

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

U.F.R DES SCIENCES DE SANTÉ

Ecole doctorale Environnements – Santé

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Mention : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 30 novembre 2021 par

Lenny Pommerolle

**Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la fibrose pulmonaire
idiopathique : Etude du récepteur CD206 et des protéines de choc
thermique HSP27 et α B-crystallin**

Directeur de thèse : Pr. Philippe BONNIAUD

Co-directrice de thèse : Dr. Françoise GOIRAND

Membres du jury :

Dr. Sophie LANONE	Rapportrice
Dr. Ketjil ASK	Rapporteur
Dr. Carmen GARRIDO	Présidente du jury
Dr. Arnaud MAILLEUX	Examineur
Pr. Philippe BONNIAUD	Directeur de thèse
Dr. Françoise GOIRAND	Co-directrice de thèse

*Qu'il me soit permis de remercier l'ensemble de mon jury de me faire l'honneur d'être présent le jour de ma thèse malgré leur contrainte professionnelle et la situation sanitaire actuelle. Merci au **Dr. Sophie Lanone** et **Dr. Kjetil Ask** d'avoir accepté la position de rapporteur de mon travail de thèse. Merci au **Dr. Carmen Garrido** ainsi qu'au **Dr. Arnaud Mailleux** d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.*

*Je remercie à nouveau le **Dr. Carmen Garrido** de m'avoir accueilli dans son équipe HSP-pathies et d'avoir toujours été présente au cours de ma thèse.*

Merci à,

***Philippe Bonniaud** pour sa confiance et son encadrement depuis ma première année de master. Vous m'avez permis de découvrir le monde de la recherche et plus précisément celui de la fibrose pulmonaire qui a su me passionner. Vous avez toujours laissé une très grande liberté à vos doctorants, accompagnée d'un excellent encadrement scientifique, ce qui m'a permis de mener à bien cette thèse et d'acquérir une autonomie certaine, indispensable pour ma carrière scientifique. Merci de m'avoir permis de participer chaque année au J2R et autres congrès scientifiques, synonyme de très bon souvenirs (à la fois sur le plan scientifique mais également sur le plan humain). Enfin, je vous remercie pour la recommandation et le soutien que vous m'avez apporté au sein de mon nouveau laboratoire d'accueil. Un grand merci pour tout cela et au plaisir de vous recroiser dans divers colloques scientifiques.*

***Françoise Goirand** pour son soutien et sa sympathie. Vous co-dirigez ma carrière scientifique depuis maintenant cinq années et m'avez permis de gravir les différents échelons de ce parcours compliqué. Je ne serai pas là où je suis sans vous, je vous dois beaucoup. Votre aide scientifique mais également humaine m'ont été indispensables au cours de ces années et je vous en serai éternellement reconnaissant. Enfin, je me dois de vous remercier également pour la relecture et la correction de l'ensemble des mes rapports écrits, dont ce manuscrit de thèse. Très sincèrement, merci Françoise.*

***Lucile Dondaine** pour son investissement et son aide dans la réalisation de mes expérimentations animales. Sans toi, tout ce travail aurait été impossible. Merci pour avoir sacrifié des soirées auprès de ta fille et de Florent pour m'aider à broyer des poumons de souris ! Merci pour ta formation, tu m'as tout appris sur les souris et je pense être armé pour faire face aux nombreux challenges à venir dans ce domaine. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière et espère te revoir toi, Florent et Lina que ce soit aux Etats-Unis ou ailleurs.*

Pierre-Simon Bellaye pour ta collaboration et ta très grande expertise scientifique. Merci de m'avoir accordé ta confiance. Nous avons réalisé un très beau travail ensemble et ce sera avec joie de partager un nouveau projet en ta compagnie.

Olivier Burgy pour ton expérience et tes précieux conseils. Merci également pour ton soutien et la confiance que tu m'as offerte en me recommandant auprès de mon nouveau laboratoire. Merci beaucoup et j'espère qu'on aura l'occasion de se croiser aux USA si la nostalgie te gagne « la star du NIH, dans nos locaux ».

Nicolas Pernet pour sa bonne humeur, sa sympathie et sa joie de vivre au quotidien. Je te remercie aussi pour ton soutien et ton aide précieuse dans la conception de mes expériences de cytométrie en flux. Tu as su consolider des bases certaines dans ce domaine et m'a donné le goût à cette technologie. Je suis certains que la cytométrie aura une autre saveur sans toi à mes côtés...

Annabelle Sequeira pour ces nombreuses discussions que nous avons pu avoir ensemble. Merci pour m'avoir fait découvrir l'opéra « Samson et Dalila » ainsi qu'au « petit enfoiré » qui a animé nos conversations. Bon courage pour la fin de ta carrière et merci pour tout.

Jeanne Chaloyard comme voisine de bureau. Les journées au labo sans toi se font ressentir. En plus d'une compagnie de commérage, j'ai gagné une amie qui me manquera une fois parti. J'espère que tu réussiras à concrétiser tes projets et à obtenir ce fameux poste tant convoité. Merci pour tout Jeanne, ces années en ta compagnie furent un plaisir. (Je veux être invité à ton mariage !)

Geison Cambri, meu irmão. Une année de thèse inoubliable en ta compagnie. J'ai découvert plus qu'un ami, un frère. J'espère te revoir au Brésil très prochainement. « Vai dar tudo certo nessa merda mi irmão »

Nathalia Bonan, minha irmã. Ce fut un plaisir d'avoir partagé une grande partie de ma thèse avec toi. Merci pour m'avoir appris quelques mots en portugais et au plaisir de te revoir au Brésil avec Geison et Felipe (qui aurait cru que je me marie avant toi !)

Maggie and Caiomhe my favorite irish girls. It was a pleasure to meet you. We shared very nice moments together with brazilian guys.

Abdelmnim Radoua, aka Abdel Kader, Kader, Ghazali, Habibi nmout alik ana. Mon coach en langue arabe. Ce fût un plaisir de partager tous ces moments (et kebabs) avec toi, que de bons souvenirs. En espérant que la fin de ta thèse se déroule comme tu le désires. Je te souhaite le meilleur pour ton avenir.

Jimena, joder ! Muchas gracias chica. Ce fût un plaisir de faire ta rencontre. J'espère te revoir pour que l'on puisse partager « un asado » ensemble. En espérant que la fin de ton post-doc se déroule pour le mieux et que tu parviennes à trouver un endroit qui te plaise. Buena suerte mi amiga.

François Hermetet pour ces mardi foot et fou rire partagé dans le L2. Romain Mary pour les moments partagés ensemble qui sont venus trop tardivement. Steven de Almeida pour ces longues discussions en ta compagnie. Sébastien Causse pour ton expertise microscopique et culturelle. Lisa Lagorgette aka Gettegorla pour les intimes, le duo parfait avec Jeannette. Cindy Racœur « Sanders » pour tes nombreuses réponses à mes questions intempestives et Sylvia Ghione (avec un fort accent italien). L'équipe Ghiringhelli, Joséphine Melin (José), Théo Accogli, Christophe Hibos (le blanzinois). Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe Cellimap (Amandine Bataille, Audrey Geissler et Rim Belkaid) pour leur service, aide et gentillesse de manière générale.

L'ensemble de l'unité INSERM U1231 pour m'avoir accueilli et accompagné tout au long de ma thèse ainsi qu'à Lucile Fuselier, Alexandrine Fraichard et Andreea-Gabriela Edu.

La Fibrosis Team, Julie Tanguy, Sabrina Loriod, Guillaume Beltramo, Déborah Schenesse (Debbie), Hugo Sikner, Pierre-Marie Boutanquoi et Maximilien Spaanjard pour avoir partagé mon quotidien ces dernières années.

Merci au Dr. Resat Cinar de me faire l'honneur d'intégrer la prestigieuse « National Institutes of Health » et merci à Tony Jourdan qui a permis cette relation.

Je tiens particulièrement à remercier mes amis. Louis Lebaut, mon buddy qui malgré la distance a toujours été là pour moi et a su m'organiser une animation de mariage haute en couleur, il faut le souligner ! Ces années d'études m'ont permis de faire ta rencontre. Nous avons partagé des moments inoubliables ensemble et qui j'espère se poursuivront tout notre vie. Je pourrais en dire autant de Paul Gentil, l'acolyte kayakiste au fort caractère, mais bon, plus on se taquine plus on s'aime ! Et enfin Côme Seurre, mon ami d'enfance car sans lui je ne serais pas là aujourd'hui (pour la petite histoire c'est lui qui m'a forcé à faire un bac S). Merci mon Côme, cette thèse c'est un peu ta thèse finalement.

Je conclurais en remerciant l'ensemble de ma famille. Ma grand-mère Michèle ainsi qu'Annie et Georges qui souffrent de cette longue distance qui nous sépare et du faible nombre d'appels téléphoniques, merci pour tout. Vous avez toujours été là pour moi et je vous en serais éternellement reconnaissant. Je remercie notamment mes parents. Merci pour votre soutien, pour m'avoir permis de faire des études et m'avoir poussé dans mon plus jeune âge. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme parents et cette réussite est la vôtre. Je m'envole demain outre-Atlantique pour découvrir

*une nouvelle vie, mais je vous emmène avec moi dans mon cœur. Je ne vous remercierais jamais assez pour tous les sacrifices et tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous aime. Ma petite sœur **Marilou**, qui j'espère saura faire les bons choix dans sa vie. Je te souhaite le meilleur et il ne faut pas nécessairement une thèse pour être heureux. Vie ta vie de la meilleure des façons possibles. Je serais toujours là pour toi. Je remercie également ma belle-famille **Maréchal** (Maréchaux car ils sont plusieurs) de m'avoir accueilli si chaleureusement. Merci à vous, **Nathalie** et **Thierry**, et merci à **Clémence** et **Denis**, qui ne cessent de me divertir !*

***Ma femme, Marie** qui a partagé ma vie durant toutes mes études. Merci de m'aimer chaque jour et de m'accompagner dans cette aventure à la fois excitante et effrayante. Beaucoup de chose ne se serait pas réalisées sans toi. Merci d'avoir relu ma thèse le jour de ton anniversaire (quel cadeau !). Merci encore d'avoir accepté de partager ta vie avec moi. Je t'aime.*

A Séverine et Sébastien

Sans qui rien de tout cela n'aurait pu voir le jour,

Je vous dédie ce travail

Résumé

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, qui constitue la forme la plus fréquente de pneumopathie interstitielle diffuse de l'adulte. Elle se caractérise par une accumulation massive de matrice extracellulaire, principalement de collagène, dans le parenchyme pulmonaire, ce qui entraîne une altération dramatique et irréversible de la fonction respiratoire. La FPI est une pathologie mortelle qui survient principalement après 60 ans, et sa médiane de survie est d'environ 5 ans après diagnostic. Il n'existe aucun traitement curatif. A ce jour seuls 2 médicaments, la pirfénidone et le nintédanib, ont été validés dans cette indication, mais ils ne permettent que de ralentir très modérément son évolution. La recherche visant à mieux caractériser les mécanismes physiopathologiques de la FPI ainsi que le développement de nouveaux traitements est donc crucial pour les patients.

La maladie se caractérise par la production massive de cellules myofibroblastiques, issues de la transformation des autres cellules pulmonaires. Le TGF β est une cytokine clé stimulant cette transformation. On sait que ce processus est régulé, notamment par les cellules de l'immunité dont les macrophages. Les protéines de choc thermique (HSP) et en particulier HSP27 et α B-crystallin, sont d'autres modulateurs connus des mécanismes de fibrogenèse.

Mon travail de thèse a consisté 1) à étudier l'intérêt de l'utilisation du récepteur macrophagique CD206 comme marqueur diagnostique et comme cible à inhiber pour limiter le développement de la fibrose, 2) à étudier le rôle d'HSP27 présente spécifiquement dans le compartiment extracellulaire dans le développement de la fibrose pulmonaire, 3) à tester les effets d'un oligonucléotide antisens dirigé contre α B-crystallin pour s'opposer au développement de la maladie.

Nos travaux ont permis de montrer l'augmentation de l'expression du récepteur macrophagique CD206 en cas de fibrose, dans les macrophages pulmonaires humains et murins. Le traitement des macrophages par un radio-traceur dirigé sur le CD206, le tilmanocept, permet de quantifier son expression, et celle-ci est diminuée par le nintédanib et par un inhibiteur des macrophages M2, le tofacitinib. Le traitement par tofacitinib permet aussi de limiter le développement de la fibrose chez la souris, tout en limitant le recrutement des macrophages. Ce travail suggère l'utilité du CD206 pour le diagnostic de la FPI et l'intérêt de développer des inhibiteurs pour le traitement de la fibrose. Dans la 2^{ème} partie, mes travaux montrent qu'HSP27 est sécrétée par les cellules pulmonaires en conditions pro-fibrosantes, qu'elle est capable alors d'interagir avec les récepteurs TLR2 et TLR4. La conséquence est une potentialisation de la transformation myofibroblastique des cellules pulmonaires induite par le TGF β . HSP27 sécrétée par les cellules pulmonaires, induit aussi une activation des cellules macrophagiques et l'expression de cytokines pro-fibrosantes. Nous avons montré qu'HSP27 se comporterait comme un médiateur intercellulaire pro-fibrosant, et que son inhibition constituait un intérêt pour limiter le développement de la maladie. Dans la 3^{ème} partie de ce travail, nous avons testé un oligonucléotide antisens dirigé contre α B-crystallin et modifié par conjugaison lipidique. Ce travail n'a pas montré l'intérêt de ce composé vis-à-vis de l'oligonucléotide de première génération pour limiter les processus profibrosants.

En conclusion, mon travail a permis d'ouvrir de nouvelles pistes de diagnostic et de traitement, en relation avec un récepteur macrophagique le CD206, et une protéine de choc thermique HSP27.

Mots-clés : fibrose pulmonaire idiopathique, Macrophages, CD206, HSP27, α B-crystallin.

Résumé	6
Liste des Figures	11
Listes des tableaux	14
Liste des abréviations	15

ÉTAT DE L'ART.....**18**

CHAPITRE I : La Fibrose Pulmonaire Idiopathique.....	19
I. Généralité : Epidémiologie et Aspects Cliniques.....	19
a) Epidémiologie.....	19
b) Diagnostic	20
c) Les approches thérapeutiques de la FPI	22
i. Prednisone, azathioprine et N-acetylcystéine	23
ii. Pirféridone.....	24
iii. Nintédanib	26
iv. Transplantation pulmonaire.....	27
II. Physiopathologie de la FPI.....	28
a) Cicatrisation et Fibrose.....	29
b) Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1).....	30
i. Biosynthèse et sécrétion.....	31
ii. Récepteurs du TGF β	33
iii. Voie de signalisation canonique : la voie des SMADs.....	35
iv. Voies de signalisation non canoniques	39
c) Les Myofibroblastes	42
i. Fibroblastes résidents et fibrocytes	43
ii. Péricytes.....	46
iii. Cellules épithéliales alvéolaires.....	47
iv. Les cellules mésothéliales	49
v. Autres cellules.....	50
d) Le collagène.....	51
CHAPITRE II : La place des macrophages dans la FPI	54
I. Monocytes	55
II. Les Macrophages.....	56
a) Les Macrophages Alvéolaires (AMs).....	58

b) Les Macrophages Interstitiaux (IMs)	60
c) Le paradigme M1-M2.....	63
d) Rôle des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire.....	68
CHAPITRE III : Les protéines de choc thermiques dans la FPI.....	74
I. Généralités.....	74
II. Les HSPs de haut poids moléculaire	76
a) HSP90.....	76
b) HSP70.....	79
c) HSP47.....	82
III. Les petites HSPs ou « <i>Small HSPs</i> »	83
a) Structure des sHSP	83
b) HSP27.....	84
c) α B-cristallin	87
IV. Les modèles animaux de fibrose pulmonaire	89
a) Modèle de fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine	90
b) Modèle de fibrose pulmonaire induite par transfert de gène du TGF- β 1	93
CHAPITRE IV : Objectifs de thèse	97

MATERIEL & METHODES98

I. Echantillons humains pour dosage d'HSP27	99
II. Les modèles animaux	99
a) Protocole d'étude <i>in vivo</i> de la sécrétion d'HSP27 dans liquides broncho-alvéolaires et pleuraux.....	99
b) Protocole d'étude des effets de l'administration d'rHSP27 sur la gravité de la fibrose pulmonaire	100
c) Etude des effets du LASO 22 (versus ASO 22) sur le développement de la fibrose induite par bléomycine.....	100
III. Modèle de culture <i>ex-vivo</i> de coupes pulmonaires (ou precision-cut lung slices, PCLS)	101
IV. Culture cellulaire primaire.....	102
a) Les Fibroblastes Primaires Murins (FPM)	102
b) Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM).....	102
c) Macrophages humains dérivés de <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMC)	102
V. Culture cellulaire	103
a) Les traitements cellulaires	103

b) Protocole de concentration d'un milieu de culture.....	104
c) Transfection.....	104
d) Utilisation des milieux conditionnés après traitement par rTGF-β1 immunodéplété ou non par HSP27.....	104
VI. Western-Blot.....	105
VII. RT-qPCR.....	106
VIII. Tests de cicatrisation.....	107
IX. Immunofluorescence.....	107
X. Cytométrie en flux.....	108
XI. Analyses Statistiques.....	109

RESULTATS.....110

Premier Projet : Les macrophages alvéolaires CD206+ comme cible théranostique de la fibrose pulmonaire.....	111
Second projet : Etude des effets de la petite protéine de choc thermique HSP27 présente dans le compartiment extracellulaire sur le développement de la fibrose pulmonaire.....	168
I. HSP27 est surexprimée en condition pro-fibrosantes.....	169
II. HSP27 potentialise la signalisation pro-fibrosante.....	170
a) L'HSP27 potentialise la transformation myofibroblastique induite par le TGF-β1 <i>in vitro</i> 170	
b) HSP27 extracellulaire contribue à la transformation mésenchymateuse induite par le rTGF-β1 <i>in vitro</i>	171
c) L'administration de rHSP27 semble augmenter l'intensité de la fibrose pulmonaire <i>in vivo</i> 173	
III. Signalisation induite par HSP27 extracellulaire.....	173
IV. Effets d'HSP27 extracellulaire sur les macrophages : stimulation de la libération de cytokines pro-fibrosantes ?.....	175
a) Effets d'HSP27 sur les cellules BMDM.....	175
b) Effets d'HSP27 sur les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear cells).....	176
Troisième projet : Test des effets d'un oligonucléotide anti-sens (LASO) dirigé contre HSPB5 sur le développement de la fibrose pulmonaire.....	178

DISCUSSION & PERSPECTIVES.....182

I. Les macrophages alvéolaires CD206+ : une population qui reflète la progression de la FPI 183	
II. HSP27 est un médiateur intercellulaire pro-fibrosant.....	188

III. LASO 22 : une version améliorée de l'ASO 22 ?	194
IV. Synthèse générale	195
BIBLIOGRAPHIE.....	197
ANNEXES	218

Liste des Figures

- Figure 1 : Examen radiologique et histopathologique de poumons diagnostiqués FPI
- Figure 2 : Algorithme diagnostique de la fibrose pulmonaire idiopathique
- Figure 3 : Données obtenues lors de l'étude PANTHER-IPF
- Figure 4 : Résultats obtenus lors de l'étude ASCEND
- Figure 5 : Suivis de la capacité vitale forcée lors de l'essai INPULSIS
- Figure 6 : Principales Indications de transplantation pulmonaire chez l'adulte
- Figure 7 : Mécanismes de cicatrisation tissulaire et fibrogenèse
- Figure 8 : Structure et Biosynthèse du TGF- β
- Figure 9 : Structure des récepteurs de la superfamille du TGF- β
- Figure 10 : Schéma simplifié de la structure des protéines SMAD
- Figure 11 : Voies schématiques de la voie canonique du TGF- β SMADs-dépendante
- Figure 12 : Voies schématiques et simplifiées de la signalisation non-canonique du TGF- β
- Figure 13 : Mise en évidence d'un foyer fibroblastique ou *fibroblaste foci*
- Figure 14 : Transition fibroblastique à myofibroblastique
- Figure 15 : Caractérisation des fibrocytes
- Figure 16 : Caractérisation des péricytes
- Figure 17 : Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)
- Figure 18 : Transformation myofibroblastique des cellules mésothéliales *in vivo*
- Figure 19 : Assemblage des structures de collagène
- Figure 20 : La transformation myofibroblastique est modulée par les cellules immunitaires
- Figure 21 : Les sous-types majoritaires de monocytes
- Figure 22 : Macrophages résidents (TRM) et dérivant de monocytes (MoM)
- Figure 23 : Ontogénie et localisation schématique des macrophages pulmonaires
- Figure 24 : Principaux marqueurs des macrophages alvéolaires
- Figure 25 : Différences de morphologie et de localisation entre les AMs et les IMs
- Figure 26 : Analyse transcriptomique des AMs et IMs
- Figure 27 ; Schéma descriptif des différentes sous-populations de macrophages

Figure 28 : Fibrogenèse et polarisation des macrophages

Figure 29 : Implication des macrophages de type II dans le développement de la fibrose pulmonaire

Figure 30 : Illustration schématique de la proportion de macrophages alvéolaires dans un poumon sain versus fibrosé

Figure 31 : Le réseau protéostatique

Figure 32 : Schéma simplifié du cycle d'HSP90

Figure 33 : Implication d'HSP90 dans la voie du TGF- β 1

Figure 34 : Structure HSP70

Figure 35 : Schéma simplifié du cycle d'activation d'HSP70

Figure 36 : Implication d'HSP70 dans la voie du TGF- β 1

Figure 37 : Implication d'HSP47 dans la synthèse du collagène

Figure 38 : Structure d'HSP27 et de α B-crystallin

Figure 39 : Rôle d'HSP27 cytosolique en conditions pro-fibrosantes (stimulation de la voie du TGF- β 1)

Figure 40 : Implication d' α B-crystallin dans la voie du TGF- β 1

Figure 41 : Cinétique de développement de la fibrose pulmonaire post-injection intratrachéale (IT) de bléomycine

Figure 42 : Fibrose pulmonaire induite par injection intratrachéale de bléomycine

Figure 43 : Modèle de fibrose induite par injection d'adénovirus codant pour le TGF- β 1

Figure 44 : Validation du modèle d'injection intra-pleurale d'un vecteur adénoviral codant pour la β -galactosidase

Figure 45 : Modèle de fibrose pleurale induite par injection d'adénovirus TGF- β 1

Figure 46 : Augmentation d'HSP27 extracellulaire dans des conditions de fibrose pulmonaire

Figure 47 : HSP27 extracellulaire potentialise les effets profibrosants du TGF- β 1

Figure 48 : Effets paracrines d'HSP27 libérée suite une stimulation par rTGF- β 1

Figure 49 : Le traitement par rHSP227 induit une aggravation de la fibrose pulmonaire chez la souris

Figure 50 : Un traitement par rHSP27 active des voies de signalisation non-canoniques du TGF- β 1 de manière TLR4/2 dépendante

Figure 51 : rHSP25 stimule la sécrétion de cytokines par les BMDM, capables d'induire la synthèse de facteurs favorisant la transition myofibroblastique des fibroblastes primaires murins

Figure 52 : HSP27 stimule l'expression du phénotype M2 des macrophages primaires humains

Figure 53 : L'inhibition d'HSPB5 par le LASO 22 limite la production de collagène *ex vivo* sur des PCLS

Figure 54 : Effet dose ASO 22/LASO 22 *in vivo* sur un modèle de fibrose pulmonaire murine

Figure 55 : Effet du LASO 22 comparativement à l'ASO 22 en condition pro-fibrosante *in vitro*

Listes des tableaux

Tableau 1 : Marqueurs de surface des macrophages alvéolaires (AMs) et interstitiaux (IMs) chez la souris

Tableau 2 : Propriétés d'activation, de sécrétion et phénotypiques de chaque sous-groupe de macrophages

Tableau 3 : Liste non exhaustive des modèles animaux de fibrose pulmonaire chez le rongeur faisant apparaître les avantages et inconvénients de chacun

