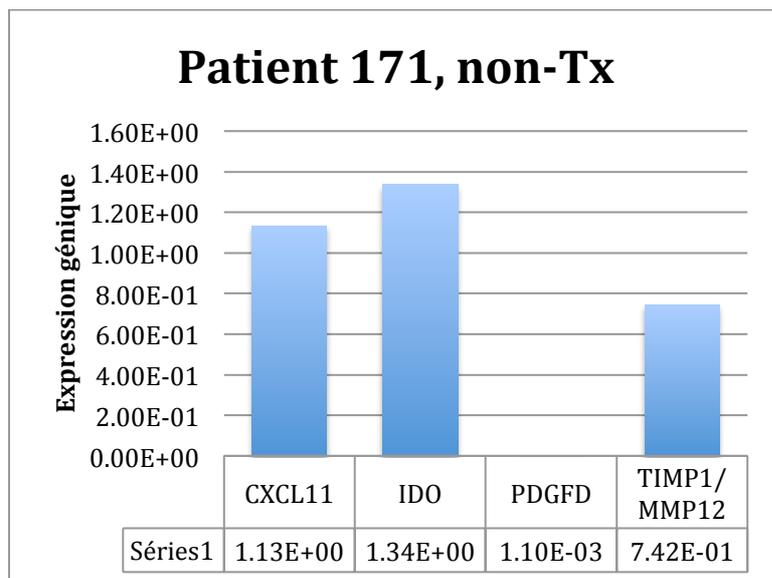


**Figure 4.** Evaluation comparative du profil d'activation des cellules du liquide de LBA chez les patients transplantés (Tx, n=11) ou non-transplantés (Non-Tx, n=9). Les valeurs, corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1, représentent la médiane.

## Profils d'activation de type inflammatoire ou de remodelage tissulaire chez les macrophages alvéolaires: deux rapports de cas

Dans cette étude, le groupe de gènes-cibles sélectionnés pour la détermination du profil d'activation des cellules du liquide de LBA permettent de distinguer une inflammation de type 1, typiquement associée à une réponse pro-inflammatoire, d'une inflammation de type 2, associée à la phase de résolution et au remodelage tissulaire. Ces deux types de processus étant susceptibles de coexister dans le poumon, il était important de vérifier que le profil net d'activation des macrophages alvéolaires ne correspondait pas systématiquement au même statut intermédiaire chez l'ensemble des patients. La comparaison d'un patient non-transplanté, examiné pour une suspicion de sarcoïdose (patient 171), et un patient ayant subi une transplantation pulmonaire suite à une mucoviscidose (patient 194) a permis de démontrer que tel n'était pas le cas. Au contraire, tant le taux d'expression des différents gènes considérés que le profil d'activation, comparant l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation ou le remodelage tissulaire, mettent en évidence d'importantes différences (Fig. 5 et 6).

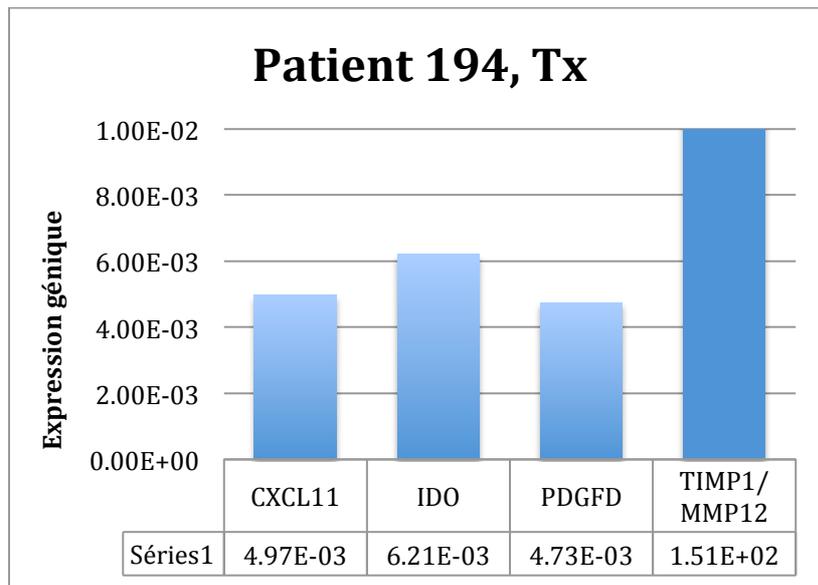
Le patient 171 présente un profil d'activation de type pro-inflammatoire similaire à celui observé chez les macrophages THP1-M1 stimulés par du LPS+IFN $\gamma$  *in vitro*. Ainsi, le taux d'expression des gènes CXCL11 et IDO est élevé, et celui du gène PDGFD ainsi que le rapport d'expression TIMP1/MMP12 sont faibles (Fig. 5).