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisé pour le western-blot

Tableau 5 : Amorces humaines/murine de qPCR

Tableau 6 : Anticorps primaires pour Immunofluorescence

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage cytométrie

Liste des abréviations

α-SMA : <i>α-smooth-muscle actin</i>	CXCL : Ligands des CXC
AA : Acide aminé	DAMP : Motifs moléculaires associés aux dégâts
Ac : Anticorps	DLCO : Capacité de diffusion du monoxyde de carbone
ADN : Acide désoxyribonucléique	EA : Exacerbations aiguës
AdTGF-β1 : Adénovirus TGF- β 1	ELISA : Technique d'immunoabsorption par enzyme liée
AEC : Cellules épithéliales alvéolaires	ERK : <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
Akt (ou PKB) : Protéine kinase B	FGF : <i>Fibroblast Growth Factor</i>
ALI : Lésions pulmonaires aiguës	FITC : Fluorescent isothiocyanate
ALK : <i>Activin Like Kinase</i>	FPI : Fibrose pulmonaire idiopathique
AMM : Autorisation de mise sur le marché	FPM : Fibroblastes primaires murins
AMs : Macrophages alvéolaires	FT : Facteur de transcription
ARN : Acide ribonucléique	GM-CSF : Facteurs de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
ASO : Oligonucléotide antisens	GR : Récepteurs aux glucocorticoïdes
ATP : Adénosine triphosphate	H&E : Hématoxyline & éosine
BLM : Bléomycine	HLA-DR (CMH-II) : <i>Human leucocyte antigen-DR isotype</i>
BMDM : Macrophages dérivés de la moelle osseuse	HSP : Protéine de choc thermique (<i>Heat shock protein</i>)
BMP : <i>Bone morphogenetic protein</i>	IFN-γ : Interféron gamma
CCL : Chimiokine à motif C-C	Ig : Immunoglobuline
CCR : Récepteurs aux chimiokines CC	IIP : PID idiopathiques (<i>idiopathic interstitial pneumoniae</i>)
CD : Cluster de différenciation	IL : Interleukine
CMH-I ou II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou de classe II	ILC : Cellules lymphoïdes innées
Co-SMAD : SMAD co-régulatrices	IMs : Macrophages interstitiaux
CSH : Cellules souches hématopoïétiques	
CT : <i>Cycle Threshold</i>	
CVF (FVC) : Capacité vitale forcée	
CXC : Chimiokine à motif C-X-C	

I-SMAD : SMAD inhibitrices ou antagoniste

IT : Intratrachéale

IV : Intraveineux

JAK : Janus kinase

JNK : *Jun amino-terminal Kinase*

KO : *Knock-out*

LAP : *Latency-associated protein*

LASO : Oligonucléotide antisens modifié avec un composé lipidique

LBA : Liquide de lavage broncho-alvéolaires

LPS : Lipopolysaccharides

LRP1 : *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*

LTBP : *Latent TGF- β binding protein*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

M-CSF : Facteurs de stimulation de colonies de macrophages

MEC : Matrice extracellulaire

MFI : médiane de fluorescence

MMP : Métalloprotéases matricielles

MoM ou RM-DM : Macrophages dérivés de monocytes

MRC1 : *Mannose Receptor C-type 1*

NAC : N-acétyl-Cystéine

NF- κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NTD : Nintédanib

PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphériques

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS : *Phosphate buffer saline*

PCLS : *Precision-Cut Lung Slices*

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PFU : *Plaque Formation Unit*

Pi3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PIC (UIP) : Pneumonie interstitielle commune

PID (ILD) : Pneumopathies interstitielles diffuses

PSA : Pénicilline G, Streptomycine, Amphotéricine

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

R-SMAD : SMAD associées aux récepteurs

RT-qPCR : Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative en Temps Réel

SARA : *SMAD-anchor for receptor activation*

Scr : *Scramble*

SMAD : *Mother against decapentaplegic homolog*

SPECT : *Single photon emission computed tomography*

STAT : *Signal transducers and activators of transcription*

SVF : Sérum de veau fœtal

TDM : Tomodensitométrie

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TEP ou PET-scan : Tomographie par émission de positons

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*
TIF-1 γ : *Transcription intermediary factor 1 gamma*
TIMP : Inhibiteur tissulaire des MMP
TKI : Inhibiteur des tyrosines kinases
TLR : *Toll-like receptor*
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α*
TRAF6 : *Tumor necrosis factor receptor associated factor 6*

TR-AMs : Macrophages alvéolaires résidents
TRIM33 : *Tripartite motif-containing 33*
TRM : Macrophages résidents d'un tissu
t-SNE : *t-distributed stochastic neighbor embedding*
TSP-1 : Thrombospondin-1
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

ÉTAT DE L'ART

CHAPITRE I : La Fibrose Pulmonaire Idiopathique

I. Généralité : Epidémiologie et Aspects Cliniques

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID ou ILD en anglais) regroupent un ensemble de pathologies pulmonaires qui atteignent le parenchyme et affectent l'interstitium¹. Les PID, notamment lorsqu'elles sont associées à une fibrose pulmonaire, connaissent généralement une évolution lente et progressive qui conduit à une insuffisance respiratoire. Il existe de nombreuses formes de PID qui seront communément classées selon leur étiologie. Les PID de causes connues sont secondaires à une autre pathologie. C'est le cas de la polyarthrite rhumatoïde, où la principale complication respiratoire est la fibrose pulmonaire². Elles peuvent également être induites par des substances inhalées telles que l'amiante, la silice³, iatrogéniques ou consécutives à une infection virale comme récemment décrit avec le SARS-Cov2⁴. Les PID peuvent aussi être de cause inconnue, elles sont alors dites idiopathiques. La fibrose pulmonaire idiopathique est la forme la plus fréquente des PID idiopathiques (ou idiopathic interstitial pneumoniae, IIP) et parmi la plus commune des PID en général^{1,5}.

a) Epidémiologie

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) représente environ 20% des PID, de la même façon que la sarcoïdose, les pneumopathies d'hypersensibilité et les PID liés aux connectivites. Les pneumoconioses représentent 10% et le pourcentage restant occupé par d'autres PID plus rares⁶. A la différence des autres PID, la FPI connaît une évolution effroyable avec une médiane de survie d'environ 5 ans après diagnostic⁶. Avec une incidence se situant aux alentours de 2-30, et une prévalence de 10-60 pour 100 000⁷, la FPI fait partie des maladies rares, bien que sa prévalence ne cesse d'augmenter⁶. En revanche, on observe une disparité du recensement de la maladie en fonction du territoire avec les plus fortes incidences en Corée du Sud, au Canada et aux Etats-Unis⁸. En Amérique du Nord et en Europe, l'incidence se situe aux alentours de 3 à 9 cas pour 100 000 habitants, et 4 cas pour 100 000 habitants en Asie de l'Est et en Amérique du Sud. L'apparition de la maladie est étroitement liée à l'âge. Le diagnostic est rare chez des patients de moins de 50 ans, et l'incidence/la prévalence sont de 6/18 cas pour 100 000 personnes chez les 18-64 ans⁹, et de 94/495 pour 100 000 personnes chez les plus de 65 ans¹⁰. L'âge et la situation géographique apparaissent comme des facteurs influençant le développement de la FPI⁸. La fréquence de distribution géographique fait suspecter une hétérogénéité économique et sociale, avec une incidence/prévalence plus élevée dans les pays

industrialisés que dans les pays émergents. L'accès aux soins et les méthodes de diagnostic pourraient expliquer cette disparité, de même que la pollution de l'air, d'avantage présente dans les pays industrialisés. Un grand nombre d'autres facteurs de risques sont associés au développement et à la sévérité de la pathologie¹¹. Des facteurs intrinsèques comme la génétique (variant de la mucine 5B par exemple)¹², le sexe (les hommes sont les plus atteints)^{13,14}, ou encore le microbiome pulmonaire¹⁵ semblent jouer un rôle crucial dans le risque de développer une FPI. Des comorbidités telles que le reflux gastro-œsophagien¹⁶, l'apnée du sommeil¹⁷, le diabète¹⁸ et les infections virales par des membres de la famille des *Herpesviridae*¹⁵, semblent également favoriser cette pathologie. De même, des facteurs extrinsèques favorisent son développement comme le tabagisme actif ou passif¹⁹, la pollution de l'air²⁰ ou bien l'exposition environnementale à certains composés (sciures de bois, poussières de métal, amiante, produit phytosanitaire issus de l'agriculture...) ²¹.

b) Diagnostic

La FPI est une maladie irréversible, chronique, lente et progressive. Généralement, les patients diagnostiqués FPI sont suivis par un médecin depuis des mois, voire des années pour traiter leur toux et une dyspnée (difficulté à respirer caractérisé par un essoufflement) progressive²². Ces premiers symptômes sont la conséquence de micro-lésions pulmonaires, induites par un grand nombre de facteurs de risque (cités plus haut), conduisant à des signes cliniques de plus en plus présents et contraignants. Cette décroissance progressive et lente de la fonction respiratoire du patient, associée à des symptômes communs à d'autres pathologies, retarde le diagnostic et la prise en charge de la FPI du patient ce qui impacte l'évolution de sa maladie. Le déclin progressif de la fonction respiratoire peut se ponctuer de phases d'exacerbations aiguës (EA) dont le pronostic est redoutable²³. Ryerson *et al.*, décrivent une incidence des EA de 1 à 20% chez les patients atteints de FPI avec une médiane de survie de moins de 3 mois ²⁴. Les causes de la survenue d'une EA restent encore mal comprises et inexpliquées. Cependant, une capacité vitale forcée (FVC) faible semble être un facteur de risque commun d'EA²⁵. Une infection virale ou un acte chirurgical pourraient également précipiter ce phénomène²³. Les critères diagnostics de la FPI sont définis internationalement, et régulièrement mis à jour par un consortium d'experts sous l'égide de l'*American Thoracic Society (ATS)*, l'*European Respiratory Society (ERS)*, la *Japanese Respiratory Society (JRS)* et la *Latin American Thoracic Society (ALAT)*. La dernière mise à jour date de 2018 (Raghu *et al.*) ²⁶. Le diagnostic repose sur des examens cliniques, radiologiques et histopathologiques quand ces derniers sont disponibles (Figure 1). Les signes cliniques les plus communs sont la dyspnée,

la toux, des râles crépitants à l'auscultation et un hippocratismes digital (déformation des doigts ou des orteils induit en partie par l'hypoxémie). L'évaluation radiologique (Figure 1A) par tomodensitométrie-haute résolution (TDM) permet de détecter précisément les lésions caractéristiques de la FPI, que sont les motifs de pneumonie interstitielle commune (PIC ou UIP en anglais), ainsi que leur distribution avec une fiabilité de 80 à 90%²⁷. Ces motifs de PIC se définissent par des lésions en rayons de miel (*honeycombing* en anglais) selon une distribution hétérogène et une prédominance sous-pleurale et basale, des bronchiectasies de traction, ainsi qu'une absence de verre dépoli (*ground-glass opacification* ou GGO en anglais). Si l'examen radiologique permet d'identifier une PIC avec certitude, et que les autres causes possibles de PID ont été exclues, alors le patient sera diagnostiqué FPI. En revanche, si des doutes persistent, par exemple en cas d'absence d'un des critères de PIC, alors, si l'âge du patient, son état général, ses comorbidités et sa fonction respiratoire le permettent, l'exploration peut être complétée par une biopsie pulmonaire pour réaliser une analyse histopathologique (Figure 1B-C). Une coloration Hématoxyline & Eosine (H&E) est généralement réalisée afin de détecter un motif de PIC qui se caractérise par un remodelage de l'architecture pulmonaire alterné avec des zones de parenchyme 'normales'. Les lésions en rayons de miel peuvent être mises en évidence selon une prédominance sous-pleurale et para-septale hétérogène. Les zones fibrotiques sont également caractérisées par une inflammation légère, une prolifération cellulaire (fibroblastes et myofibroblastes) et une accumulation de collagène dense formant ainsi des zones typiques de FPI que sont les foyers fibroblastiques (*fibroblaste foci*).

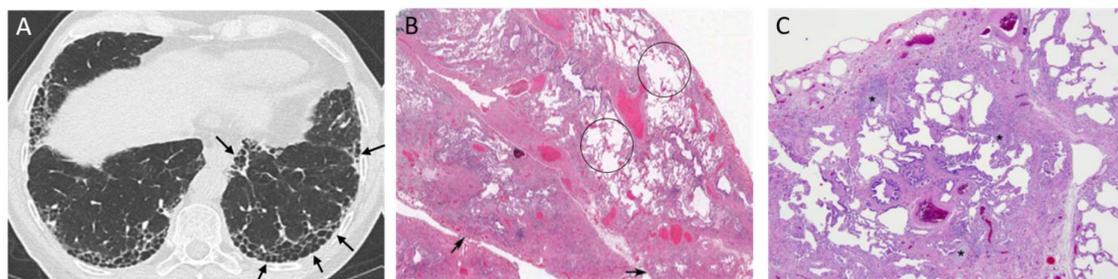


Figure 1 : Examen radiologique et histopathologique de poumons diagnostiqués FPI : A) Image d'une tomodensitométrie d'un patient de FPI montrant un motif caractéristique de pneumopathie interstitielle commune (PIC). Des lésions hétérogènes en rayons de miel (flèches) en clusters avec un départ sous pleural. B) Coupe histologique de poumons d'un patient atteint de FPI montrant des motifs caractéristiques de PIC (= fibrose dense en région sous-pleurale et para-septale (flèches) avec remodelage de l'architecture pulmonaire en forme de rayon de miel alterné avec des zones non affectées dans le parenchyme pulmonaire (cercles)). C) Coupe histologique de poumons d'un patient atteint de FPI montrant des motifs caractéristiques de PIC (= fibrose dense organisée autour de foyers fibroblastiques (*) mais sans changement organisé en rayon de miel). Issue de Raghu *et al.*, 2018²⁶.

En parallèle de l'examen histopathologique, un prélèvement de liquide de lavage broncho-alvéolaires (LBA) est parfois réalisé, avec pour objectif premier d'éliminer un diagnostic différentiel²⁸. En cas de FPI, le LBA est le plus souvent dit panaché avec une hypercellularité et une augmentation des neutrophiles >3% et éosinophiles >1%. En revanche, un pourcentage de lymphocyte supérieur à 30% suggère un autre diagnostic (sarcoïdose, connectivite...)²⁹. Cet examen invasif, qui peut dans de rares cas être déclencheur d'EA³⁰, n'est pas réalisé systématiquement. Cependant, l'analyse de son contenu pourrait dans le futur, permettre la détection de nouveau marqueur clés de la FPI³¹.

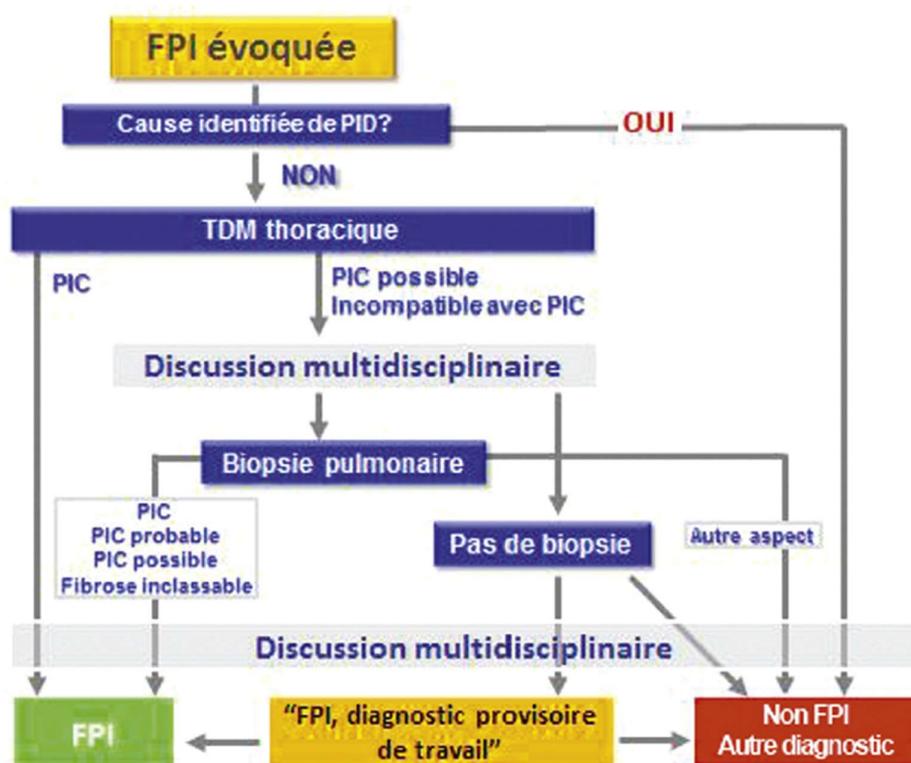


Figure 2 : Algorithme diagnostique de la fibrose pulmonaire idiopathique : FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique, PIC : Pneumopathie Interstitielle Commune, PID : Pathologie Interstitielle Diffuse, TDM : Tomodensitométrie. Issue de Cottin et al., (2017)²⁹

c) Les approches thérapeutiques de la FPI

A ce jour, aucun traitement pharmacologique n'a d'efficacité curative dans la FPI. La transplantation pulmonaire, dont les indications sont très restreintes, reste la seule option thérapeutique qui permet d'améliorer considérablement les conditions de vie des patients. Les seuls médicaments indiqués aujourd'hui dans la FPI sont le nintédanib et la pirfénidone. Ils permettent de ralentir la progression de la fibrose pulmonaire et d'allonger légèrement la

médiane de survie des patients³². Le manque d'options thérapeutiques suggère une énorme marge de progression dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de FPI.

i. Prednisone, azathioprine et N-acétylcystéine

Avant le début des années 2010, les patients atteints de FPI étaient souvent traités par une association de corticostéroïdes, d'un immunomodulateur (azathioprine) et parfois de N-acétylcystéine (NAC). Mais des études successives ont mené à l'arrêt de cette utilisation. Le projet PANTHER-IPF (pour Prednisone, Azathioprine and N-acetylcysteine³³) est une étude multicentrique, randomisée et menée en double aveugle, qui a inclus 236 patients FPI âgés de 35 à 85 ans et présentant une altération des fonctions respiratoires (= FVC \geq 50% et DLCO \geq 30%). Les patients ont été traités par la combinaison orale de trois médicaments (prednisone, azathioprine et NAC) ou bien par la NAC seule associée à un placebo. La combinaison des trois thérapies comparées au placebo a été associée à une augmentation de la mortalité et des hospitalisations précoces. (Figure 3).

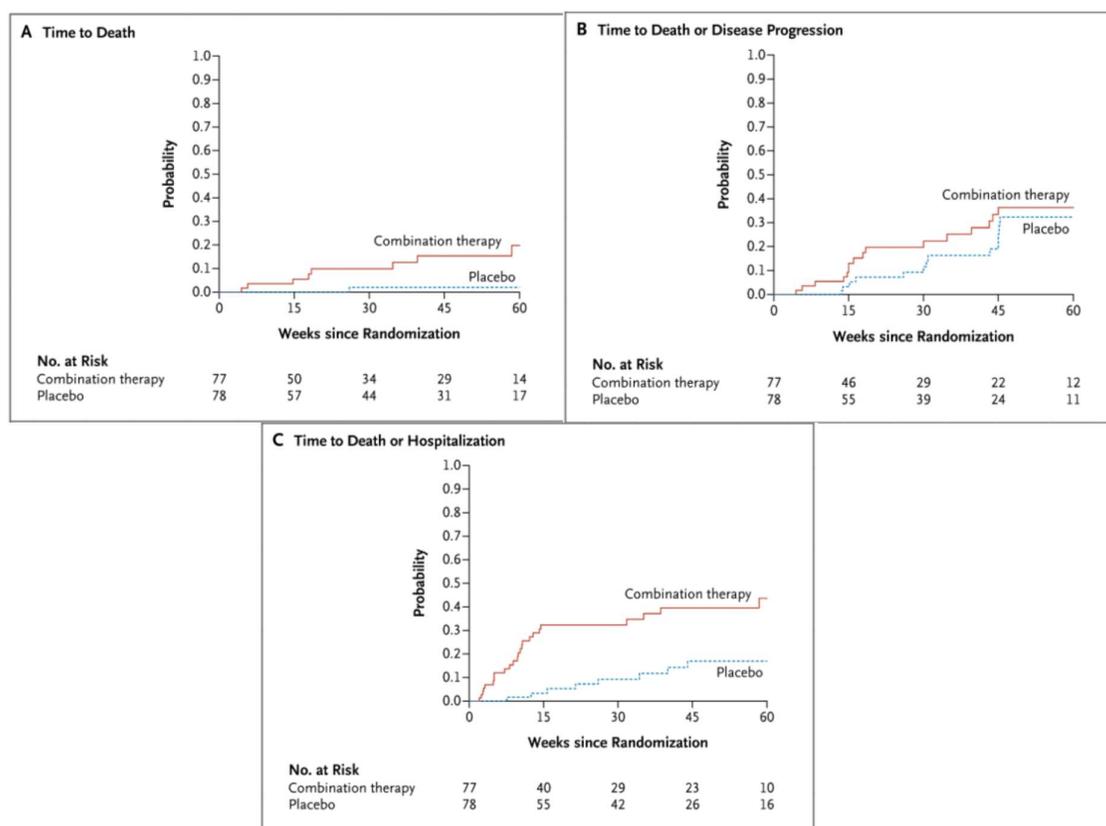


Figure 3 : Données obtenues lors de l'étude PANTHER-IPF : Courbe de Kaplan-Meier montrant la probabilité de survie (A) ou critère composite de survie et progression de la maladie (B) ou critère composite de survie et d'hospitalisation (C). *Combinaison therapy* fait référence à l'association des trois traitements prednisone, azathioprine et N-acétylcystéine. Issue de *the idiopathic pulmonary fibrosis clinical network*, 2012³³

L'utilisation de la NAC, seule, a été testée quelques années plus tard, en 2014, contre placebo. L'étude a conclu en l'absence d'efficacité de la NAC, à préserver la FVC chez les patients atteints de FPI³⁴. Ces études ont conduit au retrait de l'utilisation de cette combinaison thérapeutique (prednisone, azathioprine et NAC)³⁵.

ii. Pirfénidone

La pirfénidone (5-méthyl-1-phenyl-2-[1H]-pyridone) a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2012. Ce médicament est indiqué chez l'adulte pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique légère et modérée. La pirfénidone est une petite molécule dérivée de la pyridinone, possédant une activité anti-fibrotique, anti-inflammatoire et anti-oxydante³⁶. Son effet anti-fibrotique, de mécanisme encore mal compris, a été très largement étudié *in vitro* et *in vivo* et semble agir à différents niveaux du processus de fibrogenèse. La pirfénidone réduirait la sécrétion de *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) par les macrophages³⁷ et limiterait l'activation des fibroblastes médiée par le TGF-β1^{38,39} *in vitro*. Sur un modèle *ex vivo* de coupes de poumon de rat, la pirfénidone réduit la sécrétion de pro-collagène I induite par un traitement TGF-β1⁴⁰. Enfin, *in vivo* sur des modèles murins de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, la pirfénidone diminuerait l'expression de la fibrose pulmonaire ainsi que de la protéine de choc thermique 47 (*Heat Shock Protein 47* ou HSP47), une protéine chaperonne impliquée dans la production et la sécrétion du collagène⁴¹. D'autres ont montré sur modèles murins que la pirfénidone réduit la fibrose pulmonaire en réduisant l'accumulation pulmonaire des fibrocytes⁴².

L'efficacité clinique de la pirfénidone chez les patients FPI a été démontré au cours de deux essais CAPACITY pour *Clinical Studies Assessing Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis : Research of Efficacy and Safety Outcomes* (études 004 et 006)⁴³. L'étude 004 a inclus 435 patients répartis en trois groupes : 174 ont reçu 2403 mg/jour de pirfénidone, 87 ont reçu 1197 mg/jour de pirfénidone et 174 ont reçu un placebo. Concernant l'étude 006, elle a inclus 344 patients répartis en deux groupes : 171 qui ont reçu 2403 mg/jour de pirfénidone et 173 qui ont reçu un placebo. L'essai 004 montre un ralentissement significatif du déclin respiratoire (mesuré par la baisse de la FVC) des patients atteints de FPI, avec une efficacité dose-dépendante. L'étude 006 était moins concluante, puisque sans différence d'effets entre la pirfénidone et le placebo sur ces paramètres. Les résultats positifs d'efficacité de la pirfénidone ont été confirmés quelques années plus tard, au cours de l'essai de phase 3, ASCEND pour *Assessment of Pirfenidone to Confirm Efficacy and Safety in Idiopathic Pulmonary Fibrosis*⁴⁴.

Cette étude randomisée, en double aveugle contre placebo, a inclus 555 patients diagnostiqués FPI. Les patients ont été traités soit par la pirféridone (2403 mg/jour) soit par un placebo pendant 52 semaines. Cette étude a validé l'intérêt d'utiliser la pirféridone en clinique pour réduire la progression de la fibrose pulmonaire et améliorer la qualité de vie des patients atteints de FPI. En effet, elle montre que la pirféridone permettait de réduire la progression de la maladie vs placebo, et ce sur les critères d'évolution de la FVC (Figure 4A), de test de marche de 6 minutes (6MWT) (Figure 4B) et de survie sans progression (Figure 4C).

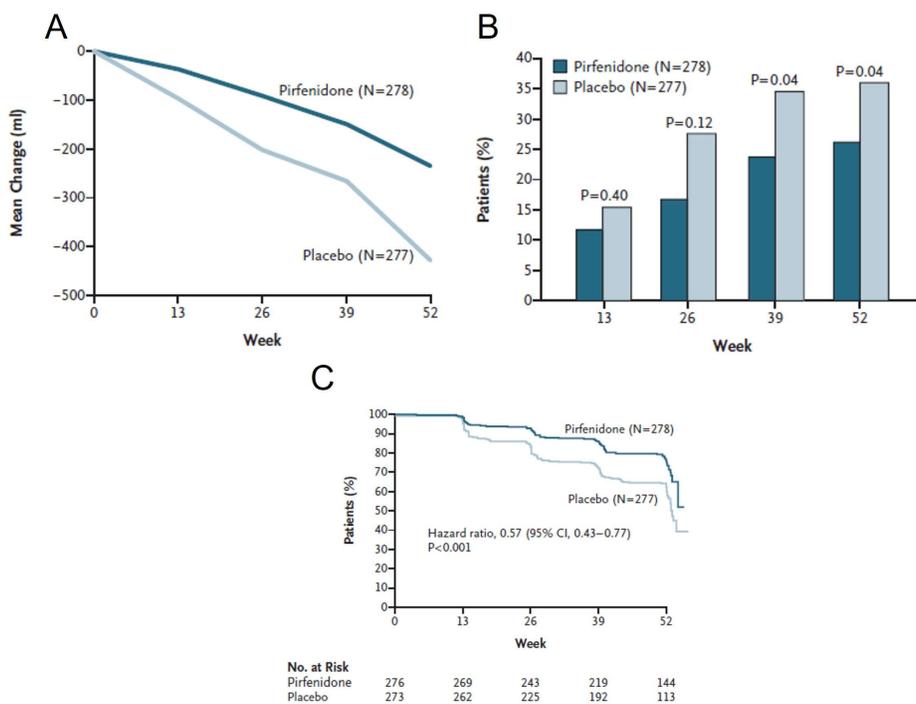


Figure 4 : Résultats obtenus lors de l'étude ASCEND : A) Evolution de la capacité vitale forcée (FVC) de patients atteints de FPI et traités par pirféridone (n=278) ou placebo (n=277) 52 semaines. B) Pourcentage de patients morts ou présentant une diminution des capacités de marche (défini par un déclin de 50m ou plus au test de marche de 6 minutes (6MWT)) au cours des 52 semaines de traitement par pirféridone ou placebo. C) Courbe de survie sans progression de Kaplan-Meier des patients traités par pirféridone ou placebo. Issue de King *et al.*, 2014⁴⁴

Ce traitement n'est pas dénué d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses, notamment induites par la modulation du CYP1A2 qui le métabolise. L'existence d'effets indésirables digestifs, hépatiques, cutanées (photosensibilisation), neurologiques (fatigue, vertiges) et la prise concomitante d'autres traitements sont autant de paramètres entrant dans l'arbre décisionnel du choix de ce traitement.

iii. Nintédanib

Le nintédanib (BIBF 1120) a obtenu l'AMM dans le traitement de la FPI en 2015. C'est un dérivé indolinone qui a une activité inhibitrice sur plusieurs tyrosines kinases intracellulaires (*Tyrosine Kinase Inhibitor* ou TKI), (le *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR) 1, 2 et 3, le *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) 1, 2 et 3 et le *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGF) α et β ⁴⁵. Ce composé a initialement été développé pour ses propriétés antitumorales dans le traitement de nombreux cancers (cancer bronchique non à petites cellules⁴⁶, cancer colorectal, des ovaires, de l'endomètre^{45,47}).

L'efficacité du nintédanib dans la FPI a initialement été testée lors d'un essai clinique de phase II appelé TOMORROW pour To Improve Pulmonary Fibrosis with BBF1120⁴⁸. Cette étude randomisée, en double aveugle, a inclus 112 patients, répartis dans 5 groupes en fonction de la dose reçue (50mg/jour, 50mg deux fois/jour, 100mg deux fois/jour, 150mg deux fois/jour et un groupe placebo). Cette étude a permis de conclure que la dose de 150mg deux fois/jour réduisait significativement le déclin de la FVC sur 12 mois, comparativement au groupe placebo. De plus, cette dose était associée à une réduction significative de l'incidence des EA.

Deux autres essais cliniques de phase 3 appelés INPULSIS-1 et INPULSIS-2⁴⁹ ont été menés sur l'efficacité du nintédanib. Ces études multicentriques réalisées dans 24 pays différents ont inclus des patients âgés de plus de 40 ans et diagnostiqués FPI depuis maximum 5 ans. Le nintédanib était testé à la dose 150mg deux fois/jour contre placebo sur 52 semaines. INPULSIS-1 a inclus 309 patients traités par nintédanib et 204 traités par placebo, et INPULSIS-2 329 patients traités par nintédanib et 219 traités par placebo. Dans les deux études, le nintédanib a réduit significativement le déclin de la FVC au cours des 52 semaines (Figure 5). L'incidence des EA était significativement réduite dans l'étude INPULSIS-2 mais pas dans INPULSIS-1.

INPULSIS-ON⁵⁰ a permis aux patients des groupes Nintédanib et placebo de l'étude INPULSIS de poursuivre (pour les patients du groupe traité) ou de débuter (pour les patients du groupe placebo) le traitement par nintédanib. Cette étude a permis de confirmer l'efficacité du traitement à ralentir le déclin de la FVC ainsi que l'incidence des EA. Elle montre aussi un profil de tolérance sur plus long terme similaire à celui décrit à l'issue des essais INPULSIS. Le nintédanib présente des effets indésirables, parfois importants, le plus fréquent étant la survenue de diarrhées (en moyenne chez 61% des patients traités dans l'essai Tomorrow) et qui

dans cet essai avait motivé l'arrêt du traitement dans 5% des cas. Certains patients pour ce problème de tolérance se retrouvent sans option thérapeutique.

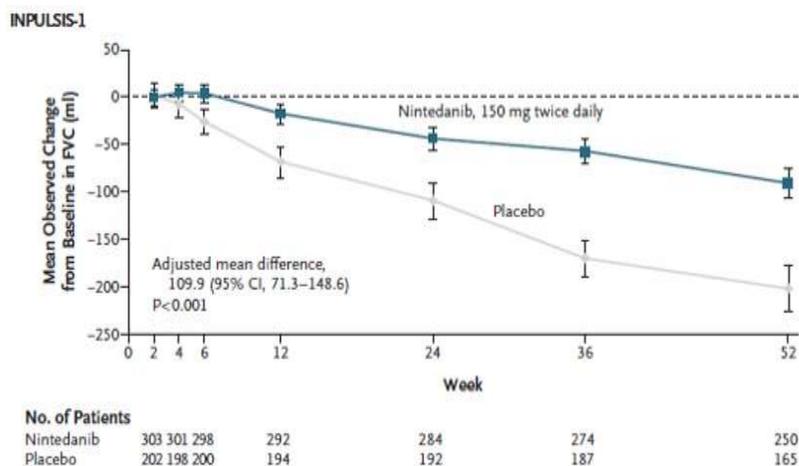


Figure 5 : Suivis de la capacité vitale forcée lors de l'essai INPULSIS : Graphique montrant la moyenne de changement en ml de la capacité vitale forcée (CVF ou FVC) de patients atteint de FPI en fonction du temps (en semaines) suivant un traitement par nintédanib, 150mg deux fois/jour (n=309) ou placebo (n=204). Issue de Richeldi *et al.*, 2014⁴⁹

iv. Transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire reste à ce jour la seule option thérapeutique permettant de traiter la FPI. En 2017, les PID représentaient 40,5% des indications de transplantations pulmonaires mondiales dont 32,4% étaient des FPI⁵¹. Le nombre de transplants depuis 1995 ne fait que croître chez les patients atteints de FPI (Figure 6). La médiane de survie suite à une transplantation pulmonaire primaire s'élève à 6-7 ans et atteint 8-9 ans pour les patients qui survivent la première année⁵¹. Cette solution permet de réduire le risque de mortalité de 75% par rapport à une prise en charge médicamenteuse⁵². Par conséquent, la transplantation pulmonaire améliore les conditions et la durée de vie des patients. Malheureusement, l'accès à celle-ci reste compliqué, et seulement quelques patients vont pouvoir bénéficier de ce traitement. Les patients éligibles à la greffe sont sélectionnés en fonction de critères d'inclusion précis, dont l'âge physiologique, la probabilité de survie après la greffe etc... De plus, la moyenne d'âge des patients atteint de FPI est supérieure à 65 ans et donc généralement non compatible avec ce type de thérapie. La greffe ne constitue donc pas une solution thérapeutique pour la majorité des patients atteints de FPI.

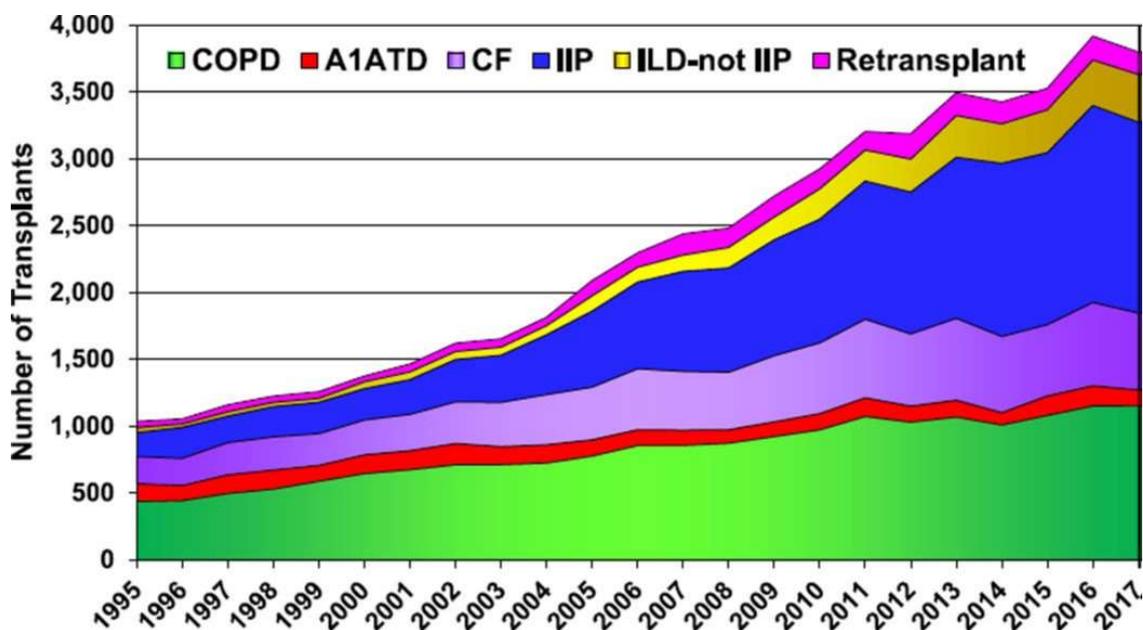


Figure 6 : Principales Indications de transplantation pulmonaire chez l'adulte : Evolution du nombre de transplantations pulmonaires entre 1995 et 2017 en fonction de la pathologie sous-jacente. COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*), A1ATD (*Alpha-1 Antitrypsin Deficiency*), CF (Mucoviscidose ou *Cystic Fibrosis*), IIP (*Idiopathic Interstitial Pneumonia*), ILD-not IIP (*Interstitial Lung Disease-not IIP*), Retransplant (patients retransplantés). Issue de Chambers *et al.*, 2019⁵¹

A ce jour, la pirfénidone et le nintédanib sont donc les seuls traitements médicamenteux disponibles dans le traitement de la FPI. La transplantation pulmonaire reste la solution thérapeutique la plus efficace mais peu de patients peuvent en bénéficier.

De ce fait, il est urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients souffrant de FPI. Aujourd'hui, un grand nombre de nouvelles stratégies sont en cours de développement en combinaison avec la pirfénidone et ou le nintédanib. De plus, nous avons pu voir que le diagnostic de cette pathologie est complexe. L'émergence de nouveaux biomarqueurs est indispensable pour une meilleure prise en charge des patients et un diagnostic plus précoce. Ainsi, les mécanismes cellulaires responsables et modulateurs de la fibrogenèse nécessitent d'être mieux compris.

II. Physiopathologie de la FPI

La fibrose est la conséquence d'une cicatrisation excessive d'un tissu suite à l'agression de ce dernier. Elle peut atteindre divers organes comme la peau, le rein, le foie (cirrhose), la vessie mais également être systémique (sclérodermie systémique). Dans le cas du poumon, l'épithélium et/ou l'endothélium pulmonaires peuvent subir des lésions, consécutivement à l'exposition à la pollution de l'air, à l'amiante, la fumée de cigarette etc... En réponse à ces

microlésions, une régénération tissulaire va être initiée et va mener au processus de cicatrisation, ou *wound healing* en anglais. Ce processus physiologique, essentiel pour reconstituer les barrières protectrices de chaque tissu en cas de blessure, repose sur la production d'une matrice extracellulaire (MEC) ainsi que sur une re-épithélialisation de la zone lésée. Cependant dans des circonstances encore mal comprises, la cicatrisation est incomplète et s'accompagne d'un emballement du processus. Ce phénomène va entraîner un dépôt excessif de la MEC et conduire au développement d'une fibrose⁵³. Le challenge aujourd'hui est de comprendre pourquoi ce processus se dérégule et de quelle manière.

a) Cicatrisation et Fibrose

La fibrogenèse est un processus de cicatrisation non contrôlée. Elle est initiée lors d'une blessure au niveau de l'épithélium/endothélium pulmonaire. Cette lésion déclenche alors la cascade de coagulation avec l'activation des thrombocytes (plaquettes) et donc la formation de fibrine, qui constituera une MEC provisoire. En réponse à cette lésion, les cellules environnantes, dont les plaquettes, vont sécréter tout un panel de cytokines/chémokines dans le but de favoriser le recrutement de cellules immunitaires. Parmi elles, on retrouve des facteurs de croissance tels que le *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1)⁵⁴ et le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF)⁵⁵, mais également des métalloprotéases matricielles (MMP) qui vont participer à la destruction de la lame basale et ainsi faciliter l'infiltration des cellules immunitaires⁵⁶. Les neutrophiles et macrophages vont permettre dans un premier temps l'élimination des débris cellulaires, des cellules mortes et des éventuels corps étrangers responsables de la lésion⁵⁷. L'infiltration lymphocytaire mais également de toutes les autres cellules immunitaires, s'accompagne de la sécrétion de facteurs pro-fibrosants tels que le TGF-β1, le PDGF ou encore l'IL-13, ce qui induit une suractivation des macrophages et des fibroblastes. Les fibroblastes activés sont des cellules clés dans ce processus, puisqu'elles vont exprimer de l'*α-smooth-muscle actin* (α-SMA) et en conséquence acquérir un phénotype migratoire et sécrétoire particulier. Elles deviennent des myofibroblastes qui sécrètent du collagène et vont migrer vers la zone de l'épithélium/endothélium lésée, permettant ainsi la contraction de la plaie et la re-épithélialisation de la zone. Ce processus de cicatrisation est régulé, notamment par le rapport entre les quantités tissulaires des MMPs et de leurs inhibiteurs les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* ou inhibiteurs tissulaires des MMPs). Ces derniers contrôlent à la fois la synthèse et la dégradation du collagène, donc la production et le dépôt de la MEC⁵⁸. Une fois le processus de cicatrisation complet, la régulation physiologique de ce rapport MMPs/TIMPs contribue à éteindre ce processus.

Lors de multiples lésions ou d'atteintes chroniques du tissu pulmonaire, on observe une persistance de la production des myofibroblastes, une sécrétion anarchique et non contrôlée de MEC, et un rapport MMPs/TIMPs perturbé. Il en résulte un dépôt excessif et continu de MEC au niveau de la blessure et au-delà, une multiplication des myofibroblastes accompagné d'une sécrétion importante de collagène, l'ensemble conduisant à la fibrose^{57,59} (Figure 7).

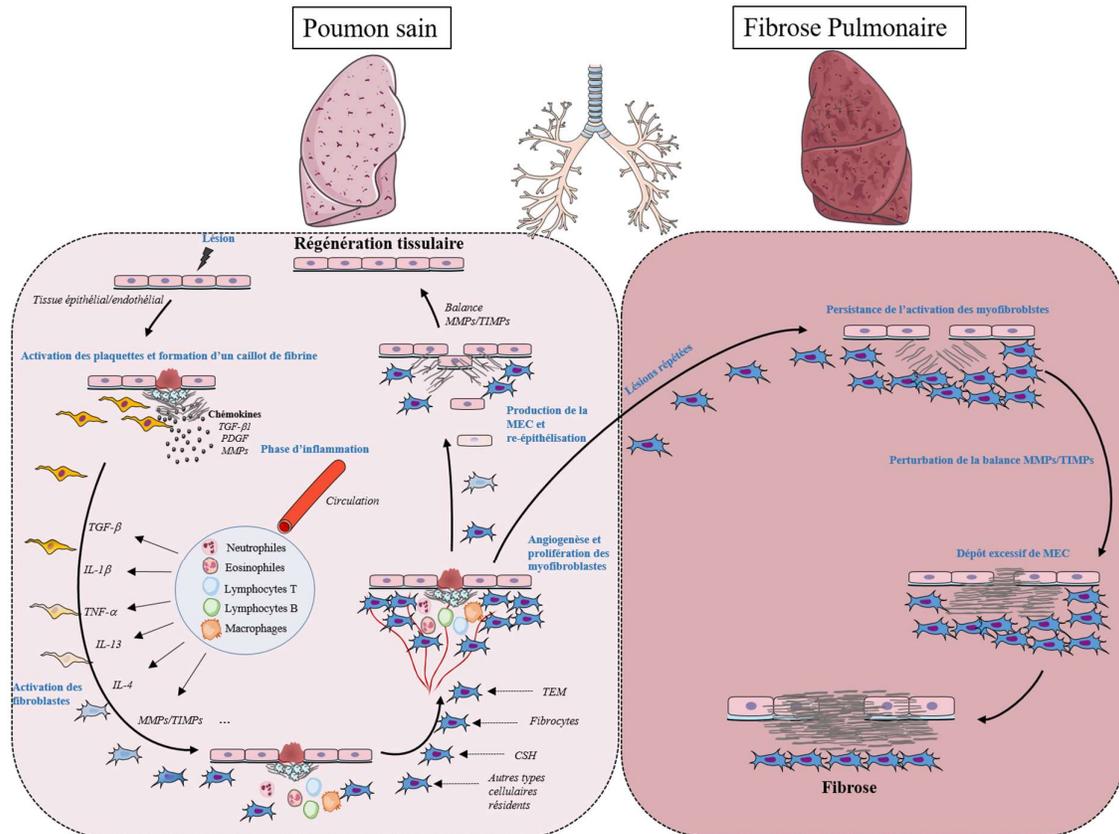


Figure 7 : Mécanismes de cicatrisation tissulaire et fibrogenèse : Synthèse schématique des grandes étapes du processus de cicatrisation. Lors d'une atteinte chronique, le processus classique de cicatrisation est perturbé ce qui conduit à une activation non contrôlée des myofibroblastes. Il en résulte ainsi une production anarchique de matrice extracellulaire responsable de la fibrose. TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse, CSH : Cellules Souche Hématopoïétiques, MMP/TIMP : Métalloprotéinase de la matric/*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, MEC : Matrice Extra-Cellulaire.

b) Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)

Un grand nombre de cytokines, pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires, participent aux différents stades de la fibrogenèse. Lors des phases précoces de la maladie, un taux plus important de facteurs pro-inflammatoires est présent, tels que de l'interleukine (IL)-1, d'IL-6, du *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α) ou encore des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*). Le développement proprement dit de la fibrose, c'est-à-dire l'accumulation tissulaire de collagène, s'accompagne d'une sécrétion importante de facteurs de

croissance aux propriétés plutôt anti-inflammatoires, tels que les VEGF, FGF, PDGF, et surtout le TGF- β 1⁶⁰ clairement identifié comme étant un médiateur cellulaire clé dans le processus de fibrogenèse^{61,62}.

i. Biosynthèse et sécrétion

Le TGF- β 1 appartient à la superfamille du TGF- β qui comprend des cytokines ubiquitaires impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose mais également dans l'embryogenèse et le développement fœtal⁶³. Cette famille se décompose en deux sous-familles, à savoir la famille TGF- β /Activine/Nodal, et la famille BMP (*bone morphogenetic protein*)/GDF (*growth and differentiation factor*)/MIS (*muellerian inhibiting substance*)⁶³. Chez l'Homme, il existe trois isoformes du TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) et le TGF- β 1 représente le complexe le plus étudié à l'inverse des deux autres isoformes⁶⁴.

L'étude du TGF- β connaît son apogée dans les années 80-90. Joan Massagué, contribua principalement à la compréhension du rôle du TGF- β . Il fait partie des pionniers ayant découvert et compris la biosynthèse et la signalisation de cette cytokine en collaboration avec le laboratoire de Harold Moses⁶⁵. La biosynthèse du TGF- β est le résultat d'une succession de clivages⁶⁶. La séquence humaine de l'ARNm du TGF- β est très conservée entre les espèces⁶⁷. La biosynthèse peptidique du TGF- β est initiée par la formation d'un pré-pro-précurseur (pre-pro-TGF- β) de 390 acides aminés (AA) composé d'un peptide signal en position N-terminal, et d'une séquence de 112 AA représentant le TGF- β mature. Ces deux séquences sont séparées par une longue séquence de 249 AA, « *Latency-Associated Protein* » ou LAP. Le peptide signal est alors libéré et une endopeptidase (la furine) va venir cliver ce précurseur peptidique au niveau d'un site Arg-His-Arg-Arg (RHRR), situé dans la région LAP. A la suite de ce clivage, deux produits sont libérés, un peptide LAP et le pro-TGF- β monomère de 25kDa. Ces peptides s'homodimérisent ensuite par le biais de ponts di-sulfures (S-S) (rouge) et ces deux homodimères se lient de manière non covalente afin de former un complexe latent de 75 kDa. Sous cette forme, le TGF- β ne peut pas se fixer sur son récepteur⁶⁸. Ainsi, une autre protéine, « *Latent TGF- β Binding Protein* » ou LTBP va intégrer le complexe en interagissant avec l'homodimère LAP et ainsi former le complexe latent du TGF- β . Ce complexe peut être stocké dans la cellule avant d'être sécrété dans le milieu extracellulaire^{65,66} (Figure 8).