**Figure 5.** Evaluation du profil d'activation des cellules du liquide de LBA d'un patient non-transplanté (non-Tx), examiné pour une suspicion de sarcoïdose. Les valeurs du taux d'expression de chaque gène ont été corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1.

Le patient 194 présente un tableau différent, avec un profil d'activation se rapprochant de celui observé chez les macrophages THP1-M2 stimulés par le TGF $\beta$ . Le niveau d'expression des gènes CXCL11 et IDO est ainsi très fortement diminué comparé à celui observé chez le patient 171. Le taux d'expression du gène PDGFD et surtout le rapport d'expression TIMP1/MMP12 étant clairement plus élevés chez le patient 194, celui-ci

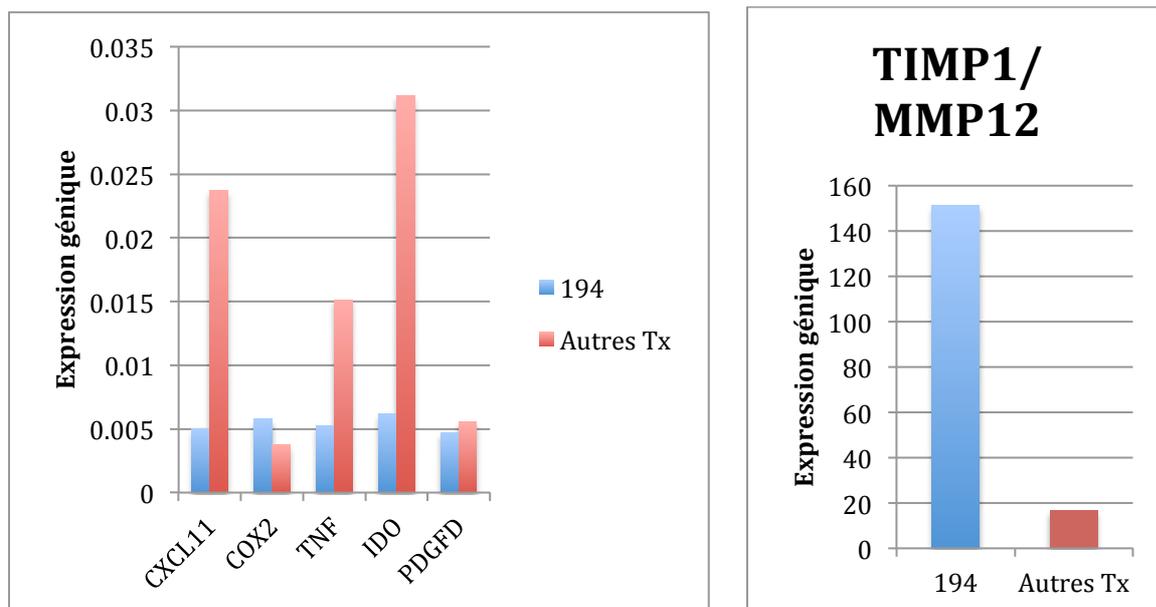
présente par conséquent un profil net d'activation en faveur du remodelage tissulaire (Fig. 6).



**Figure 6.** Evaluation du profil d'activation des cellules du liquide de LBA d'un patient transplanté (Tx) pour cause de mucoviscidose. Les valeurs du taux d'expression de chaque gène ont été corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1.

Parmi les 11 échantillons reçus de patients transplantés, celui provenant du patient 194 paraissait présenter un profil d'activation particulier. Afin d'évaluer si notre outil analytique était capable de distinguer, outre les différences marquées comme celles entre patients immunocompétents ou immunosupprimés, des différences plus subtiles comme celles observées au sein du groupe de patients transplantés, nous avons spécifiquement comparé le profil d'activation des macrophages alvéolaires du patient 194 avec celui des 10 autres patients transplantés.

Les résultats indiquent un niveau d'expression des gènes CXCL11, TNF $\alpha$  et IDO inférieur chez le patient 194, suggérant une faible activité pro-inflammatoire (Fig. 7). Comme dans le même temps, le rapport d'expression TIMP1/MMP12 s'avère très élevé, le profil d'activation chez ce patient apparaît refléter un engagement dans des processus de remodelage tissulaire.



**Figure 7.** Comparaison entre le profil d'activation du patient 194 et celui des 10 autres patients transplantés (Autres Tx). Les valeurs du taux d'expression de chaque gène ont été corrigées en fonction de l'expression du gène de référence GNB2L1. Les valeurs du groupe « Autres Tx » représentent la médiane.

## Discussion

Chez le patient transplanté pulmonaire, la survie à long-terme du greffon reste limitée par différents facteurs aboutissant à une activation du système immunitaire et au rejet du greffon. Alors que le contrôle des infections post-opératoires et celui des épisodes de rejet aigu est en constant progrès, la survenue de rejets chroniques, associée à des mécanismes fibrotiques obstructifs et/ou restrictifs, reste un obstacle majeur (1-6). Le développement d'outils capables de détecter précocement ces mécanismes représenterait par conséquent un progrès important dans le suivi post-greffe.

Les voies aériennes du patient transplanté pulmonaire connaissent de considérables variations micro-environnementales, influencées notamment par les niveaux d'inflammation et de remodelage tissulaire locaux (9,10). Dans la présente étude, nous anticipons sur le fait que ces conditions micro-environnementales sont reflétées par le contenu du liquide de LBA, spécifiquement par le profil d'activation des macrophages alvéolaires, et que leur analyse est susceptible d'apporter d'importantes informations sur l'état du greffon.

Les macrophages alvéolaires sont des cellules présentant une plasticité transcriptionnelle et fonctionnelle considérable (11-14). Dans un microenvironnement inflammatoire, ils expriment des gènes tels que CXCL11, TNF $\alpha$  et COX2, qui contribuent au recrutement et à l'activation de cellules pro-inflammatoires, ainsi que des gènes impliqués dans le contrôle de l'inflammation, tel que IDO. Dans ces conditions, l'expression de gènes associés au remodelage tissulaire tel que PDGFD est réprimée. Les conditions favorisant le remodelage tissulaire exercent globalement un effet inverse,

augmentant le taux d'expression de PDGFD, et diminuant celui des gènes typiquement associés à l'inflammation (15-19). En outre, le rapport d'expression TIMP1/MMP12 varie de manière coordonnée en fonction de ces conditions. Le gène TIMP1 codant une protéine inhibant la dégradation de la matrice intracellulaire, et le gène MMP12 codant une enzyme présentant l'effet inverse, un rapport d'expression élevé est associé à des conditions favorisant le remodelage tissulaire (44).

L'analyse du profil d'activation des macrophages alvéolaires récoltés de liquide de LBA montre que les gènes choisis comme cibles sont appropriés pour distinguer des situations diverses telles qu'un terrain immunocompétent ou immunosupprimé. En effet, le profil d'expression génique des macrophages provenant de patients transplantés s'est avéré sensiblement différent de celui observé chez les patients non-transplantés et, par ailleurs, très proche de celui retrouvé chez les macrophages THP1-M stimulés avec de la dexaméthasone.