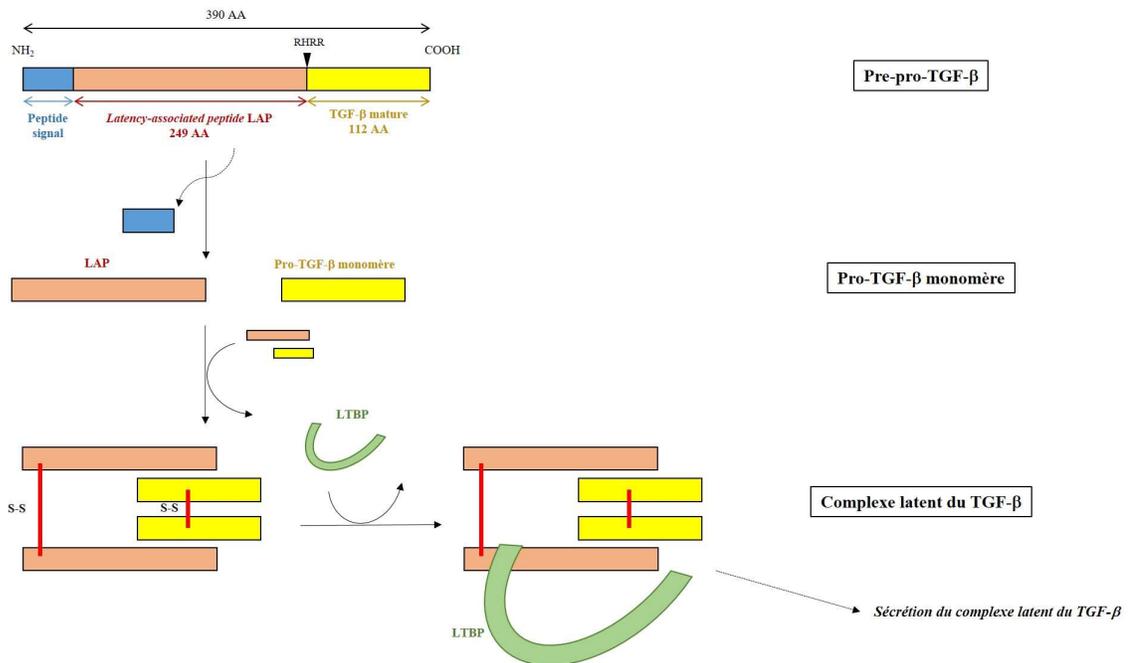


Figure 8 : Structure et Biosynthèse du TGF- β : La biosynthèse du TGF- β résulte d'une succession de clivages. Elle est synthétisée dans un premier temps sous la forme d'un précurseur pré-pro-TGF- β puis pro-TGF- β qui se dimérise pour former un complexe LAP/TGF- β . L'association du peptide LTBP est nécessaire pour la sécrétion et la constitution du complexe latent du TGF- β .

Le TGF- β est sécrété sous forme inactive et subit des étapes d'activation. *In vitro*, un grand nombre de conditions ou facteurs ont été identifiés comme capables d'activer ce complexe latent par le clivage de LAP⁶⁹. C'est le cas de l'hydrolyse acide ou de la chaleur par exemple. Des sérines protéases sont décrites comme étant des activateurs du TGF- β ⁷⁰ par le clivage de LAP. La plasmine a été la première peptidase décrite comme activateur du TGF- β , mais il existe aussi la thrombine. Leur activité *in vivo* est encore mal comprise. La Thrombospondin-1 (TSP-1) est une protéine d'adhésion sécrétée par un grand nombre de types cellulaires. Elle possède une séquence particulière qui va pouvoir se fixer à LAP et ainsi perturber sa liaison avec le TGF- β et facilitant donc sa libération. TSP-1 a ainsi été décrite comme un régulateur positif majeur du TGF- β et pourrait être un bon candidat pour le développement de nouvelles drogues⁷¹. Le récepteur *Insulin-like Growth Factor-II/Mannose-6-phosphate* (IGFII/M6P-R) a également été décrit comme un activateur du TGF- β . Celui-ci serait capable de lier le complexe TGF- β /LAP/LTBP et libérer le TGF- β dans sa forme active⁷².

Les intégrines représentent des acteurs importants d'activation du TGF- β ⁷³. Ce sont des récepteurs hétérodimériques (composés d'une sous-unité α et β) d'adhésion cellulaire, qui vont

permettre à la cellule d'interagir avec la MEC. Ces protéines transmembranaires sont bien documentées comme étant des activateurs du TGF- β ⁷⁴. En effet, le peptide LAP possède une séquence d'AA RGD (Arg-Gly-Asp) pour laquelle les intégrines ont une affinité de liaison. Elles peuvent ainsi piéger à la surface membranaire le complexe latent, facilitant l'activité protéolytique d'autres protéases et libérer la forme active du TGF- β . C'est le cas des isoformes $\alpha\nu\beta$ ⁷⁵ et $\alpha\nu\beta$ ⁷⁶ pour qui le ligand majoritaire est le TGF- β latent. Les métalloprotéases de la matrice (MMPs) ont elles aussi été décrites comme facilitant l'activation du TGF- β ⁷⁰ notamment en agissant en collaboration avec les intégrines de surface⁷⁷.

ii. Récepteurs du TGF β

L'ensemble des cytokines de la superfamille du TGF- β se lie à des récepteurs transmembranaires de la famille des sérine/thréonine kinases⁷⁸. Dans le génome humain, il existe 12 récepteurs dans cette famille : 7 de types I et 5 de types II. Chaque ligand de cette superfamille va être associé à un couple de récepteur qui lui correspond (Figure 9A). Par exemple, le TGF- β va se lier avec le récepteur de type II TGF- β RII, qui va ensuite s'associer soit à ALK5 (ou TGF- β RI) soit à ALK1 en fonction du type cellulaire. Chaque récepteur possède une partie N-terminale qui se situe dans le compartiment extracellulaire et qui va interagir directement avec le TGF- β , une région transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase. Les récepteurs de type I sont caractérisés par la présence du domaine GS dans leurs région N-terminale se traduisant par la séquence TTSGSGSG. Cette GS box est certes localisée en N-terminal, mais elle se situe dans la zone cytoplasmique de la cellule. L'affinité du ligand pour son récepteur va être différente entre les sous-familles de TGF- β . La sous-famille BMP se lie, dans un premier temps, avec le récepteur de type I alors que le TGF- β et l'activine avec le récepteur de type II. Ainsi, dans le cas du TGF- β , après fixation avec le récepteur de type II, le récepteur de type I va se rapprocher pour former un complexe TGF- β /TGF- β RI/TGF- β RII. Le ligand TGF- β est un homodimère, il va donc être capté par un deuxième récepteur de type II (donc dans ce cas TGF- β RII) et induire le rapprochement à nouveau d'un autre récepteur de type I (donc de type ALK). Ainsi, après interaction avec son récepteur, le TGF- β va induire à la surface cellulaire un complexe de 2 TGF- β RI et 2 TGF- β RII (Figure 9B). Suite à la constitution de ce complexe, le récepteur kinase de type II phosphoryle le domaine intracellulaire GS (GS box) du récepteur de type I et les multiples résidus sérine et thréonine de ce domaine. Ce phénomène initie ainsi le début de la signalisation intracellulaire médiée par la fixation du TGF- β à son récepteur⁶³.

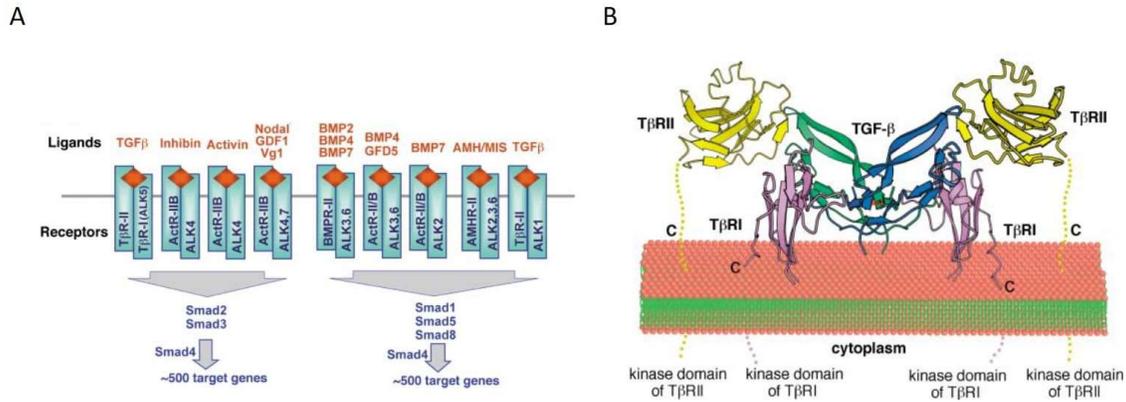


Figure 9 : Structure des récepteurs de la superfamille du TGF-β : A) Représentation schématique des différents couples de récepteurs (de type I et II) des ligands de la superfamille du TGF-β. B) Modèle structural du récepteur du TGF-β et de son ligand. Ce modèle montre la partie extracellulaire de ce complexe avec les homodimères de TGF-βRI et TGF-βRII après interaction avec leur ligand TGF-β. La partie C-terminale (C) de chaque domaine, matérialisée en pointillés, est située dans le milieu intracellulaire et permet la transduction du signal via une activité sérine/thréonine kinase. Issue de Shi & Massagué 2003⁶³.

Deux types de récepteurs TGF-βRI vont être impliqués dans la signalisation du TGF-β1. Le plus étudié dans le contexte de la fibrose pulmonaire est ALK5⁶². Son inhibition conduit à l'atténuation de la fibrose pulmonaire par la diminution du collagène de type I, comme cela a été montré dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine⁷⁹. Une autre étude a montré dans un modèle d'exacerbation aiguë de fibrose pulmonaire idiopathique (AE-FPI induite par une infection à *herpesvirus*, que son inhibition diminuait l'infiltration cellulaire et la réponse antivirale médiée par la sécrétion d'interféron gamma (IFNγ), et par conséquent induisait un effet anti-fibrosant⁸⁰. En revanche, l'implication d'ALK1 dans la fibrose pulmonaire n'a pas encore été démontrée. Un nombre croissant d'études s'intéressent à ce récepteur dans le processus fibrosant⁸¹. Par exemple, une étude récente *in vitro* montre que la signalisation ALK1/Smad1/5 active les fibroblastes⁸².

Il est important de noter qu'il existe un récepteur de type III, de type betaglycane, qui a longtemps été décrit comme un co-récepteur du complexe membranaire et qui semble avoir de plus en plus son importance dans la signalisation du TGF-β. Ce TGF-βRIII possède une grande affinité pour les trois isoformes du TGF-β et facilite la fixation du ligand au TGF-βRII. Ce complexe de trois types de récepteurs est essentiel pour l'activation de la voie canonique et non canonique⁸³. La formation de ce complexe va induire l'autophosphorylation du TGF-βRII ainsi que la transphosphorylation du TGF-βRI⁸⁴.

Après l'interaction du TGF- β avec son récepteur et à l'activation des domaines intracellulaires par phosphorylation, deux voies de signalisation vont être sollicitées et relayer le signal du récepteur membranaire au noyau permettant de transcrire les gènes cibles : la voie de signalisation canonique (voie principale, la voie des Smads) et la voie dite non canonique (qui regroupe un ensemble de voies de signalisation annexes). Cette classification est associée à la chronologie de découverte des voies (voie des Smads initialement identifiée chez la drosophile en 1995⁸⁵ alors que l'apparition de la voie non canonique se fait plus tard) et à l'intérêt qu'elles ont suscité. En effet, la voie de signalisation canonique est à ce jour la plus étudiée et la plus connue lorsque l'on évoque la signalisation médiée par le TGF- β , à l'inverse de la voie non canonique qui comprend différentes voies annexes pouvant interférer avec la principale. Mais des données émergentes suggèrent l'importance de ces voies de signalisation non canoniques dans la signalisation induite par le TGF- β et dans les maladies fibrosantes⁸⁶.

iii. Voie de signalisation canonique : la voie des SMADs

La voie des SMAD (*mother against decapentaplegic homolog*) est la voie principale de réponse cellulaire après interaction du TGF- β avec son récepteur. Cette voie de signalisation fait intervenir les protéines de la famille des SMAD qui se catégorisent en trois groupes : 1) Les SMAD associées aux récepteurs (R-SMAD) incluant SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8 (appelée aussi SMAD9). Chacune de ces protéines induisent une voie de signalisation différente. 2) SMAD4 dite SMAD co-régulatrice (Co-SMAD), une protéine effectrice nécessaire à la translocation nucléaire du complexe des SMADs et à la constitution du facteur de transcription. 3) Les SMADs antagonistes ou inhibitrices (I-SMAD), qui comprennent SMAD6 et SMAD7. Elles permettent de réguler négativement la voie de signalisation en entraînant la dégradation des récepteurs au TGF- β ou en rentrant en compétition avec les R-SMAD⁸⁴. Les SMADs sont des protéines très conservées entre les espèces et possèdent des homologies de séquence structurales (Figure 10). Elles détiennent le domaine MH1 (*Mad Homology domain 1*) en N-terminal, et le domaine MH2 en C-terminal, ces derniers étant connectés par une région fortement conservée dite région linker. Seuls les R-SMAD et les Co-SMAD partagent le domaine MH1. Les R-SMADs et SMAD4 possèdent dans le domaine MH1 un peptide signal de localisation nucléaire (NLS) mais également d'export nucléaire pour SMAD4 (NES). Ainsi, le domaine MH1 est essentiel pour l'import des R- et Co-SMAD dans le noyau mais permet également de fixer l'ADN sur l'exon 3. Une insertion de 30 acide aminée (AA) dans cet exon prive SMAD2 de cette possibilité. Concernant le domaine MH2, toutes les

protéines SMAD en possèdent un. Ce domaine est essentiel pour leur régulation car c'est lui qui est responsable de leur oligomérisation. Seuls les R-SMAD possèdent dans le domaine MH2 une région de deux résidus sérine répétés (appelé motif (SSXS)) ce qui leur permet d'interagir directement avec le TGF- β RI activé. SMAD4 contient dans la région linker une séquence peptidique de 48 AA nommée SAD (*SMAD4 Activation Domain*) qui est indispensable pour activer l'expression des gènes cibles⁸⁷ (Figure 10).

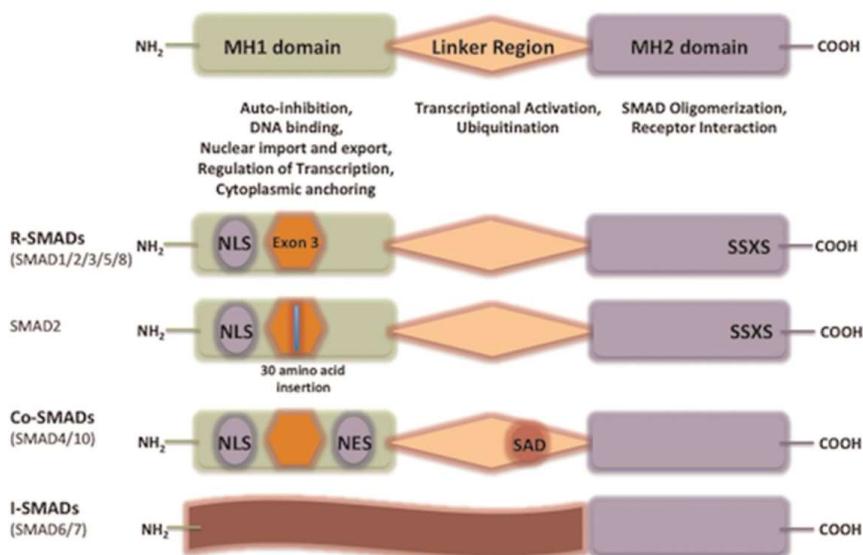


Figure 10 : Schéma simplifié de la structure des protéines SMAD : Les protéines SMAD possèdent un schéma structural commun (hormis pour les I-SMAD), avec un domaine MH1 en position N-terminale, un domaine MH2 en position C-terminale et relié par une région linker. Chacun de ces domaines confère une activité particulière à la protéine. Le domaine MH1 est nécessaire à la fixation des SMAD à l'ADN grâce à l'exon 3, à l'import ou à l'export de la protéine, respectivement conféré par la présence d'un signal de localisation nucléaire (*Nuclear Localization Signal* ou NLS) ou d'export nucléaire (*nuclear export signal* ou NES). La région linker est essentielle à l'activité transcriptionnelle de la protéine en raison de la présence d'un domaine SAD (*SMAD4 activation domain*) que les R-SMAD ne possèdent pas. Enfin le domaine MH2 est commun à toutes les SMAD. Ce domaine est essentiel pour leur oligomérisation et pour l'interaction avec le récepteur membranaire activé, notamment grâce au motifs SSXS. Issue d'Aashaq *et al.*, 2021⁸⁴

Ainsi, la signalisation est initiée par la fixation du ligand (TGF- β) par le récepteur de type II ce qui va induire le rapprochement du récepteur de type I, permettant l'activation du complexe par phosphorylation du domaine GS. Une protéine d'ancrage membranaire, SARA (*SMAD-Anchor for Receptor Activation*) peut interagir directement avec les R-SMAD ainsi que TGF- β RI. En effet, cette protéine contient deux domaines en doigts de zinc (domaine FYVE), l'habilitant à s'ancrer dans la membrane cellulaire via son affinité pour le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). Elle possède également un domaine de fixation au SMAD (SBD pour *SMAD Binding Domain*) qui lui permet de se lier préférentiellement à SMAD2/3 non

phosphorylé. La localisation de SARA est proche des récepteurs au TGF- β . Ainsi, lors d'une activation de la voie de signalisation médiée par le TGF- β , la phosphorylation de SMAD2/3 va induire la destruction du complexe SMAD2/SARA ou SMAD3/SARA. SARA constitue donc une source majeure de SMAD2/3 au niveau de la membrane, mobilisable rapidement lors de l'activation des récepteurs aux TGF- β . La libération de SARA va permettre la formation de nouveaux complexes SARA/SMAD2 ou SARA/SMAD3. Ainsi, le recrutement de SMAD2/3 au niveau du TGF- β RI induit sa phosphorylation au niveau du domaine SSXS puis sa dislocation avec SARA⁸⁸.

Une fois phosphorylées, les R-SMAD peuvent acquérir des conformations stœchiométriques différentes avec formation d'hétérotrimères comprenant deux R-SMAD et un SMAD4, mais peuvent également former des hétérodimères avec un seul R-SMAD associé à SMAD4. Ces différentes associations en hétérodimères ou trimères va dépendre du ligand mais également du facteur de transcription recruté lors de l'interaction avec l'ADN⁸⁹. Ainsi, après la formation de cet oligomère, ce complexe va se transloquer dans le noyau et être associé à divers facteurs de transcription en fonction de l'expression du gène cible. Le complexe SMAD se lie avec une faible affinité à l'ADN grâce à une séquence consensus riche en GC nommée SBE (*SMAD-Binding Element*). Pour augmenter son affinité avec les éléments de réponse, ce complexe se transforme en recrutant des facteurs de transcription et des cofacteurs. Leur nature est dépendante du tissu mais également du type de réponse souhaitée⁹⁰. Il existe un très grand nombre de facteurs de transcription associés à la voie des SMAD⁹¹. Le complexe SMAD peut également s'associer à des modificateurs de chromatine tels que les histones désacétylases (HDAC) ou histones acétyltransférases (HAT) afin de moduler le niveau d'expression de gènes cibles⁹² (Figure 11).

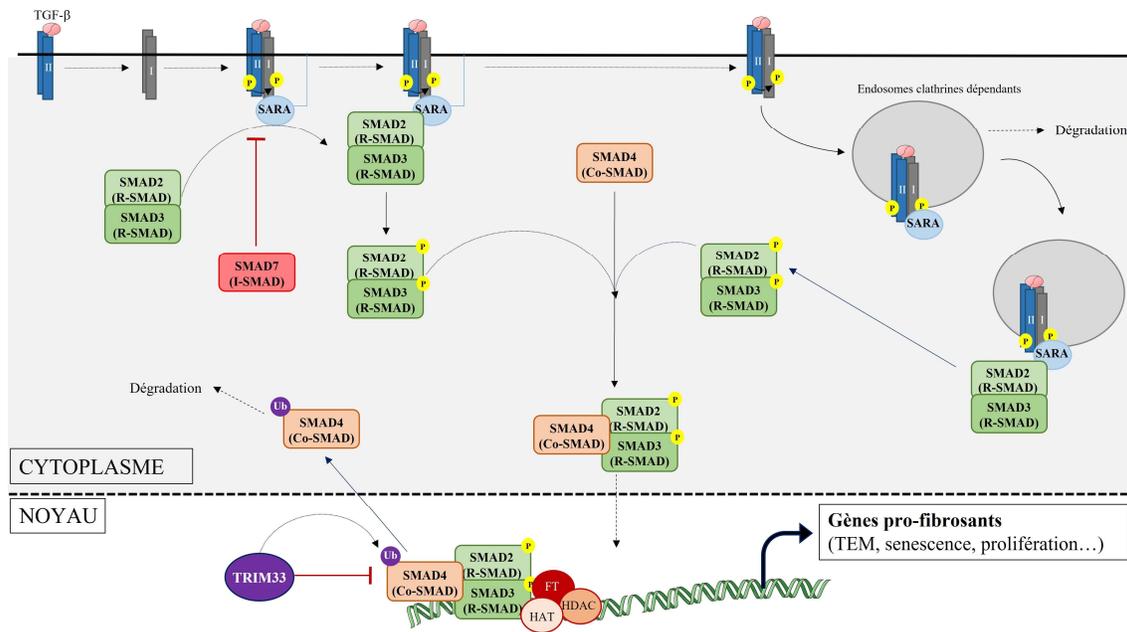


Figure 11 : Voies schématiques de la voie canonique du TGF- β SMADs-dépendante : Le TGF- β interagit avec le récepteur de type II (TGF- β RII) ce qui induit le rapprochement du TGF- β RI et la phosphorylation de son domaine intracellulaire. S'en suit un recrutement de la protéine d'ancrage SARA et des R-SMADs. La phosphorylation de SMAD2/3 entraîne l'interaction avec SMAD4 ce qui permet au complexe de migrer dans le noyau, et ainsi de fixer les régions consensus SBE afin de déclencher l'expression des gènes cibles. TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse, Co-Smad : Smad co-régulatrices, R-Smad : Smad associées aux récepteurs, I-Smad : Smad inhibitrices ou antagonistes, FT : Facteurs de transcription, HAT : histones acétyltransférases, HDAC : histones désacétylases.

De plus, cette voie peut être régulée à différents niveaux. Suite à leur stimulation, les récepteurs du TGF- β vont être endocytés par invagination de la membrane plasmique de manière clathrine-dépendante ce qui va permettre à la cellule d'effectuer une première régulation membranaire avec une réduction de la densité membranaire de récepteurs à sa surface⁹³. Mais, le récepteur dans l'endosome précoce peut toujours être une source d'activation de SMAD2/SMAD3. En effet, le récepteur est invaginé dans un endosome afin d'être dégradé par la cellule, mais le domaine intracellulaire du récepteur est toujours ancré dans la membrane de la vésicule et demeure donc une source d'activation des R-SMADs⁹⁴. De plus, la I-SMAD SMAD7 interfère avec le recrutement de R-SMAD, stimule la déphosphorylation des récepteurs mais favorise également le recrutement d'une E3-ubiquitine ligase pour induire la dégradation du complexe SMAD2/3 et des récepteurs aux TGF- β ⁹⁵. Aussi, la protéine à activité ubiquitine ligase TRIM33 (*Tripartite motif-containing 33*), connue également sous le nom de TIF-1 γ (*transcription intermediary factor-1 gamma*) a été décrite comme étant un régulateur négatif de la signalisation du TGF- β 1 à travers l'ubiquitination de SMAD4⁹⁶ (Figure 11). Plus

récemment, TRIM33 a également été représentée comme ayant une activité anti-fibrosante en déstabilisant l'interaction entre HSPB5 (protéine de choc thermique B5 ou α B-crystallin) et SMAD4, interaction essentielle à la translocation de SMAD4 dans le noyau^{97,98}.

iv. Voies de signalisation non canoniques

En parallèle de la voie de signalisation dépendante des SMADs (voie canonique), la stimulation par le TGF- β de son récepteur peut induire d'autres voies de signalisation annexes. Il existe énormément de voies non canoniques et elles suscitent un intérêt croissant, notamment en tant que cibles potentielles de développement de nouveaux traitements anti-fibrosants^{83,84,86}. Seront abordées ici uniquement les voies non canoniques les plus étudiées et décrites dans la littérature ce qui n'en dresse pas une liste exhaustive (Figure 12).

La voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) est une voie impliquée dans un grand nombre de phénomènes cellulaires tels que l'apoptose, la différenciation cellulaire etc... mais apparait également dans la signalisation médiée par le TGF- β . C'est une voie générale qui implique trois grandes familles de protéines régulatrices chez les mammifères. On retrouve les ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), les MAPK p38 et ses diverses isoformes (α , β , γ , δ), les JNK (*Jun amino-terminal Kinase*)⁹⁹.

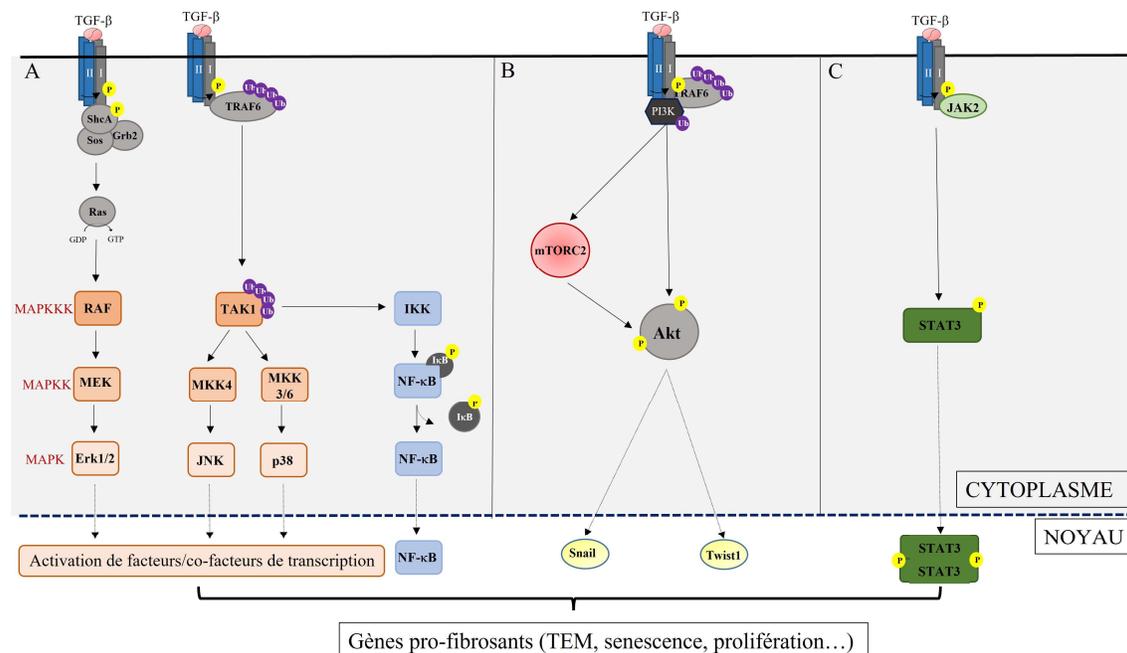


Figure 12 : Voies schématiques et simplifiées de la signalisation non-canonique du TGF- β : A) Voie des MAP kinases (MAPK) impliquant les facteurs de transcription ERK1/2, JNK et p38. Représentation de la voie NF- κ B inductible par la voie des MAPK. B) Voie Pi3K/mTOR/Akt pouvant induire les facteurs de transcription Snail et Twist1. C) Voie JAK2/STAT3.

Le TGF- β a été décrit comme étant capable d'activer la voie ERK/MAPK par phosphorylation de ShcA. Brièvement, suite à son activation, le TGF- β RI phosphoryle la protéine adaptatrice ShcA (SchA(P)) pour former un complexe ShcA(P)/Grb2/Sos. Ce complexe initie alors la cascade Ras GTPase et s'en suit une activation séquentielle de RAF, MEK (MAP kinase/ERK kinase) et ERK1/2 kinases¹⁰⁰. Dans un modèle murin de fibrose sclérodermique induite par surexpression d'ALK5, il a été décrit que le processus fibrosant est dépendant de SMAD1 et ERK1/2 et non de SMAD2/3¹⁰¹. Dans une signalisation induite par TGF- β 1 sur des cellules épithéliales, les auteurs ont montré que la voie Ras-MAPK induit la phosphorylation de la région linker de SMAD2/3 ce qui conduit à la séquestration dans le cytoplasme de ce complexe et à l'inhibition de la signalisation induite par le TGF- β ¹⁰². Concernant la voie JNK et p38-MAPK, le TGF- β peut également rapidement activer cette voie de manière SMAD indépendante^{103,104}. Le récepteur au TGF- β activé interagit avec TRAF6 (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6*) qui est une E3 ubiquitine ligase. L'association de ce facteur avec le TGF- β R induit l'auto-ubiquitinylation de TRAF6 suivie de son association avec TAK1 (TGF- β activated kinase 1). TRAF6 va ainsi poly-ubiquitinyler TAK1 et donc initier la cascade de signalisation des MAPK par activation séquentielle de MKK4 puis JNK ou de MKK3/6 puis p38-MAPK¹⁰⁰. Dans un contexte de fibrose pulmonaire, la protéine MAPK phosphatase-5 (MKP-5) est une tyrosine phosphatase qui régule négativement l'activation de p38-MAPK et de JNK. Les travaux de Xylourgidis *et al.*, suggèrent un phénomène complexe de compensation entre voie canonique et voie non canonique. Le déficit en MKP-5 (qui lève la régulation négative des voies JNK et p38-MAPK) accompagné d'un challenge pro-fibrosant de type bléomycine ou TGF- β 1 chez la souris, protège les cellules pulmonaires de leur transformation en myofibroblastes et les souris de la fibrose pulmonaire. Ces auteurs émettent l'hypothèse que cette voie non canonique, impliquant JNK et p38-MAPK, régulerait négativement la voie de signalisation induite par le TGF- β 1 via l'activation de SMAD7 et qu'en condition de fibrose, cette voie non canonique est inhibée par la protéine MKP-5¹⁰⁵. En revanche, d'autres études montrent que JNK1 est indispensable pour le développement de la fibrose pulmonaire¹⁰⁶ et que son inhibition, ainsi que celle de p38-MAPK, par un antibiotique (méthacycline) contribue à réduire la transformation mésenchymateuse *in vitro* protégeant ainsi les souris de la fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine¹⁰⁷. Ces résultats contradictoires suggèrent une régulation complexe menée par les JNK et un rôle encore mal compris dans un contexte de fibrose (Figure 12A)

Le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) possède une signalisation complexe et participe à la régulation de nombreuses voies de signalisation. Son activation est intimement associée aux mécanismes de cancérogenèse (survie cellulaire, prolifération, angiogenèse, invasion/métastases)¹⁰⁸. On le retrouve aussi impliqué dans les processus d'inflammation en réponse à des cytokines telles que l'IL-1 β ou le TNF- α , et il est fortement exprimé par les cellules immunitaires. Son activation est décrite dans beaucoup de maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la maladie de Crohn ou encore la rectocolite hémorragique¹⁰⁹. NF- κ B a aussi été décrit dans la pathogenèse de nombreuses maladies pulmonaires¹¹⁰ et il est maintenant connu que la voie de signalisation induite par le TGF- β implique NF- κ B via la voie des MAPK et l'intervention de TAK1¹¹¹. En effet, TAK1 est capable de phosphoryler le complexe I κ B kinase (IKK) et l'activer, ce qui permet de lever l'inhibition de NF- κ B. I κ B est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Quant à lui, NF- κ B activé migre dans le noyau et active la transcription de gènes cibles (Figure 12A). Dans un contexte de fibrose pulmonaire, NF- κ B semble être impliqué dans la différenciation des fibroblastes humains et murins à la suite d'une stimulation par TGF- β et son inhibition contribue à diminuer les effets de cette activation¹¹².

La voie Pi3K-Akt (*Phosphatidylinositol 3-Kinase/protein kinase B*) est une voie très complexe impliquée également dans un grand nombre de voies métaboliques en rapport avec le cancer¹¹³ (survie cellulaire, prolifération, TEM...). Le TGF- β est connu pour activer cette voie¹¹⁴. Elle est initiée par une interaction de Pi3K avec les récepteurs du TGF- β . De manière intéressante, la sous-unité régulatrice de Pi3K, p85 est associée de manière constitutive avec les récepteurs de type 2, mais inductible par le TGF- β 1 au niveau du récepteur de type I¹¹⁵. La stimulation par TGF- β active TRAF6 qui activé, ubiquitinyle p85, active Pi3K qui à son tour active Akt par phosphorylation. De plus, l'activation de Akt peut se faire par la voie mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*), qui peut être induite par Pi3K également¹⁰⁰ (Figure 12B). Cette voie Akt possède de nombreuses cibles, comme des facteurs de transcription tels que snail et twist1, qui sont des protéines très connues pour induire la transformation mésenchymateuse et favoriser la migration cellulaire¹¹⁴. Cette voie est impliquée dans la fibrogenèse de nombreux tissus⁸⁶ et notamment dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la rat¹¹⁶. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la voie Pi3K/Akt (LY294002) contribue à protéger les animaux de la fibrose induite¹¹⁶.

La voie des JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) est une voie essentielle à l'homéostasie cellulaire. La perturbation de cette voie peut initier des processus pathologiques, par exemple cancéreux ou pro-inflammatoires¹¹⁷. Cette voie est la cible de nombreux médicaments, les inhibiteurs de JAK (ou jakinibs) approuvés dans le traitement de différents cancers ou maladies inflammatoires¹¹⁸. L'un des derniers en date est le tofacitinib qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans le traitement de la rectocolite hémorragique. La famille du médiateur cellulaire JAK comprend trois membres (JAK1, JAK2 et JAK3) tous trois nécessaires pour initier la transduction du signal au niveau du récepteur. Les protéines STAT représentent les facteurs de transcription et il en existe sept isoformes (STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6)¹¹⁹. Le principe de signalisation est le même pour toutes les isoformes. Le choix des couples JAK/STAT dépend de la nature du couple ligand/récepteur. Lors d'une stimulation par le TGF- β 1, c'est le couple JAK2/STAT3 qui est activé (Figure 12C). La protéine JAK induit la phosphorylation du récepteur et le recrutement de la protéine STAT via son domaine SH2. La protéine JAK phosphoryle alors et active STAT qui, suite à son homodimérisation avec une autre forme phosphorylée, migre dans le noyau et induit l'expression de ses gènes cibles. Beaucoup d'études décrivent l'importance des voies JAK/STAT dans les PID¹²⁰. Parmi celles-ci, Pedroza *et al.*, ont démontré que STAT3 contribue à la mise en place de la fibrose pulmonaire en induisant la différenciation des cellules résidentes (épithéliales et fibroblastes) en myofibroblastes. De plus, son inhibition protège les souris de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine¹²¹.

Il existe d'autres voies non-canoniques du TGF- β décrites dans le processus de fibrogenèse. C'est le cas de la voie Rho-GTPase qui régule la dynamique du cytosquelette et la mobilité cellulaire. Le TGF- β peut activer la petite protéine G (GTPases) RhoA (*Ras homolog family member A*) qui à son tour active ROCK (*Rho-associated colied-coil containg protein kinases*), qui est un médiateur important de cette voie. Cette voie a été décrite comme étant crucial dans la différenciation myofibroblastique et la production de MEC par des fibroblastes humains isolés à partir de peau de patients atteint de sclérodémie systémique¹²² (maladie pouvant induire également une PID).

c) Les Myofibroblastes

Les myofibroblastes sont un type de fibroblastes particuliers qui ont acquis la capacité de migrer et de produire du collagène. Elles apparaissent comme les cellules clé du processus de

cicatrisation mais sont aussi à l'origine du développement incontrôlé de la fibrose. Ces cellules expriment de l' α -smooth muscle actin (α -SMA) responsable de leur capacité de contraction ainsi que de leur mobilité¹²³. Comme nous l'avons vu Figure 7, les myofibroblastes résultent principalement de l'activation des fibroblastes résidents, stimulés par des médiateurs chimiques lors d'une blessure. Ainsi, au cours du processus de cicatrisation, les myofibroblastes produisent de la matrice extracellulaire au niveau de la zone lésée⁵⁷. Dans un processus physiologique, la production de MEC est contrôlée par la balance entre les métalloprotéinases (MMP) et les inhibiteurs de MMP (balance MMPs/TIMPs), mais également par l'apoptose des myofibroblastes¹²⁴. Bien que les fibroblastes constituent une source majeure de myofibroblastes¹²⁵, de nombreux types cellulaires sont capables de se différencier en myofibroblastes sous l'action d'un environnement pro-fibrotique. Leur origine peut être épithéliale, la transformation cellulaire est alors appelée « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM), mais elles peuvent également être issues de cellules dérivées de la moelle osseuse telles que les fibrocytes. Les péricytes peuvent aussi se différencier en myofibroblastes tout comme les cellules souches mésenchymateuses, plus connues sous le nom de *mesenchymal stem cells* en anglais (MSC)¹²⁶. Notre équipe a également mis en évidence la capacité des cellules mésothéliales à se différencier en myofibroblastes¹²⁷⁻¹²⁹. De plus, de récentes études évoquent la capacité des cellules endothéliales à se différencier en myofibroblastes sous l'effet d'un stress oxydatif¹³⁰ ou encore du TGF- β 1¹³¹. L'origine des myofibroblastes reste une thématique dynamique et évolutive¹²⁶.

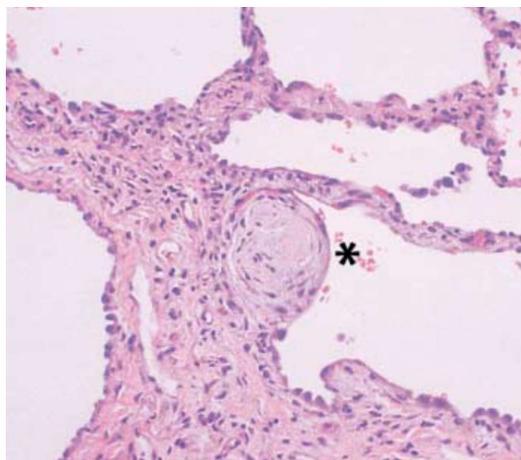


Figure 13 : Mise en évidence d'un foyer fibroblastique ou *fibroblastes foci* : Observation d'une coupe histopathologique d'un patient atteint de FPI. Coloration hématoxyline & éosine qui met en évidence un foyer fibroblastique ou *fibroblastes foci* (FF) (astérisque). D'après Gross & Hunninghake, 2001¹³⁴

i. Fibroblastes résidents et fibrocytes

Les fibroblastes peuvent être assimilés à une forme quiescente de myofibroblastes. En effet, les myofibroblastes sont perçus comme une forme de fibroblastes actifs qui peuvent exercer

une fonction mécanique, migratoire, via l'expression de microfilaments d'actine des muscles lisses (α -SMA)¹²⁵. Initialement, les fibroblastes présentent un réseau de filaments extracellulaires peu organisés avec une faible quantité de fibronectine (composant essentiel de la MEC). Ces cellules font partie des premières concernées dans la mise en place d'un processus de cicatrisation car sous l'effet d'une tension mécanique, provoquée par une blessure, elles expriment d'avantage d'actine cytoplasmique et développent un réseau filamentaire avec des sites d'adhésion focale qui leur permet d'orienter la fibronectine et leurs filaments d'actine cytoplasmiques. De plus, ces proto-myofibroblastes, sont capables sous l'action du TGF- β 1 d'exprimer le variant ED-A fibronectine essentiel à la différenciation myofibroblastique, qui est caractérisée par l'expression d' α -SMA au sein de la cellule¹³² (Figure 14). Le TGF- β 1 a donc une place essentielle dans la production des myofibroblastes¹³³.

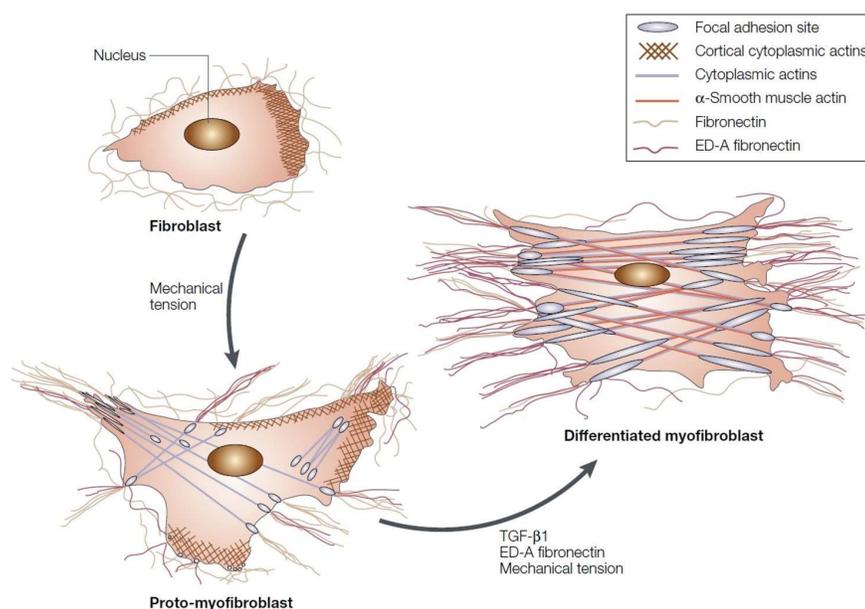
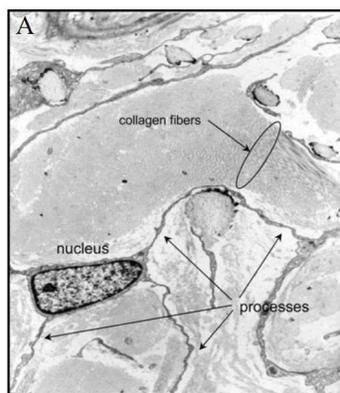


Figure 14 : Transition fibroblastique à myofibroblastique : Sous l'effet d'une tension mécanique (lésion tissulaire), le fibroblaste va initier sa différenciation myofibroblastique par un état proto-myofibroblastique. Cet état se caractérise par l'expression et l'organisation de filament d'actine cytoplasmique et de fibronectine extracellulaire. De plus, ces proto-myofibroblastes expriment l'ED-A fibronectine, un variant de la fibronectine, indispensable pour la différenciation myofibroblastique. Enfin, sous l'effet du TGF- β 1, la cellule exprime de l' α -smooth muscle actin (α -SMA), caractéristique d'un myofibroblaste différencié. Issue de Tomasek *et al.*, 2002¹³²

Les fibrocytes sont des cellules dérivées de la moelle osseuse, très proche des fibroblastes (*fibroblast-like cells*). Ces cellules ont été décrites pour la première fois en 1994 par Bucala *et al.*, comme une nouvelle sous-population leucocytaire impliquée dans la réparation tissulaire¹³⁴. Elles sont caractérisées par l'expression du cluster de différenciation (CD) commun à toutes les

cellules hématopoïétiques nucléées, à savoir CD45, et CD34 qui est un marqueur de cellules souches. Elles présentent également à leur surface CD14 et CD11 qui sont des marqueurs monocytaires. Enfin, elles produisent du collagène de type I (collagène I) de type III (collagène III) et de la vimentine, ce qui en font des cellules souches hématopoïétiques avec à la fois des caractéristiques monocytaires et fibroblastiques¹³⁵. Les fibrocytes sont donc des cellules souches capables de produire du collagène (Figure 15A et 15B)^{136,137}. Les fibrocytes se différencient en myofibroblastes sous l'effet du TGF- β 1 par une perte de l'expression de CD45 et de CD34 compensée par l'expression d' α -SMA et de CXCR4 (ou CD184), un récepteur membranaire de la protéine CXCL12^{137,138}. Dans une expérience menée sur un modèle de fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine chez la souris, Phillips *et al.*, (2004) ont été une des premières équipes à démontrer l'importance de la transformation des fibrocytes (cellules CD45+, collagène I+, CXCR4+) dans la fibrose pulmonaire. En effet, les souris traitées avec un anticorps spécifiques de CXCL12 présentaient un taux très faible de fibrocytes dans la moelle osseuse et dans les poumons, et étaient protégées du développement de la fibrose¹³⁹. Un niveau élevé de CXCL12 a également été retrouvé au niveau pulmonaire et sanguin chez des patients atteints de PID (vs patients non PID – donneurs de sang sains ou patients atteints de carcinome bronchique), et ce taux était corrélé au taux élevé de fibrocytes (CD45+, collagène I+, CXCR4+)¹⁴⁰. Les fibrocytes représentent une source importante et non négligeable de myofibroblastes^{136,137}.



Markers	Fibrocytes	Fibroblasts
CD11a	Present	Absent
CD134	Present	Present
CD45	Present	Absent
CXCR4	Present	Absent
Alpha smooth muscle actin	Present	Present
Col-1	Present	Present
CD90	Absent	Present
TE-7	Absent	Present
S100A8/A9	Present	Absent
Fibronectin	Absent	Present
Vimentin	Present	Present
FAP	Absent	Present

Figure 15 : Caractérisation des fibrocytes : A) Image (par microscopie électronique) d'un fibrocyte dans le derme d'un patient atteint de fibrose néphrogénique systémique (fibrose de la peau). Cette image montre la capacité de production de collagène par les fibrocytes. D'après Herzog and Bucala (2010)¹³⁵. B) Tableau comparatif d'expression des marqueurs des fibrocytes et les fibroblastes. Issue de Chong *et al.*, (2019)¹³⁷.

ii. Péricytes

Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses étroitement associées aux cellules endothéliales. Le ratio péricytes/cellules endothéliales est d'environ de un pour huit ¹⁴¹. Les péricytes ont été caractérisées pour la première fois en 1966 par Epling¹⁴² dans le poumon de bovins et de porc. Depuis, ces cellules ont été très largement étudiées et décrites comme impliquées dans divers maladies chroniques pulmonaires¹⁴³ et notamment dans la FPI¹⁴⁴. Du fait de leur association aux cellules endothéliales, il est difficile d'obtenir une caractérisation phénotypique claire de ces cellules. D'après plusieurs études menées ces 20 dernières années sur des péricytes pulmonaires humains, certains marqueurs semblent systématiquement exprimés¹⁴⁵. C'est le cas de l'antigène neural/glial 2 (NG2), une protéoglycane transmembranaire qui joue un rôle dans l'adhésion cellulaire à la MEC. Le récepteur au PDGF β (PDGF β R) a également été identifié comme un marqueur des péricytes et est utilisé pour leur caractérisation dans les poumons humains de patients atteints de FPI, tout comme NG2 d'ailleurs. D'autres marqueurs ont également été répertoriés telles que CD73 (une nucléotidase), CD90 (ou Thy1, connu comme étant un marqueur de fibroblaste) ou encore CD44 (un récepteur à l'acide hyaluronique)¹⁴⁵.

Tout comme les fibrocytes, ces cellules montrent des similarités avec les fibroblastes puisqu'elles expriment α -SMA, du collagène et d'autres protéines de la MEC en conditions profibrosantes¹⁴⁶. Dans une étude menée sur des souris traitées par bléomycine, Hannan *et al.*, (2020) ont montré une colocalisation d' α -SMA et des péricytes dans le tissu pulmonaire et que ces péricytes murins mis en culture exprimaient α -SMA. Les péricytes (Figure 16A) ont donc la capacité, en conditions pro-fibrosantes, de produire de l' α -SMA et du collagène. Leur morphologie au sein de la MEC est très proche de celle des myofibroblastes et l'existence à ce jour d'une transformation péricyte-myofibroblaste est acquise et implique également l'intervention du TGF- β 1¹⁴⁴. Enfin, l'expression de PDGFR- β a récemment été mis en évidence au sein de foyers fibroblastiques de patients atteint de FPI¹⁴⁷ (Figure 16B), renforçant l'implication des fibrocytes dans la fibrogenèse.

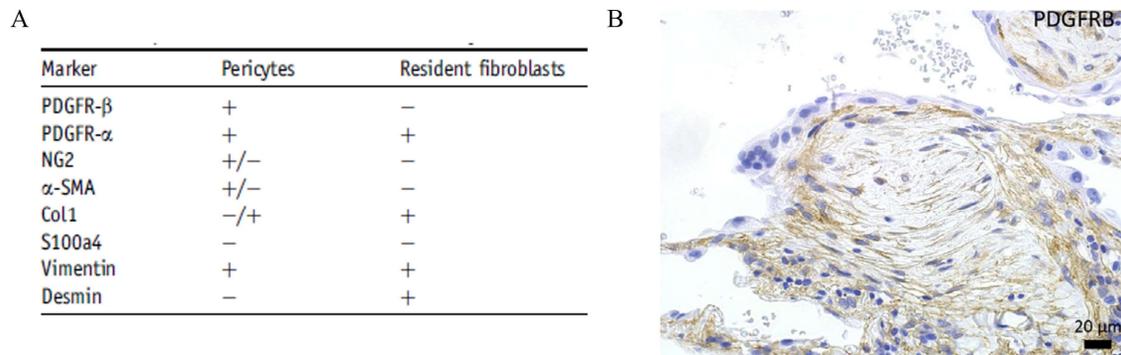


Figure 16 : Caractérisation des péricytes : A) Tableau comparatif d'expression des marqueurs des péricytes et des fibroblastes résidents. D'après Barron *et al.*, (2016)¹⁴⁶. B) Immunohistochimie de PDGFR-β au sein d'un foyer fibroblastique sur coupe de poumons d'un patient atteint de FPI. Issue Yamaguchi *et al.*, (2020)¹⁴⁷.

iii. Cellules épithéliales alvéolaires

A ce jour, la théorie la plus couramment admise concernant l'initiation du mécanisme de fibrogenèse est une altération répétée et chronique de l'épithélium pulmonaire^{57,60,148}. L'épithélium pulmonaire comprend les cellules épithéliales alvéolaires de type I et de type II (*type I/type II Alveolar Epithelial Cells* ou AEC I/II). On peut également les retrouver sous la dénomination pneumocytes I et II. Les AEC I couvrent plus de 90% de la surface alvéolaire du poumon, donc sont majoritaires par rapport aux AEC II, et possèdent une morphologie différente. Les AEC I peuvent atteindre 100μm de diamètre, mais sont assez fines, ce qui favorise les échanges gazeux. A l'inverse les AEC II sont des cellules larges, rondes et situées dans les alvéoles à proximité des cellules mésenchymateuses. Ces différences rendent les AEC I plus vulnérables aux lésions que les AEC II. Ces dernières peuvent dans certaines conditions servir de progéniteurs aux AEC I en migrant et en se multipliant afin de combler la brèche après une agression¹⁴⁹. Dans des conditions profibrosantes, les cellules épithéliales peuvent se différencier et exprimer les marqueurs de cellules mésenchymateuses tout comme des fibroblastes activés^{150,151}.

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ou *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT) est un processus de différenciation cellulaire qui définit la perte des caractères épithéliaux d'une cellule en faveur des caractères mésenchymateux. Ces changements phénotypiques de façon très générale sont impliqués dans 1) l'embryogenèse et le développement d'organes, 2) la régénération tissulaire et la fibrose d'organe et 3) la progression tumorale et la métastase de cellules cancéreuses¹⁵¹ (Figure 17).

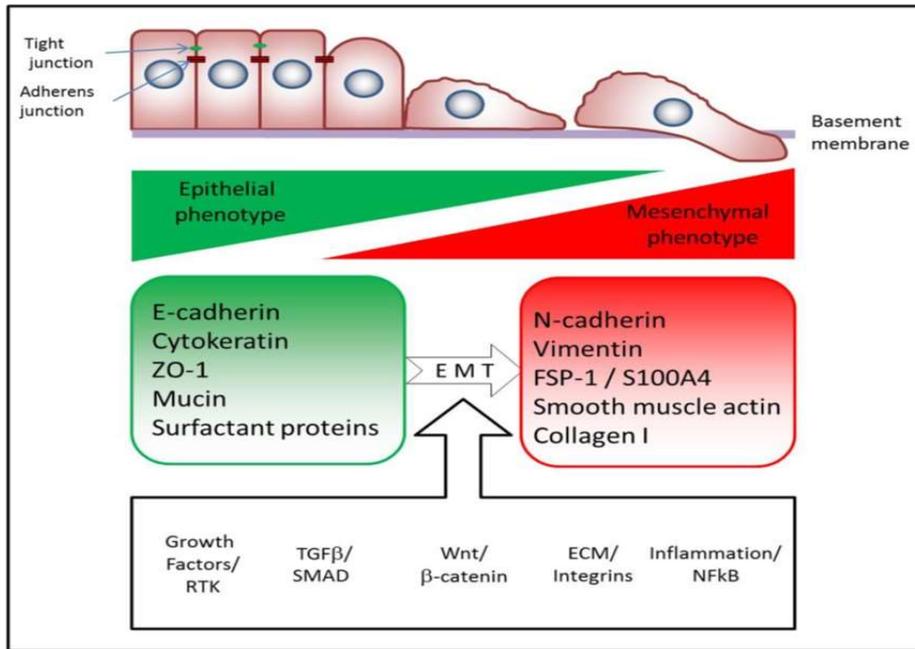


Figure 17 : Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : Il existe plusieurs inducteurs de la TEM telles que les facteurs de croissance (*Growth Factors*), la voie Wnt/ β -caténine, la voie des intégrines liées à la MEC (*ECM/integrins*), mais aussi l'inflammation via NF- κ B. La voie du TGF- β est un inducteur majeur de la TEM. Suite à cette induction, une reprogrammation génique complète est initiée grâce à divers facteurs de transcription qui induisent une dépoliarisation complète des cellules épithéliales avec destruction des jonctions serrées (*tight junction*) et des jonctions d'adhérence (*adherens junction*). Les cellules perdent progressivement leur caractère épithélial (diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine, les zonula occludens (ZO 1), les protéines du surfactant (*surfactant proteins*) etc..), en faveur de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, FSP-1 (*fibroblast-specific protein-1*) ou appelé également S100A4 qui est une protéine A4 qui fixe le calcium, l' α -SMA (*α -smooth muscle actin*) et le collagène. Ainsi, ces cellules épithéliales différenciées vont pouvoir envahir l'espace alvéolaire et alimenter d'avantage le pool de myofibroblastes. Issue Bartis *et al.*, (2013)¹⁵²

Il existe divers inducteurs de la TEM (*inducers*) mais les principaux font partie de la superfamille du TGF- β ^{151,152}. En réponse à ces inducteurs, les cellules épithéliales synthétisent un grand nombre de facteurs de transcription tels que Snail, Slug, ZEB-1 et -2 et Twist¹⁵³. Cette reprogrammation va entraîner la perte du caractère polaire des cellules épithéliales, une perte des jonctions intercellulaires du fait de la régulation négative des protéines de jonction telles que la zonula occludens (ZO-1) ou la E-cadhérine, et l'apparition de filaments intermédiaires (vimentine). La perte du caractère épithélial s'accompagne de la mise en place d'un phénotype mésenchymateux caractérisé par l'augmentation d'expression de N-Cadhérine et de MMP-2 et MMP-9, responsables de la dégradation de la lame basale, ce qui permet l'invasion cellulaire⁵⁶. Le remodelage du cytosquelette est initié par une augmentation d'expression et une réorganisation de la vimentine associée à l'augmentation de l'expression d' α -SMA, le

marqueur clé des myofibroblastes différenciés. Ces cellules mésenchymateuses acquièrent la capacité de synthèse de fibronectine et de collagène, deux composants essentiels de la MEC, de FSP-1 (*fibroblast-specific protein-1*) appelé aussi S100A4, d'intégrines, de cadhérine (N et OB) et également de micro-ARN (miRNA) spécifiques¹⁵⁴.

La TEM a très rapidement été associée au processus de fibrose, rénale initialement¹⁵⁵ puis pulmonaire¹⁵⁶. Pourtant son implication dans le développement de la fibrose est controversée¹⁵². En 2011, Rock *et al.*, ont suivi le devenir des AEC II dans un modèle murin transgénique de fibrose pulmonaire et n'ont pas réussi à mettre en évidence de différenciation des AEC II en myofibroblastes¹⁵⁷. Une étude récente a démontré que la TEM contribuait à augmenter indirectement la différenciation myofibroblastique via une signalisation paracrine des cellules épithéliales vers les fibroblastes résidents, ce qui pourrait contribuer à leur différenciation en myofibroblastes. Ce mécanisme impliquerait l'expression de ZEB1, qui semble surexprimée dans les cellules épithéliales proches de la MEC chez les patients atteints de FPI¹⁵⁸. A l'inverse, Degryse *et al.*, montrent dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par injections répétées de bléomycine que 50% des fibroblastes pulmonaires sont dérivés de cellules épithéliales¹⁵⁹. De même, un grand nombre de publications décrivent une transformation directe des cellules épithéliales en myofibroblastes, dans les processus de fibrogenèse^{152,155,160,161}.

iv. Les cellules mésothéliales

La plèvre est une membrane qui entoure les poumons et qui est connectée au parenchyme pulmonaire. Elle est constituée naturellement d'un tissu fibreux et de deux couches de cellules mésothéliales richement vascularisées, ce qui lui confère un rôle important dans la défense immunitaire des poumons¹⁶². Les cellules mésothéliales sont organisées en monocouche que l'on appelle le mésothélium. Elles sont liées entre elles par un ensemble de jonction serrées telles que les cadhérines (majoritairement N-cadhérine) mais aussi par ZO-1. Ces cellules présentent des caractéristiques à la fois épithéliales et mésenchymateuses¹⁶³. Parmi les marqueurs caractéristiques des cellules mésothéliales, on retrouve la protéine WT-1 (*Wilm's Tumor-1*)¹⁶⁴ et la calrétinine¹⁶⁵. Le point de départ pleural du développement de la fibrose pulmonaire¹⁶⁶ suggère le rôle primordial de la plèvre, et donc du mésothélium, dans l'initiation de la fibrose. Dans des biopsies pulmonaire de patients souffrant d'une fibrose pleurale (en conséquence d'une exposition à l'amiante) on retrouve une forte expression de TGF- β 1¹⁶⁷. *In vitro*, les cellules mésothéliales ont montré leur capacité à synthétiser du collagène en réponse

à une stimulation TGF- β 1¹⁶⁸. De plus, il a été démontré qu'une administration de TGF- β dans l'espace pleural résulte d'une fibrose pleurale chez le lapin et le mouton^{169,169}.

Ainsi, en 2007, l'équipe du Pr. Philippe Bonniaud a mis en évidence dans un modèle de fibrose pulmonaire pleurale, induite par administration d'un adénovirus TGF- β 1 (AdTGF- β 1) chez le rat, que les cellules mésothéliales subissent une transition myofibroblastique et migrent dans les régions sous-pleurales et progressivement dans le parenchyme pulmonaire (Figure 18)¹²⁷. Ceci a été confirmé par les mêmes auteurs en 2010 dans un modèle pleuropulmonaire murin induit par co-administration de bléomycine et de noir de carbone¹²⁸. Mubarak *et al.*, ont confirmé les travaux de notre équipe sur des biopsies pulmonaires de patients atteints de FPI. Ils montrent que les cellules qui expriment de la calrétinine se retrouvent au niveau des zones fibreuses parenchymateuses des patients¹⁶⁵.

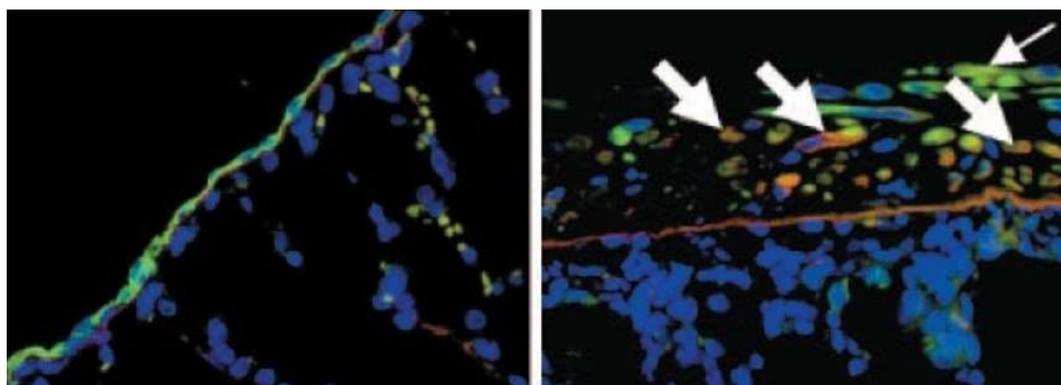


Figure 18 : Transformation myofibroblastique des cellules mésothéliales *in vivo* : Immunofluorescence de la section pleurale de poumons de rat 14 jours après l'administration intrapleurale d'un adénovirus vide (AdDL) (gauche) ou codant pour le TGF- β 1 (AdTGF- β 1) (droite). En vert : la cytokératine 18 marqueur du feuillet de cellules mésothéliales et en rouge, l' α -SMA non-exprimée après administration de l'AdDL mais coexprimée par les cellules mésothéliales dans la plèvre en conditions fibrosantes (flèches). Issue de Decologne *et al.*, (2007)¹²⁷.

v. *Autres cellules*

Les cellules endothéliales sous l'influence du TGF- β 1 sont aussi capables de transformation en cellules mésenchymateuses, ce qui est appelé l'endoMT (endothelial to Mesenchymal Transition)^{170,171}. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) dérivées de la moelle osseuse sont également une source probable de myofibroblastes dans les maladies fibrosantes¹⁷². Bien que ces deux types cellulaires aient démontré leur capacité à se différencier en myofibroblastes, leur implication dans la fibrogenèse reste encore mal comprise.

d) Le collagène

L'activation des myofibroblastes induit la production de matrice extracellulaire (MEC) et le remodelage tissulaire. Dans les tissus sains, la matrice extracellulaire interagit avec les cellules pour contrôler leur adhésion, leur prolifération, leur migration et leur survie. La MEC est décomposée essentiellement en 3 familles protéiques : les protéines fibreuses ou scléroprotéines, les protéoglycanes et les glycoprotéines¹⁷³. Les glycoprotéines sont des protéines qui sont associées à des chaînes polysaccharidiques. Les constituants majoritaires de cette famille sont la fibronectine et la laminine, mais elle contient aussi des ténascines et de la vitronectine. Ces glycoprotéines sont capables d'interagir avec les protéines fibreuses et sont essentielles aux interactions cellules-cellules¹⁷⁴. Les protéoglycanes sont composés d'un corps protéique et de longues chaînes de glycosaminoglycanes chargées négativement. Beaucoup de protéoglycanes ont été retrouvés dans les poumons telles que les fibulines, perlécane, versicane et la décorine qui sont capables de se lier au collagène¹⁷⁵. Enfin, les protéines fibreuses représentent les composants majeurs de la MEC et vont constituer la structure cellulaire et tissulaire. Le collagène et l'élastine sont les composants majeurs de cette famille. Dans les poumons, presque 50% de la MEC est composée uniquement de collagène. La fibrose peut être considérée comme le résultat d'une série de changements de la MEC et son rôle dans le développement de la fibrose pulmonaire est essentiel¹⁷⁶.

Le terme collagène est utilisé de manière générique pour définir une protéine formée d'une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques α ¹⁷⁷. Une chaîne α est constituée d'un enchaînement d'acide aminé (AA) de structure (Gly-X-Y)_n où Gly représente la glycine, où X et Y sont majoritairement des prolines plus ou moins hydroxylées et où n définit le nombre de répétitions de ce motif. Ces chaînes α s'associent pour former une triple-hélice, grâce à des liaisons covalentes formées par l'action de la *lysyl oxydase* (LOX)¹⁷³ (Figure 19).

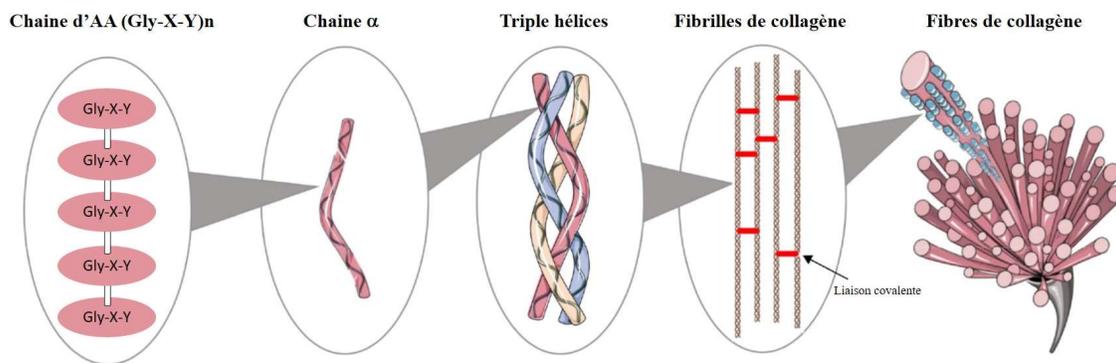


Figure 19 : Assemblage des structures de collagène : L'association d'un motif d'acide aminé (AA) Gly-X-Y va se répéter n fois afin de constituer la chaîne α . Ces chaînes vont ensuite s'homo- ou s'hétéro-trimériser afin de constituer la triple hélice de collagène. Une fibre de collagène (ou fibrille) résulte de l'assemblage de triple-hélices entre elles par l'intermédiaire de liaisons covalentes. Schéma modifié à partir de Liu *et al.*, (2021)¹⁷³

Aujourd'hui, on dénombre 28 formes supramoléculaires de collagène de longueur et de composition différentes (allant du collagène I au collagène XXVIII). Les trois chaînes α peuvent former un homotrimère (ex : collagène II) ou un hétérotrimère (ex. collagène IX). Les triple-hélices de collagène sont de nature rigide mais elles peuvent être flexibles du fait d'imperfections dans l'enchaînement des AA Gly-X-Y et d'interruptions dans l'assemblage de ces motifs¹⁷⁸. Les collagènes de types I, III et V sont majoritairement produits par les fibroblastes, ce qui en fait des collagènes essentiels pour la structure de la matrice interstitielle des organes. Le collagène de types IV lui est produit par les cellules épithéliales et majoritairement retrouvé dans la lame basale¹⁷⁹. Dès les années 1980, des médecins ont identifié que dans le poumon, les collagènes les plus représentés sont les collagènes de type I, III, IV et V. Lors d'une fibrose, le collagène de type I est augmenté tout comme le type III. De manière intéressante, le ratio collagène I/III est altéré et évolue en fonction du type de fibrose. En début de fibrose, caractérisé comme une fibrose lâche malgré l'augmentation de ces deux types de collagène, le ratio est inchangé. En revanche, la densification du tissu avec l'évolution de la fibrose pulmonaire s'accompagne d'une perturbation de ce ratio, ce qui se traduit par une augmentation importante du collagène de type I¹⁸⁰. Dans une étude menée en 2012, Leeming *et al.*, ont montré une augmentation de la présence de fragments de collagène dégradé par les MMPs dans le sérum de patients atteints de FPI. Ils ont identifié de manière significative l'augmentation de fragments de collagène de type I, III, V et VI¹⁸¹. Par la suite, l'étude clinique multicentrique PROFILE (*prospective observation of fibrosis in the lung clinical endpoints*) menée en 2015 par Jenkins *et al.*, est venue confirmer ses résultats en montrant une augmentation de fragments des collagènes I, III et VI dans le sérum de patients atteint de FPI,

et que ces derniers continuaient à accroître chez des patients avec une fibrose progressive en comparaison à une fibrose stable¹⁸². Plus récemment, *Herrera et al.*, (2019) ont localisé par immunohistochimie et reconstruction 3D des poumons, les collagènes I, III, IV, V et VI dans la MEC située en plein cœur des foyers fibroblastiques de poumons de patients atteints de FPI¹⁸³. Ainsi, tous ces collagènes représentent des cibles potentielles pour le design de nouvelles thérapies ou pour l'amélioration du diagnostic de la maladie. Désogère *et al.*, ont développé en 2017 une sonde radioactive, ⁶⁸Ga-CBP8, ciblant le collagène de type I pour sa mise en évidence par PET-scan (*Positron Emission Tomography-scanner*), méthode non-invasive d'imagerie d'évolution de fibrose pulmonaire chez l'Homme¹⁸⁴. Plus récemment, le collagène VI a aussi été décrit comme un biomarqueur potentiel de la fibrose pulmonaire chez l'Homme¹⁸⁵.

CHAPITRE II : La place des macrophages dans la FPI

Nous venons de voir qu'un grand nombre de cellules pulmonaires sont capables de se différencier en myofibroblastes. Cette transition myofibroblastique est un processus hautement régulé par l'environnement immunitaire du tissu pulmonaire. Neutrophiles, éosinophiles, ILC2 et macrophages sont capables de moduler cette transformation phénotypique des cellules pulmonaires, et ces effets passent par la production de cytokines et de médiateurs pro-fibrosants. Les macrophages sont les principales cellules immunitaires impliquées dans ces transformations cellulaires pathologiques, notamment du fait de leur capacité à synthétiser le médiateur pro-fibrosant principal, le TGF- β 1 (Figure 20). Dans ce chapitre, nous nous sommes concentrés sur la description des monocytes/macrophages pulmonaires et leurs fonctions, pour mieux comprendre leurs rôles dans le développement de la fibrose pulmonaire.

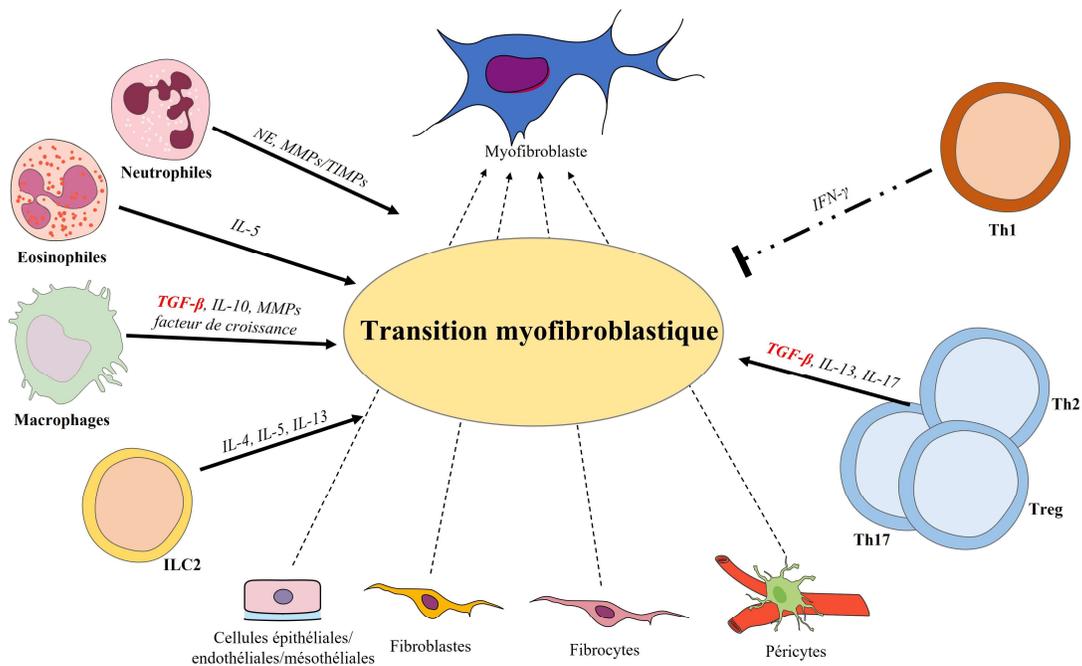


Figure 20 : La transformation myofibroblastique est modulée par les cellules immunitaires : Les cellules épithéliales alvéolaires, les fibroblastes, les fibrocytes et les péricytes sont à l'origine de l'apparition des myofibroblastes. Ces transformations sont étroitement liées aux effets des cytokines libérées par les cellules du système immunitaire. Les macrophages représentent une source importante de cytokines et de médiateurs pro-fibrosants, dont le TGF- β 1. Les flèches en pointillées représentent une inhibition de la transition myofibroblastique à l'inverse des flèches pleines, qui représentent les voies d'activation directes/ou indirectes.