Une analyse reproductible de l'activation des macrophages dans le poumon passe également par des tests de stimulation *in vitro*. Etant donné la variabilité des profils d'activation observés *in vivo*, l'identification d'une source stable de cellules utilisables comme substitut des macrophages alvéolaires est un prérequis. Les résultats obtenus dans les expériences de différenciation et stimulation des macrophages THP1-M indiquent que ces cellules peuvent acquérir des profils d'activation reflétant des conditions pro-inflammatoires ou favorisant le remodelage tissulaire. Comme les macrophages THP1-M répondent également aux glucocorticoïdes, ils se profilent comme un matériel d'analyse adapté à nos objectifs.

Il doit être mentionné que plusieurs limites sont liées à notre étude. D'une part, il n'a pas été possible de stimuler des macrophages alvéolaires issus de liquide de LBA dans les mêmes conditions que les macrophages THP1-M. Même si les profils obtenus reproduisent clairement les données de la littérature, une comparaison directe reste requise. D'autre part, les analyses effectuées à partir de liquide de LBA ne permettent pas d'établir des ponts entre les différences observées dans le profil d'activation des macrophages alvéolaires et les différentes situations cliniques. De telles investigations demandent une analyse longitudinale qui dépasserait largement le cadre de ce travail.

Néanmoins, les premiers résultats positifs obtenus quant à l'utilisation des macrophages THP1-M comme substitut des macrophages alvéolaires, et l'identification de profils d'activation distincts suite à la comparaison d'un nombre limité d'échantillons de liquide de LBA parlent en faveur de notre approche. Au vu du rôle-clé joué par les macrophages dans l'espace alvéolaire, l'étude du profil d'activation de ces cellules et particulièrement celle des facteurs déclenchant l'acquisition d'un profil pro-fibrotique devrait permettre d'apporter des informations essentielles dans le suivi du transplanté pulmonaire, notamment dans l'optique d'une détection précoce et d'un meilleur contrôle du rejet de greffe chronique.

## Bibliographie

1. Yusen, Roger D., Jason D. Christie, Leah B. Edwards, Anna Y. Kucheryavaya, Christian Benden, Anne I. Dipchand, Fabienne Dobbels, et al. « **The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report—2013; Focus Theme: Age.** » *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 32, n° 10 (1 octobre 2013): 965-78. doi:10.1016/j.healun.2013.08.007.
2. Todd, Jamie L., Jason D. Christie, et Scott M. Palmer. « **Update in Lung Transplantation 2013** ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 190, n° 1 (1 juillet 2014): 19-24. doi:10.1164/rccm.201402-0384UP.
3. Pison, Christophe, Antoine Magnan, Karine Botturi, Michel Sève, Sophie Brouard, Benjamin J. Marsland, Florian Ernst, et al. « **Prediction of Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systems Medicine Challenge** ». *European Respiratory Journal* 43, n° 3 (3 janvier 2014): 689-93. doi:10.1183/09031936.00161313.
4. Verleden, Geert M., Ganesh Raghu, Keith C. Meyer, Allan R. Glanville, et Paul Corris. « **A new classification system for chronic lung allograft dysfunction** ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 33, n° 2 (février 2014): 127-33. doi:10.1016/j.healun.2013.10.022.
5. Boehler, A., et M. Estenne. « **Post-Transplant Bronchiolitis Obliterans** ». *European Respiratory Journal* 22, n° 6 (1 décembre 2003): 1007-18. doi:10.1183/09031936.03.00039103.
6. Sharples, Linda D., Keith McNeil, Susan Stewart, et John Wallwork. « **Risk Factors for Bronchiolitis Obliterans: A Systematic Review of Recent Publications** ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 21, n° 2 (février 2002): 271-81.
7. Todd, Jamie L., et Scott M Palmer. « **Bronchiolitis obliterans syndrome: The final frontier for lung transplantation** ». *CHEST Journal* 140, n° 2 (1 août 2011): 502-8. doi:10.1378/chest.10-2838.
8. Sato, Masaaki, Thomas K. Waddell, Ute Wagnetz, Heidi C. Roberts, David M. Hwang, Ayesha Haroon, Dirk Wagnetz, et al. « **Restrictive Allograft Syndrome (RAS): A Novel Form of Chronic Lung Allograft Dysfunction** ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 30, n° 7 (juillet 2011): 735-42. doi:10.1016/j.healun.2011.01.712.
9. Slebos, Dirk-Jan, Janny Scholma, H. Marika Boezen, Gerard H. Koëter, Wim Van Der Bij, Dirkje S. Postma, et Henk F. Kauffman. « **Longitudinal Profile of Bronchoalveolar Lavage Cell Characteristics in Patients with a Good Outcome after Lung Transplantation** ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, n° 4 (15 février 2002): 501-7. doi:10.1164/ajrccm.165.4.2107035.