I. Monocytes

Les monocytes sont des leucocytes de la famille des phagocytes mononuclés. Ce sont des cellules circulantes qui se localisent principalement dans le sang, la moelle osseuse et peuvent être mises en réserve dans la rate. En cas d'infection, ces cellules circulantes migrent dans l'organe concerné et se différencient en cellules phagocytaires opérationnelles que sont les macrophages et les cellules dendritiques. Les monocytes sont des cellules hématopoïétiques issues de la lignée myéloïde ; elles expriment à leur surface CD45 et CD11b. Les monocytes dérivent de cellules myéloïdes progénitrices qui acquièrent, sous l'influence d'un remaniement génétique, le récepteur CD115, plus connu sous le nom de M-CSFR (*Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor*) ou CSFR1 (*Colony-Stimulating Factor 1*). C'est un récepteur clé pour le développement des monocytes, puisqu'il permet l'action du M-CSF, facteur de croissance indispensable au développement et à la prolifération des monocytes¹⁸⁶.

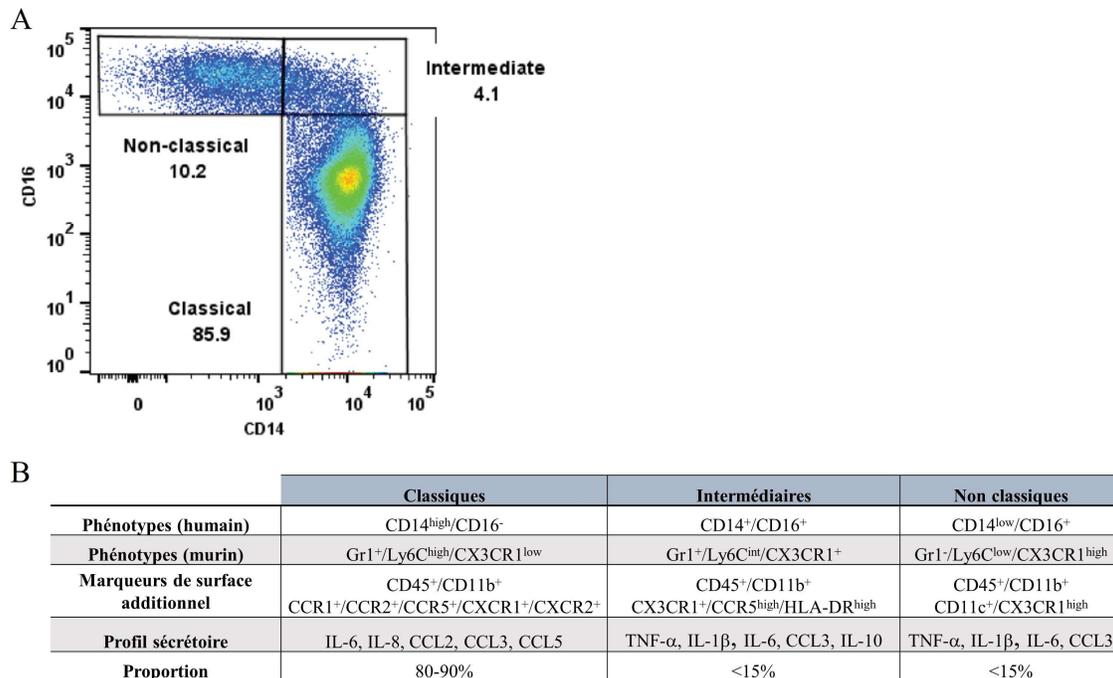


Figure 21 : Les sous-types majoritaires de monocytes : A) Exemple d'analyse cytométrique des sous-types de monocytes issus de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) humains, basée sur l'expression de CD14 et de CD16. Issue de Lee *et al.*, (2017)¹⁸⁷. B) Liste non exhaustive des caractéristiques phénotypiques, et sécrétoires et proportions des 3 grandes sous-catégories de monocytes^{188,189}.

De manière générale, les monocytes se scindent en trois sous-populations (Figure 21) de monocytes dit classiques, intermédiaires et non-classiques¹⁹⁰. Ces sous-populations se différencient par leur profil phénotypique et sécrétoire mais peuvent également être discriminés

par leur profil transcriptomique¹⁹¹. Les monocytes classiques humains sont définis par une forte expression de CD14 à leur surface et l'absence de CD16 (CD14^{high}/CD16⁻). Cette sous-population est définie chez la souris par un profil Gr1⁺, Ly6C^{high} et Cx3CR1^{low}¹⁸⁶. Les monocytes classiques sont rapidement recrutés sur le lieu de l'infection, du fait de l'expression membranaire d'un grand nombre de récepteurs aux chimiokines comme CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 et CXCR2¹⁹². Une fois activé, ces monocytes sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 et CCL5. Les monocytes intermédiaires quant à eux se définissent par l'expression membranaire de CD14 et de CD16 (CD14⁺/CD16⁺) et semblent avoir une capacité de présentation d'antigène plus importante que les autres sous-types de monocytes¹⁸⁷. Ils se distinguent des monocytes classiques par une expression plus forte de CCR5. Leur rôle est encore peu connu mais ces cellules ont la capacité de sécréter à la fois des médiateurs pro- et anti-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL3 et IL-10¹⁹³. Enfin, les monocytes non classiques sont définis par une expression faible ou intermédiaire de CD14 et une expression forte de CD16 (CD14^{low}/CD16⁺). A l'inverse des monocytes classiques, ces monocytes sont étroitement associés au processus de cicatrisation et de réparation tissulaire. En effet, ils sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires que les monocytes classiques et favorisent le recrutement et l'activation des neutrophiles. A ce jour, la relation entre ces différents sous-types de monocytes n'est pas claire. On ne sait pas si un monocyte classique devient intermédiaire puis non-classique ou si ces sous-populations à part sont indépendantes¹⁹⁰.

Le rôle des monocytes dans le développement de la FPI est associé à leur capacité à se différencier en macrophages, qui sont des acteurs majeurs du processus de fibrose^{190,194,195}.

II. Les Macrophages

Les macrophages sont des cellules immunitaires appartenant à la lignée myéloïde. Ce sont des cellules phagocytaires présentes dans de nombreux organes. On distingue les macrophages résidents d'un tissu TRM (*Tissue-Resident Macrophages*) de ceux qui dérivent de monocytes MoM (*Monocytes-Derived Macrophages*) appelés aussi RM-DM (*Recruited Monocytes-Derived Macrophages*) (Figure 22). Les TRM ont une vie très longue (mois-années) et sont capables d'auto-renouvellement ce qui participe au maintien du pool homéostatique de macrophages dans chaque organe. Ce pool est en grande partie constitué lors de la vie fœtale et dérive de cellules souches hématopoïétiques (CSH) issues du sac vitellin et du foie fœtal¹⁸⁶. A l'inverse, les MoM apparaissent suite à une lésion, une infection. Ils ont une vie plutôt courte,

au contraire des TRM, et dérivent uniquement des monocytes^{186,195}. Dans certains organes comme l'intestin par exemple, les MoM peuvent contribuer à maintenir le pool de TRM¹⁹⁶.

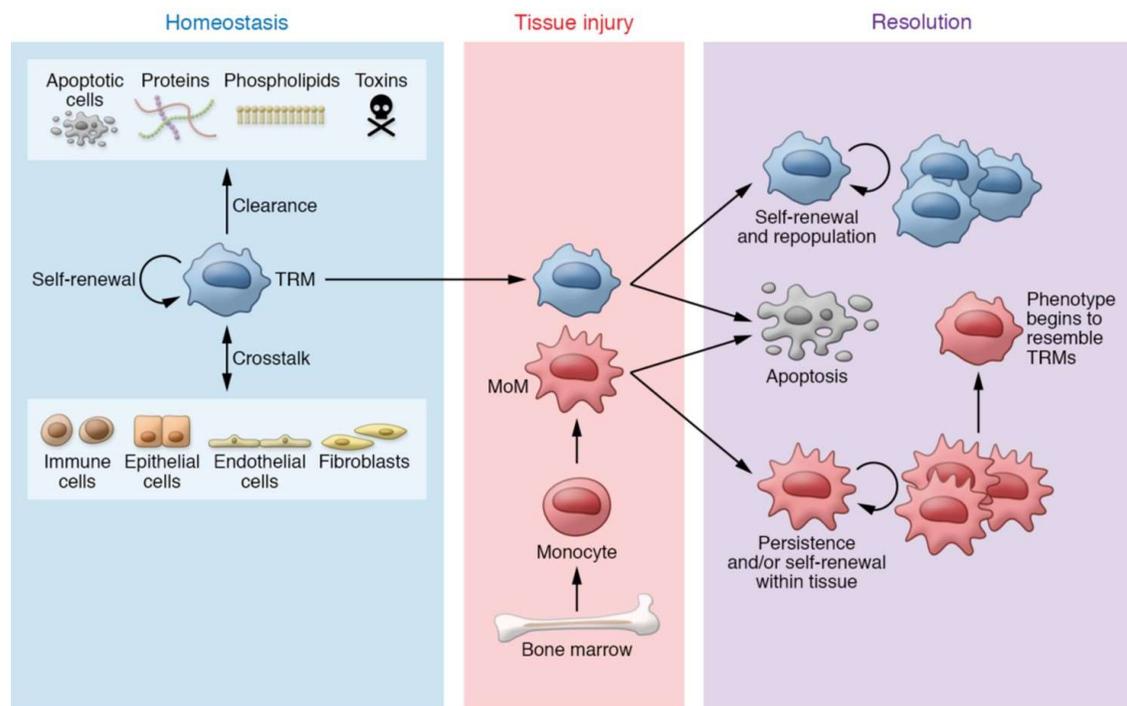


Figure 22 : Macrophages résidents (TRM) et dérivant de monocytes (MoM) : Les TRM, issus du développement fœtal, vont assurer la clairance des corps apoptotiques, de protéines, de phospholipides et de toxines qui pourraient perturber l'homéostasie tissulaire (à gauche). Ces macrophages sont aussi capables d'interagir avec les cellules environnantes et ainsi jouer le rôle de senseur environnemental pour les autres cellules. Le pool de TRM est essentiellement constitué lors du développement fœtal et se maintient par auto-renouvellement. Lors d'une blessure ou d'une infection (au milieu), les monocytes circulants migrent sur le lieu de l'infection et se différencient en macrophages (MoM). Ces macrophages issus de la moelle osseuse assurent la défense de l'hôte et induisent une réponse inflammatoire plus robuste. La résolution de l'inflammation (à droite) se manifeste par l'apoptose des TRM et des MoM impliqués dans la réaction inflammatoire. Les TRM vont de nouveau coloniser le tissu par auto-renouvellement. Dans certaines conditions et localisations, les MoM peuvent acquérir une capacité d'auto-renouvellement avec un phénotype très proche de celui des TRM. Issue de Watanabe *et al.*, (2019)¹⁹⁵

Le poumon est un organe constamment agressé par l'environnement extérieur. Avec 80% de macrophages parmi les cellules immunitaires dans les poumons, ceux-ci apparaissent comme les premiers acteurs de la défense de l'hôte contre les pathogènes extérieurs et sont donc essentiels au maintien de l'homéostasie de cet organe¹⁹⁷. Au sein du poumon, on retrouve principalement deux types de macrophages. Cette dichotomie fait référence à leur localisation tissulaire avec des macrophages alvéolaires (*Alveolar Macrophages* ou AMs), et les macrophages interstitiaux (*Interstitial Macrophages* ou IMs)¹⁹⁸. Il est important de noter que cette classification fait référence uniquement aux macrophages pulmonaires alors que celle énoncée plus haut est valable pour l'ensemble des macrophages d'un organisme. Ceci rajoute

une complexité dans l'ontogénie et la compréhension de la fonction des macrophages pulmonaires. (Figure 23).

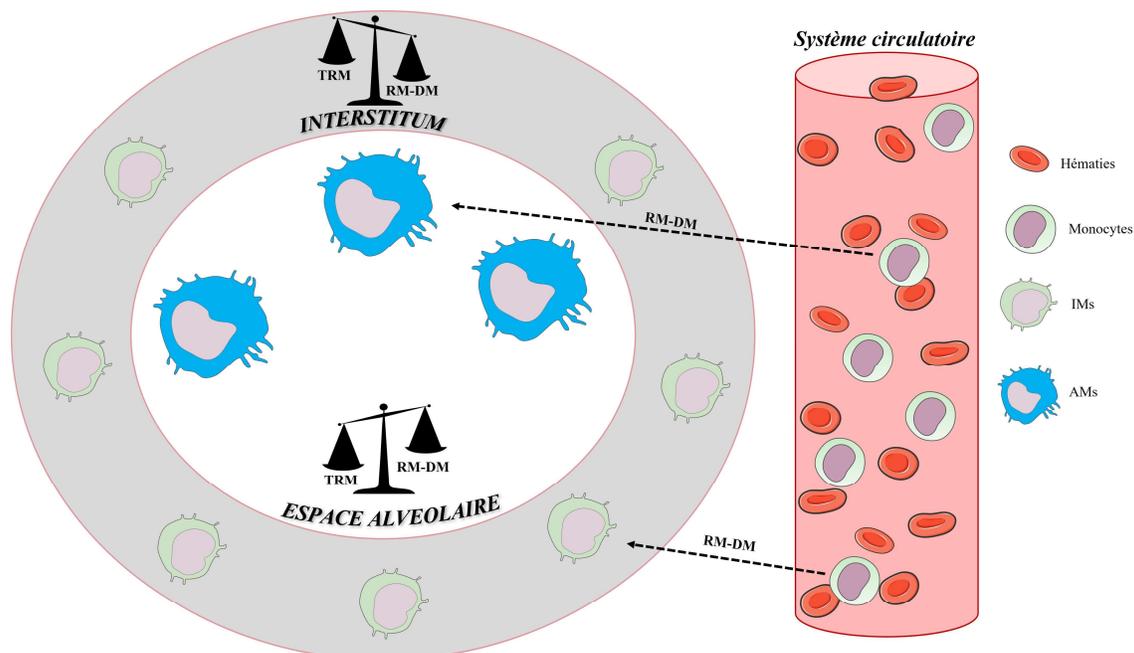


Figure 23 : Ontogénie et localisation schématique des macrophages pulmonaires : L'interstitium (en gris) borde l'espace alvéolaire (en blanc). Les macrophages alvéolaires (AMs, en bleu) résident dans les alvéoles pulmonaires à l'inverse des macrophages interstitiaux (IMs, en vert) qui se trouvent dans l'interstitium pulmonaire. Les AMs sont principalement des macrophages résidents (TRM) au contraire des IMs qui semblent être majoritairement dérivés de monocytes circulants (RM-DM ou MoM).

a) Les Macrophages Alvéolaires (AMs)

Les macrophages alvéolaires sont les premières cellules du poumon exposées aux contaminants extérieurs. Aujourd'hui, il est largement admis que les AMs sont des cellules résidentes du poumon et qu'elles le colonisent lors du développement fœtal et de la première semaine de vie¹⁹⁹. Les AMs sont donc, en conditions physiologiques, des TRM (ou TR-AMs pour *Tissue Resident-Alveolar Macrophages*), ils acquièrent une capacité de renouvellement importante ce qui leur confèrent une longue durée de vie. Ces cellules permettent d'assurer l'homéostasie pulmonaire et la protection de l'hôte contre des pathogènes¹⁹⁵. Les AMs peuvent aussi être issus des monocytes (RM-DM ou Mo-AMs pour *Monocyte-derived Alveolar Macrophages*), au cours de la vie, lors d'un phénomène inflammatoire et être ainsi à l'origine de pathologies telle que la fibrose pulmonaire¹⁹⁴. Les AMs sont également une population de macrophages qui a strictement besoins de GM-CSF lors de son développement²⁰⁰, à l'inverse

du développement des macrophages par les monocytes qui est dépendant du M-CSF. En revanche, les AMs matures ont besoins de M-CSF pour leur survie²⁰¹. En condition de lésion pulmonaire aiguë, modélisée sur des souris par des infections bactériennes (LPS) ou virales (*herpes virus*), le pool de TR-AMs est remplacé par des RM-DM qui acquièrent une capacité d'auto-renouvellement^{202,203}. Ce même phénomène a été observé sur un modèle de fibrose induite à la bléomycine^{194,204}.

En condition physiologique, les TR-AMs expriment un grand nombre de marqueurs macrophagiques communs comme MerTK (*Myeloid-epithelial-reproductive Tyrosine Kinase*), CD64, CD68 et F4/80²⁰¹. En revanche, les caractéristiques phénotypiques qui différencient les TR-AMs des autres macrophages sont une absence d'expression de CD11b et de Cx3CR1 et la présence de CD11c et de Siglec-F à leur surface^{199,201}. Cette différence pourrait être expliquée par le développement des AMs de manière GM-CSF dépendante¹⁹⁹, à l'inverse de la grande majorité des macrophages qui sont issus d'une maturation M-CSF. Les AMs se caractérisent également par une forte expression de CD206 et de CD169¹⁹⁷ ainsi que de CD163 et MARCO (Récepteurs des macrophages avec une structure collagène)²⁰¹. Concernant les RM-DM, elles possèdent un phénotype différent des TR-AMs. Elles sont caractérisées par Misharin et al, en 2017 dans le tissu pulmonaire de souris traitées par bléomycine. Ces macrophages alvéolaires expriment plus faiblement Siglec-F, en comparaison au TR-AMs, et fortement CD11b, CD11c, CD64 et CD14²⁰⁴ ¹⁹⁴. Mould *et al.*, (2017) confirment dans un autre modèle induisant le recrutement de RM-DM (modèle infectieux par injection de LPS) que ces macrophages perdent l'expression de CD11c aux dépens de CD11b²⁰². De plus ces deux études montrent également une différence transcriptomique entre les TR-AMs et les RM-DMs ce qui suggère une fonction différente^{194,202}. En effet Mould *et al.*, montrent que les RM-DMs produisent plus d'IL-6, d'IL-1 β , d'IL-12, d'IL-10, de TNF- α et de kératinocytes en réponse au LPS²⁰² que les TR-AMs.

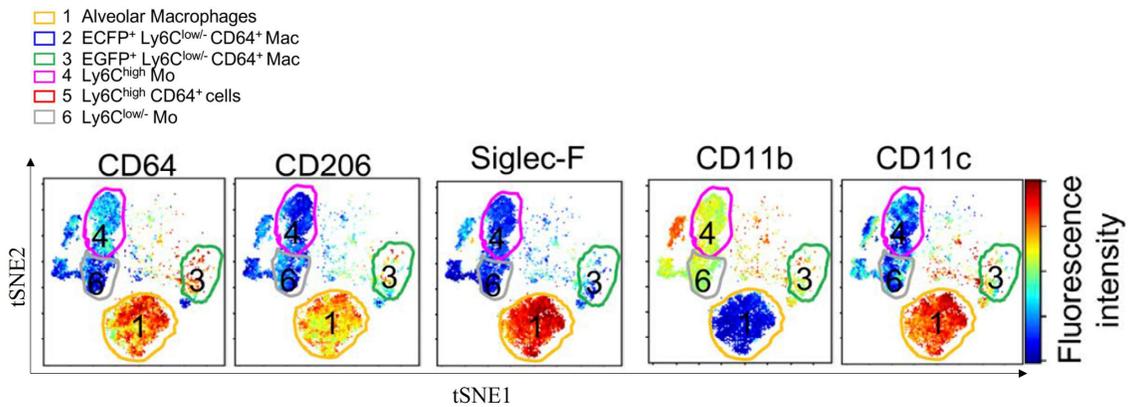


Figure 24 : Principaux marqueurs des macrophages alvéolaires : Analyse tSNE (*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) non-supervisée bi-dimensionnelle de cellules myéloïdes de poumon de souris. Population 1 = macrophages alvéolaires. Les autres populations représentent les sous-population de monocytes (Mo) ou d'autres macrophages pulmonaires (Mac). Nous pouvons observer que les AMs expriment fortement CD64, Siglec-F et CD11c avec une absence totale de CD11b. De plus, les AMs représentent la population majoritaire des cellules myéloïdes qui expriment CD206. Issue de Loyher *et al.*, (2018)²⁰⁵.

b) Les Macrophages Interstitiaux (IMs)

Cette population de macrophages est la moins étudiée et documentée du fait de la difficulté de les identifier précisément. En effet, les IMs se situent entre l'épithélium pulmonaire et les capillaires, et leur isolement nécessite une digestion du tissu pulmonaire, qui s'accompagne d'une contamination par un grand nombre de macrophages alvéolaires présents dans les LBA^{206,207}. En 1988, Dethloff & Lehnert semblent être les premiers à avoir isolé des « macrophages interstitiaux pulmonaires » de rat, par l'intermédiaire d'une technique d'affinité basée sur des récepteurs Fc gamma couplée avec une analyse en cytométrie en flux. Ils caractérisent ces cellules isolées comme étant différentes des monocytes sanguins et des macrophages alvéolaires mais se rapprochant plus des monocytes suggérant ainsi que les IMs pourraient être une population de précurseurs des AMs²⁰⁸. En 2016, Tan & Krasnow ont décrit une origine « primitive », apparaissant dès E10.5 (jour embryonnaire) lors du développement embryonnaire de souris, et « définitive » dérivant elle de la moelle osseuse qui infiltre rapidement l'interstitium après la naissance et qui sera maintenue par les progéniteurs circulants²⁰⁷. En 2017, Gibbings *et al.*, montrent que les IMs ont un niveau d'auto-renouvellement faible et lent puisque chez la souris, le pool est reconstitué à partir des cellules dérivées de la moelle osseuse, 5 semaines après l'irradiation des poumons²⁰⁹. Néanmoins, l'ontogénie des IMs reste encore mal comprise et il n'existe pas un consensus clair sur le phénotype et l'existence même d'une population de macrophages interstitiaux. Dans une revue écrite par Liegeois *et al.*, (2018), les auteurs rapportent deux études qui suggèrent une autre

nomenclature pour ces macrophages, appelés alors macrophages exsudatifs et qu'ils décrivent comme étant des macrophages non-alvéolaires CD11b⁺. En effet, cette population de macrophages situés dans l'interstitium pulmonaire exprime Ly6C, CD11b et présentent une dépendance partielle à CCR2 (récepteur de CCL-2, chémokine indispensable pour la chimio-attraction des monocytes sur le lieu de l'inflammation). Ceci suggère qu'il s'agit d'une population inflammatoire, infiltrante issus des monocytes²¹⁰. Néanmoins, il existe de plus en plus de marqueurs discriminant ces différentes populations. A nouveau, les travaux de Gibbings *et al.*, en 2017 ont largement contribué à cette amélioration. Dans cette étude qui consiste à étudier les macrophages interstitiaux chez des souris C57Bl/6 saines, ces auteurs évaluent à environ 10% le niveau d'IMs dans le poumon (contre 75% pour les AMs). Ils observent une forme/granulosité différente entre monocyte/IMs/AMs (Figure 25A) et décrivent que ces trois types cellulaires expriment CD64 (marqueur fort des monocytes/macrophages). Les AMs sont donc définis comme de grosses cellules granuleuses (SSC^{high} pour *Side Scatter*). Les IMs sont des cellules plus petites mais toujours plus granuleuses et plus grosses que les monocytes. Suite à cette analyse cytométrique, les auteurs ont défini trois sous-groupes d'IMs (IM1, IM2 et IM3) qui se différencient principalement par des différences d'expression de CD206, CMH-II et CD11c (table 2). Les IM3 se démarquent des deux autres populations par la co-expression de CD11b, CD11c et de CD206 à leur surface. Enfin, les IM1 expriment faiblement le CMH-II à l'inverse des IM2 et IM3²⁰⁹. De manière générale, les IMs possèdent les marqueurs classiques des macrophages (MerTk, CD64, CD68, F4/80). Dans la figure 25B, nous pouvons observer sur une coupe de poumon de souris la différence de compartimentation des IMs et des AMs²⁰⁹. Pour rappel, Cx3CR1 est un récepteur présent sur les monocytes et qui est exprimé par les IMs mais non par les AMs.