10. Kennedy, V. E., J. L. Todd, et S. M. Palmer. « **Bronchoalveolar Lavage as a Tool to Predict, Diagnose and Understand Bronchiolitis Obliterans Syndrome** ». *American Journal of Transplantation* 13, n° 3 (1 mars 2013): 552-61. doi:10.1111/ajt.12091.
11. Mosser, David M., et Justin P. Edwards. « **Exploring the full spectrum of macrophage activation** ». *Nature Reviews Immunology* 8, n° 12 (décembre 2008): 958-69. doi:10.1038/nri2448.
12. Xue, Jia, Susanne V. Schmidt, Jil Sander, Astrid Draffehn, Wolfgang Krebs, Inga Quester, Dominic De Nardo, et al. « **Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation** ». *Immunity* 40, n° 2 (20 février 2014): 274-88. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006.
13. Stout, Robert D., Chuancang Jiang, Bharati Matta, Illya Tietzel, Stephanie K. Watkins, et Jill Suttles. « **Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences** ». *The Journal of Immunology* 175, n° 1 (7 janvier 2005): 342-49. doi:10.4049/jimmunol.175.1.342.
14. Wynn, Thomas A., Ajay Chawla, et Jeffrey W. Pollard. « **Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease** ». *Nature* 496, n° 7446 (25 avril 2013): 445-55. doi:10.1038/nature12034.
15. Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdt, Siamon Gordon, et al. « **Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines** ». *Immunity* 41, n° 1 (17 juillet 2014): 14-20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008.
16. Sica, Antonio, et Alberto Mantovani. « **Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas** ». *Journal of Clinical Investigation* 122, n° 3 (1 mars 2012): 787-95. doi:10.1172/JCI59643.
17. Martinez, Fernando O., et Siamon Gordon. « **The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment** ». *F1000Prime Reports* 6 (3 mars 2014). doi:10.12703/P6-13.
18. Gordon, Siamon, et Fernando O. Martinez. « **Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions** ». *Immunity* 32, n° 5 (28 mai 2010): 593-604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007.
19. Mia, S., A. Warnecke, X.-M. Zhang, V. Malmström, et R. A. Harris. « **An Optimized Protocol for Human M2 Macrophages Using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- $\beta$  Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype** ». *Scandinavian Journal of Immunology* 79, n° 5 (1 mai 2014): 305-14. doi:10.1111/sji.12162.
20. Byrne, Adam J., Sara A. Mathie, Lisa G. Gregory, et Clare M. Lloyd. « **Pulmonary Macrophages: Key Players in the Innate Defence of the Airways** ». *Thorax*, 18 août 2015, thoraxjnl - 2015-207020. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207020.

21. Wynn, Thomas A. « **Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm** ». *Nature reviews. Immunology* 4, n° 8 (août 2004): 583-94. doi:10.1038/nri1412.
22. Song, Erwei, Nengtai Ouyang, Markus Hörbelt, Balazs Antus, Minghui Wang, et Michael S. Exton. « **Influence of Alternatively and Classically Activated Macrophages on Fibrogenic Activities of Human Fibroblasts** ». *Cellular Immunology* 204, n° 1 (25 août 2000): 19-28. doi:10.1006/cimm.2000.1687.
23. Evers, Alena, Srebrena Atanasova, Gabriele Fuchs-Moll, Kathrin Petri, Sigrid Wilker, Anna Zakrzewicz, Markus Hirschburger, Winfried Padberg, et Veronika Grau. « **Adaptive and Innate Immune Responses in a Rat Orthotopic Lung Transplant Model of Chronic Lung Allograft Dysfunction** ». *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 1 septembre 2014. doi:10.1111/tri.12444.
24. Berastegui, C., J. Román, V. Monforte, C. Bravo, M. López-Meseguer, M.-Á Montero, M. Culebras, S. Gómez-Ollés, et A. Román. « **Biomarkers of Pulmonary Rejection** ». *Transplantation Proceedings* 45, n° 9 (1 novembre 2013): 3163-69. doi:10.1016/j.transproceed.2013.06.013.
25. Wilson, MS, et TA Wynn. « **Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation** ». *Mucosal immunology* 2, n° 2 (mars 2009): 103-21. doi:10.1038/mi.2008.85.
26. Mora, Ana L., Edilson Torres-Gonzalez, Mauricio Rojas, Claudia Corredor, Jeffrey Ritzenthaler, Jianguo Xu, Jesse Roman, Kenneth Brigham, et Arlene Stecenko. « **Activation of Alveolar Macrophages via the Alternative Pathway in Herpesvirus-Induced Lung Fibrosis** ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35, n° 4 (octobre 2006): 466-73. doi:10.1165/rcmb.2006-01210C.
27. Toki, D., W. Zhang, K. L. M. Hor, D. Liuwantara, S. I. Alexander, Z. Yi, R. Sharma, et al. « **The Role of Macrophages in the Development of Human Renal Allograft Fibrosis in the First Year After Transplantation** ». *American Journal of Transplantation* 14, n° 9 (1 septembre 2014): 2126-36. doi:10.1111/ajt.12803.
28. Guillén-Gómez, E., L. Guirado, X. Belmonte, A. Maderuelo, S. Santín, C. Juarez, E. Ars, et al. « **Monocyte Implication in Renal Allograft Dysfunction** ». *Clinical & Experimental Immunology* 175, n° 2 (1 février 2014): 323-31. doi:10.1111/cei.12228.
29. Ehrchen, Jan, Lars Steinmüller, Katarzyna Barczyk, Klaus Tenbrock, Wolfgang Nacken, Martin Eisenacher, Ursula Nordhues, Clemens Sorg, Cord Sunderkötter, et Johannes Roth. « **Glucocorticoids Induce Differentiation of a Specifically Activated, Anti-Inflammatory Subtype of Human Monocytes** ». *Blood* 109, n° 3 (1 février 2007): 1265-74. doi:10.1182/blood-2006-02-001115.
30. Galon, J. « **Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells** ». *The FASEB Journal* 16, n° 1 (1 janvier 2002): 61-71. doi:10.1096/fj.01-0245com.

31. Jiang, Shuai, Qunye Tang, Ruiming Rong, Liangfeng Tang, Ming Xu, Jidong Lu, Yichen Jia, et al. « **Mycophenolate mofetil inhibits macrophage infiltration and kidney fibrosis in long-term ischemia-reperfusion injury** ». *European Journal of Pharmacology* 688, n° 1-3 (5 août 2012): 56-61. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.001.
32. Savikko, Johanna, Anna-Maija Teppo, Eero Taskinen, et Eva von Willebrand. « **Different effects of tacrolimus and cyclosporine on PDGF induction and chronic allograft injury: Evidence for improved kidney graft outcome** ». *Transplant Immunology*. Consulté le 4 septembre 2014. doi:10.1016/j.trim.2014.08.003.
33. Luo, Lei, Zhaolin Sun, Weidong Wu, et Guangheng Luo. « **Mycophenolate mofetil and FK506 have different effects on kidney allograft fibrosis in rats that underwent chronic allograft nephropathy** ». *BMC Nephrology* 13 (2 juillet 2012): 53. doi:10.1186/1471-2369-13-53.
34. Speich, Rudolf, Silvia Schneider, Markus Hofer, Sarosh Irani, Peter Vogt, Walter Weder, et Annette Boehler. « **Mycophenolate mofetil reduces alveolar inflammation, acute rejection and graft loss due to bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation** ». *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 23, n° 5 (octobre 2010): 445-49. doi:10.1016/j.pupt.2010.04.004.
35. Verleden, Geert M., Robin Vos, Lieven Dupont, Dirk E. Van Raemdonck, Bart M. Vanaudenaerde, et Stijn E. Verleden. « **Are We near to an Effective Drug Treatment for Bronchiolitis Obliterans?** ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 15, n° 15 (octobre 2014): 2117-20. doi:10.1517/14656566.2014.954549.
36. Cory, Theodore J., Susan E. Birket, Brian S. Murphy, Don Hayes, Michael I Anstead, Jamshed F. Kanga, Robert J. Kuhn, Heather M. Bush, et David J. Feola. « **Impact of azithromycin treatment on macrophage gene expression in subjects with cystic fibrosis** ». *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 13, n° 2 (mars 2014): 164-71. doi:10.1016/j.jcf.2013.08.007.
37. Murphy, B. S., V. Sundareshan, T. J. Cory, D. Hayes, M. I. Anstead, et D. J. Feola. « **Azithromycin Alters Macrophage Phenotype** ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, n° 3 (4 février 2008): 554-60. doi:10.1093/jac/dkn007.
38. Clarke, Thomas B. « **Early Innate Immunity to Bacterial Infection in the Lung Is Regulated Systemically by the Commensal Microbiota via Nod-Like Receptor Ligands** ». *Infection and Immunity* 82, n° 11 (novembre 2014): 4596-4606. doi:10.1128/IAI.02212-14.
39. Aldo, Paulomi B., Vinicius Craveiro, Seth Guller, et Gil Mor. « **Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line** ». *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 70, n° 1 (juillet 2013): 80-86. doi:10.1111/aji.12129.
40. Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, et Harry J. Wichers. « **THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach** ». *International Immunopharmacology*. Consulté le 25 août 2014. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.

41. Martinez, Fernando O., Siamon Gordon, Massimo Locati, et Alberto Mantovani. « **Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression** ». *The Journal of Immunology* 177, n° 10 (15 novembre 2006): 7303-11. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7303.
42. Borkham-Kamphorst, Erawan, Pascal Alexi, Lidia Tihaa, Ute Haas, et Ralf Weiskirchen. « **Platelet-derived growth factor-D modulates extracellular matrix homeostasis and remodeling through TIMP-1 induction and attenuation of MMP-2 and MMP-9 gelatinase activities** ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457, n° 3 (13 février 2015): 307-13. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.106.
43. Wang, Xian-Feng, Hong-Sheng Wang, Hao Wang, Fan Zhang, Ke-Fang Wang, Qiang Guo, Ge Zhang, Shao-Hui Cai, et Jun Du. « **The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) in Immune Tolerance: Focus on Macrophage Polarization of THP-1 Cells** ». *Cellular Immunology* 289, n° 1-2 (juin 2014): 42-48. doi:10.1016/j.cellimm.2014.02.005.
44. Pellicoro, Antonella, Rebecca L. Aucott, Prakash Ramachandran, Andrew J. Robson, Jonathan A. Fallowfield, Victoria K. Snowdon, Stephen N. Hartland, et al. « **Elastin Accumulation Is Regulated at the Level of Degradation by Macrophage Metalloelastase (MMP-12) during Experimental Liver Fibrosis** ». *Hepatology* 55, n° 6 (1 juin 2012): 1965-75. doi:10.1002/hep.25567.
45. El-Gamel, Ahmed, Ewan Sim, Philip Hasleton, James Hutchinson, Nizar Yonan, Jim Egan, Colin Campbell, et al. « **Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation** ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 18, n° 9 (septembre 1999): 828-37.