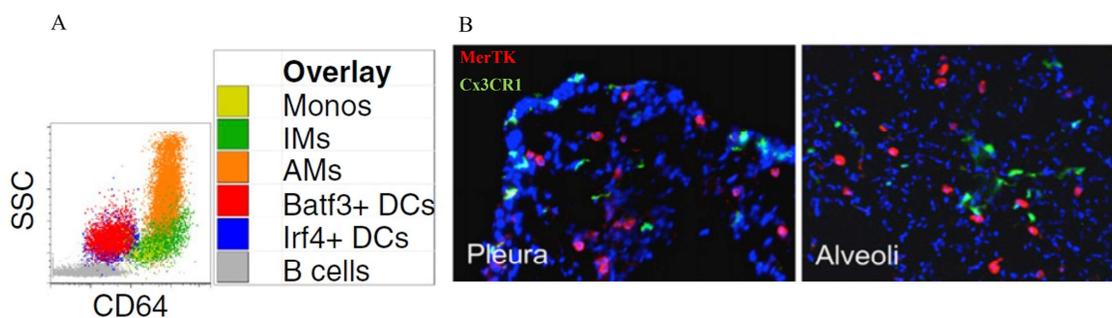


Figure 25 : Différences de morphologie et de localisation entre les AMs et les IMs : A) Analyse cytométrique de la forme/granulosité (SSC) des macrophages pulmonaires (monocytes, IMs et AMs) en fonction de l'expression de CD64. B) Localisation des IMs et des AMs observée par immunofluorescence sur une coupe de poumon de souris saine. MerTK (rouge) marque l'ensemble des macrophages et Cx3CR1 (vert) uniquement les IMs et/ou monocytes. Nous pouvons observer une localisation préférentielle des IMs au niveau de la plèvre. Issue de Gibbings *et al.*, (2017)²⁰⁹

Parallèlement à cette étude, Schyns *et al.*, décrivent deux sous-type d'IMs dans le poumon qui se distinguent principalement par leur niveau d'expression de CD206. Les auteurs montrent d'un point de vue transcriptomique, que la population d'IMs positive pour CD206 (CD206⁺ IM) est très proche des IM1/IM2. A l'inverse, les IMs qui n'expriment pas CD206 (CD206⁻ IM) s'apparentent d'avantage aux IM3. De plus, ils relèvent que les CD206⁻ IM expriment plus de Cx3CR1 et de CMH-II que les CD206⁺ IM. En revanche, ils confirment de précédentes études en montrant que les CD206⁺ IM expriment de l'IL-10 et montrent une capacité d'auto-renouvellement à l'inverse des CD206⁻ IM. Leur travail a pu confirmer leur hypothèse selon laquelle les IM adultes sont progressivement et lentement remplacés par les monocytes circulants²¹¹. Cette hypothèse vient asseoir les résultats de Gibbings *et al.*, qui montraient que d'un point de vue transcriptomique, les IM et les monocytes sont proches (Figure 26A). De plus, les IMs semblent exprimer d'avantage des marqueurs pro-inflammatoires que les AMs (Figure 26B)²⁰⁹. Néanmoins, ces résultats sont issus d'analyses transcriptomiques et non phénotypiques. Le fait qu'un gène ne soit pas détecté comme actif par cette analyse ne signifie pas que la cellule ne l'exprime pas à sa surface. C'est le cas du CD163 pour les AMs non détectés en transcriptomique alors que ce marqueur est connu pour être exprimé par les AMs²⁰¹.

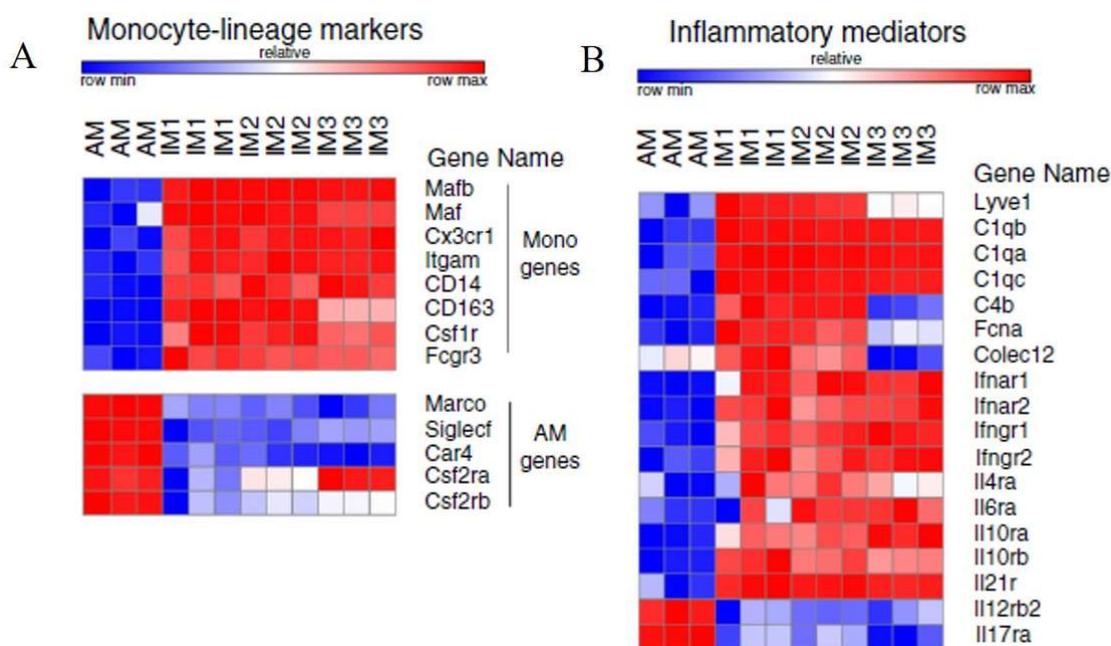


Figure 26 : Analyse transcriptomique des AMs et IMs : A) Heat-map représentative de l'activité des gènes marqueurs monocytaires des cellules AM, IM1, IM2 et IM3. Les IMs expriment davantage de gènes communs aux monocytes que les AMs. B) Heat-map représentative de l'activité des gènes pro-inflammatoires des cellules AM, IM1, IM2 et IM3. Les IMs expriment plus de marqueurs pro-inflammatoires que les AMs. Issue de Gibbings *et al.*, (2017)

Ainsi, nous pouvons voir que la caractérisation des IMs est encore très controversée. Les nomenclatures des IMs dépendent des auteurs sans qu'un consensus semble vouloir émerger. Les IMs sont-ils une population distincte des RM-DM avec une fonction totalement différente ? Ou bien ne sont-elles que des vestiges de l'infiltration monocytaire ? Est-ce une population de réserve située dans l'interstitium afin d'infiltrer plus rapidement l'espace alvéolaire lors d'un challenge ? En d'autres termes, les IMs ne sont-elles pas seulement une population de transition entre les monocytes et les AMs ?

	TR-AMs	RM-DM	IM1	IM2	IM3
CD45	+	+	+	+	+
MerTK	+	+	+	+	+
F4/80	+	+	+	+	+
CD64	+	+	+	+	+
CD68	+	+	ND	ND	ND
Cx3CR1	-	+/-	high	high	high
Siglec-F	+	low	-	-	-
CD11b	-	+	+	+	+
CD11c	+	+/-	-	-	+
CD206	high	ND	+	+	-
CD169	high	ND	+	+	-
CD163	high	ND	ND	ND	ND
CD14	-	+	+	+	+
CMH-II	+/-	ND	-	+	+
Lyve1	-	ND	+	+/-	-

Tableau 1 : Marqueurs de surface des macrophages alvéolaires (AMs) et interstitiaux (IMs) chez la souris : TR-AMs (*Tissue Resident-Alveolar Macrophages*), RM-DM (*Recruited Monocytes-Derived Macrophages*). Low : expression faible, high, expression forte, +/- : expression intermédiaire ou faible, ND : non défini

c) Le paradigme M1-M2

Les macrophages sont des cellules dynamiques qui connaissent une grande plasticité et adaptabilité à leur environnement cellulaire, et comme pour les lymphocytes T *helper* (Th), une classification a été établie en fonction de leur profil transcriptomique, sécrétoire et phénotypique. L'immunité de type I est une réponse protectrice qui va impliquer principalement les Th1 avec leur capacité à sécréter de l'IFN- γ . A l'inverse, l'immunité de type II est plutôt associée à la résolution de l'inflammation faisant intervenir les Th2 qui sécrètent de l'IL-4, IL-10 et IL-13²¹². Tout comme les lymphocytes Th, dans un environnement inflammatoire, les macrophages s'activent et acquièrent un phénotype et une fonction pro-inflammatoire. On dit qu'ils suivent une activation classique de type I (M1). A l'inverse, en réponse à un

environnement suppressif, les macrophages acquièrent ainsi un phénotype et une fonction plutôt anti-inflammatoire (résolutif de l'inflammation). On dit qu'ils suivent une activation alternative de type II (M2)²¹³. Les M1 produisent d'avantage d'oxyde nitrique (NO) après une stimulation au lipopolysaccharide (LPS) que les M2, qui eux, vont plutôt augmenter le métabolisme de l'arginine²¹⁴. En revanche, il faut voir cette polarisation comme un continuum ou M1/M2 correspondent aux deux extrémités. En effet, depuis cette classification M1/M2, le spectre s'est élargi et d'autres sous-catégories sont apparues. A ce jour, on dénombre les M1, M2a, M2b, M2c et M2d qui se définissent en fonction de leur signal d'activation, de leur phénotype réceptorielle et sécrétoire et donc, de leurs fonctions biologiques (Figure 27)²¹⁵.

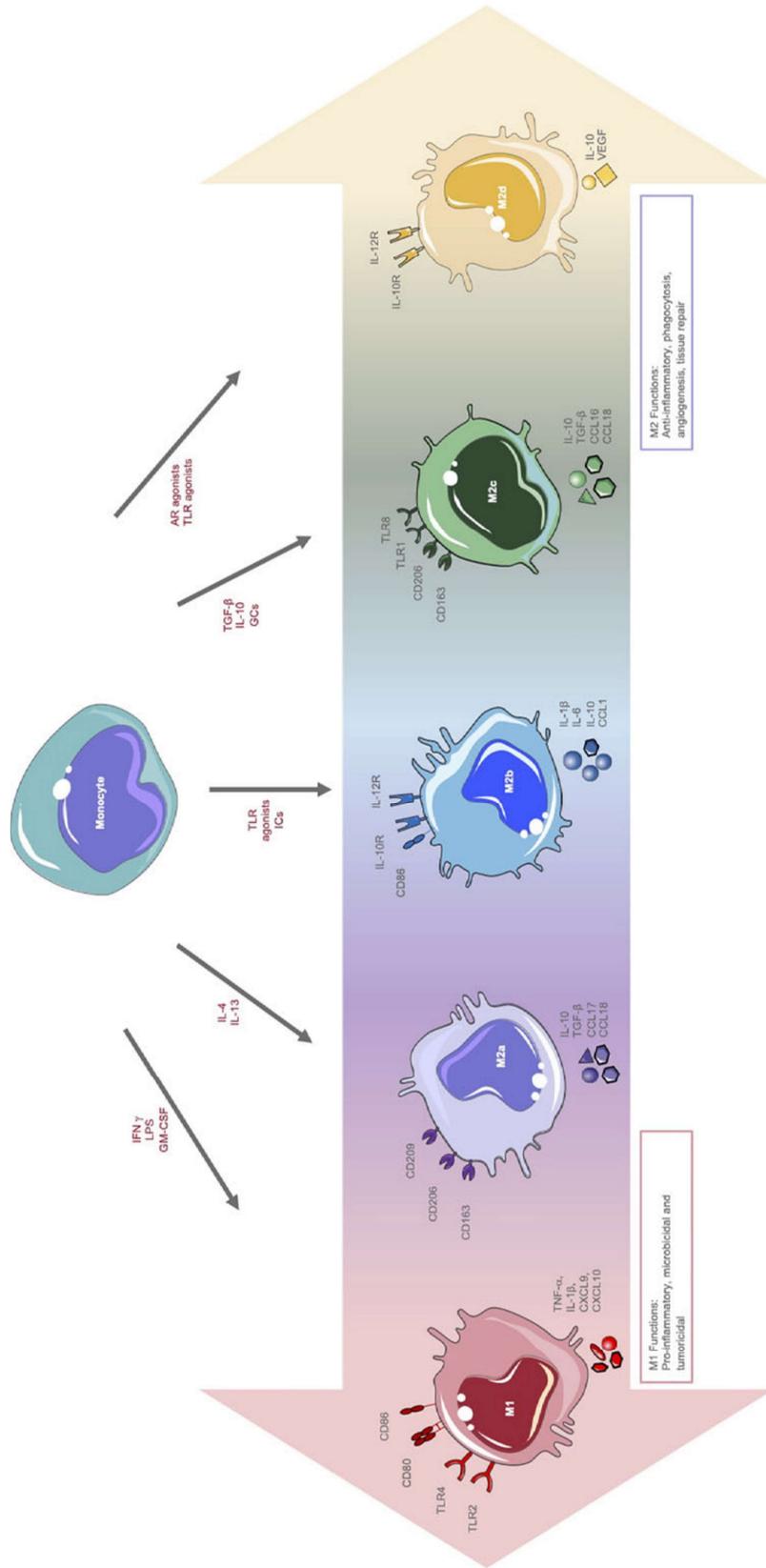


Figure 27 : Schéma descriptif des différentes sous-populations de macrophages : Représentation schématique des voies d'activation monocytaire, des médiateurs impliqués et des populations macrophagiques qui en résultent. Les populations sont caractérisées par l'expression de leurs récepteurs membranaires et la nature des médiateurs qu'ils libèrent. La fonction biologique de chaque sous-groupe est intimement liée à son activation. A ce jour, il existe 5 sous-types de macrophages : le type I (M1) (pro-inflammatoires et qui confère une défense antibactérienne à l'hôte) et le type 2 (M2) (anti-inflammatoires, impliqués dans le cancer, l'angiogenèse et la réparation tissulaire) incluant les M2a, M2b, M2c et M2d. *issu de Chamber et al., (2020)*¹⁵

L'IFN- γ représente la cytokine majeure d'activation des M1. Elle induit une signalisation JAK1/JAK2 (*Janus Kinase*), STAT1/STAT2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) qui implique des facteurs de transcription de la famille des IRFs (*Interferon Regulatory Factors*). De plus, les macrophages expriment à leur surface des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour *Pattern Recognition Receptor*) de la famille des TLR (*Toll Like Receptor*) comme TLR4 et TLR2. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des motifs bactériens tel que le LPS ou des lipopeptides bactériens²¹⁶ qui déclenchent une signalisation complexe, médiée par MyD88, capable de solliciter beaucoup de facteurs de transcription tels que NF- κ B, IRFs, STAT5 et AP-1 (*Activator Protein-1*) et ainsi induire une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et une balance IL-12/IL-10 largement en faveur de l'IL-12. Les M1 expriment également des chimiokines (CCL2, CXCL9 et CXCL10) ainsi que des molécules présentatrices d'antigène comme des CMH et les récepteurs de co-stimulation CD80/86^{217,218}. De plus, le GM-CSF est également connu pour être un activateur des M1. Cette cytokine est sécrétée par de nombreuses cellules, dont les macrophages eux-mêmes, et va induire une signalisation proche de celle de l'IFN- γ et du LPS. En effet, le point commun dans l'ensemble de ces stimuli est l'implication de facteurs appartenant à la famille des IRFs, famille qui régule de manière générale la transcription des interférons. De plus, le GM-CSF et le LPS impliquent tous les deux une signalisation NF- κ B²¹⁸.

La signalisation des macrophages de type II dépend de leur sous-type et donc de l'environnement d'activation²¹⁵. Elle a pour conséquence de réduire la phagocytose et l'activité pro-inflammatoire en général des macrophages. D'une manière globale, le M-CSF est un facteur complètement opposé au GM-CSF et exerce des effets plutôt anti-inflammatoires²¹⁹. L'activation alternative (M2a) est induite par une stimulation IL-4 et/ou IL-13 qui sont des cytokines majoritairement produites par les cellules liées à l'immunité de type II, c'est-à-dire, les Th2, les éosinophiles, basophiles et également par les macrophages eux-mêmes. Cette signalisation va impliquer les protéines adaptatrices JAK1/JAK3 et une signalisation STAT6²¹⁸. Les M2a produisent un haut niveau d'IL-10 et de TGF- β ainsi que du CCL-17, CCL-18 et CCL-22²²⁰. Ils se définissent également par l'expression de CD163²¹⁵, un récepteur « éboueur » (*Scavenger* en anglais), mais également par des récepteurs à la lectine MRC1 (*Mannose Receptor C-type 1*) plus connus sous le nom de CD206. On retrouve également à leur surface une autre lectine de type C, CD209 (ou DC-SIGN pour *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*)^{220,221}.

Les M2b sont une autre sous-catégorie de macrophages inductibles par des complexes immuns (*Immune Complexe* ou IC) ainsi que divers agonistes des TLRs²¹³. En effet ces macrophages possèdent à leur surface des récepteurs Fc, notamment de type gamma (FcR γ), capables de détecter des IC impliquant des Immunoglobuline G (IgG), et d'établir ainsi une liaison avec les lymphocytes B. Une signalisation spécifique des FcR γ va être déclenchée avec l'implication des protéines kinases Syk et Pi3K. De plus, on peut également retrouver une signalisation liée à celle des TLRs et MyD88²²². La particularité de ces macrophages régulateurs est leur capacité à sécréter à la fois des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-10). Leur balance IL-12/IL-10 est inversée de celle des M1, donc en faveur de l'IL-10. Les M2b sont les seuls macrophages qui sécrètent de façon importante CCL-1. A leur surface, ils expriment le CD86, faiblement le récepteur à l'IL-12 (IL-12R) et fortement le récepteur à l'IL-10 (IL-10R)²²³.

Les macrophages « désactivés » (*Deactivated Macrophages*) ou M2c sont activés par l'IL-10 via son récepteur IL-10R et les glucocorticoïdes via leurs récepteurs (GR pour *Glucocorticoid Receptor*). L'activation de ces récepteurs GR induit une réponse anti-inflammatoire associée à la libération d'une très grande quantité d'IL-10 et de la cytokine pro-fibrosante TGF- β ²²⁴. Les M2c se définissent phénotypiquement par l'expression de CD206 et de CD163. L'IL-10 peut induire sur les M2c l'expression d'autres récepteurs à la lectine C comme CD209 et dectine-1. L'IL-10 va surtout induire la sécrétion des chimio-attractants CXCL-4 et CXCL-13, l'expression membranaire de TLR1 et TLR8 mais également un récepteur avec une structure collagène, MARCO, qui est un récepteur éboueur²¹⁸.

Les M2d forment une population récemment découverte de macrophages associés exclusivement aux tumeurs (*Tumor Associated Macrophages* ou TAMs). Ils sont activés par stimulation de récepteurs TLR et A2 à l'adénosine (A2R). Les M2d sécrètent de grandes quantités d'IL-10, de TGF- β et de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et plus modérément de l'IL-12. Les M2d sont essentiellement associés à l'angiogenèse et à la production de métastases tumorales²¹⁸ c'est pourquoi je ne développerai pas leur fonctionnement (Tableau 2).

	Pro-inflammatoire (GM-CSF)			Anti-inflammatoire (M-CSF)			
	M1			M2a	M2b	M2c	
Stimulus	IFN- γ	LPS	GM-CSF	IL4 +/- IL13	IC et Agonists TLR (LPS)	IL-10	Glucocorticoïde
Signalisation	JAK1/JAK2 STAT1/STAT2	MyD88	JAK2 STAT5	JAK1/JAK3	Syk, PI3K, RAS, MyD88	JAK1/STATs	GR
Facteurs de Transcription	STAT1, IRFs	NF-kB, IRFs, STAT5, AP-1	IRF5, STAT5, NF-kB	STAT6	NF-kB	STAT3	Complexe GR
Cytokines	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ^{high} /IL-10 ^{low}			IL-10, TGF- β	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ^{low} /IL-10 ^{high}	IL-10 ^{high} , TGF- β ^{high}	
Chémokines	CCL-2, CCL-9, CCL-10			CCL-17, CCL-18, CCL-22	CCL-1	CXCL-4, CXCL-13, CCL-16, CCL-18	
Marqueur de surface	CMH-II, CD80/CD86, TLR4, TLR2			CD163, CD206 (MRC1), CD209 (DC-SIGN)	IL-10R ^{high} /IL-12 ^{low} , CD86	CD206, CD163, TLR1, TLR8, MARCO	

Tableau 2 : Propriétés d'activation, de sécrétion et phénotypiques de chaque sous-groupe de macrophages : GR : Glucocorticoid Receptor, IC : Immune Complexe

Cette classification communément admise aujourd'hui tend davantage à la controverse. En effet, elle a été établie sur la base d'expérimentations *in vitro* et il s'avère *in vivo* que ces caractéristiques peuvent différer. Dans un tissu il n'existe pas qu'un seul environnement. L'évolution phénotypique des macrophages est dynamique, et il est probable qu'il existe plus que 5 sous-types de macrophages.

d) Rôle des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire

Dans un contexte de fibrose pulmonaire idiopathique, la cause des lésions est inconnue et imprévisible. De manière simplifiée, lors de la phase inflammatoire (apparentée à des phénomènes de lésions pulmonaires aiguës ou ALI (*Acute Lung Injury*)), les macrophages ont un profil plutôt M1 et expriment un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires. Lors de la résolution, donc du développement de fibrose chronique, on retrouve plutôt des macrophages de types M2 avec la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires²²⁵. La FPI est une maladie chronique qui résulte de la persistance d'un phénomène anti-inflammatoire c'est pourquoi le phénotype M2 est impliqué dans le processus de fibrogenèse plutôt que M1²²⁶ (Figure 28).

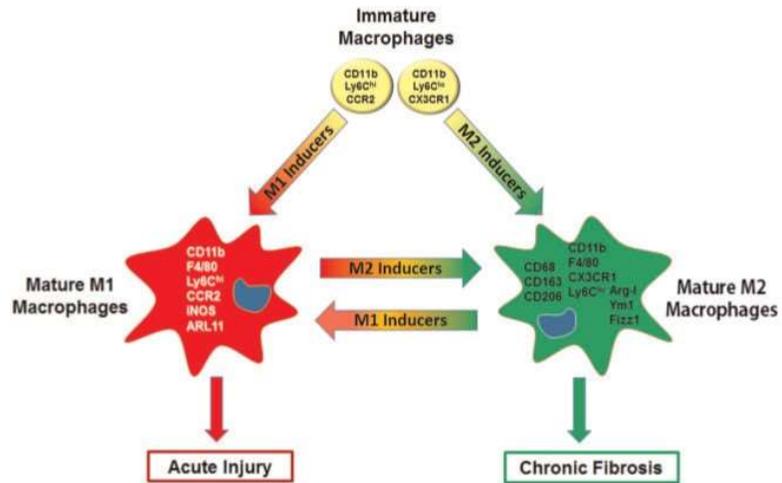


Figure 28 : Fibrogenèse et polarisation des macrophages : Des macrophages immatures, pouvant être apparentés à des monocytes infiltrants et décrits dans la littérature comme des M0 vont se transformer en phénotype M1 ou M2 selon l'environnement (inducteurs M1 : IFN- γ , TLR4 et inducteurs M2 : IL-4, IL-10, IL13 par exemple). Lors d'une lésion, les macrophages présentent principalement le phénotype M1 à l'inverse de la phase chronique de fibrose ou ils présentent principalement un phénotype M2. Il peut exister des phénomènes de « switch » entre ces différentes polarisations. Issue de Laskin *et al.*, (2019)²²⁵.

La fibrose pulmonaire résulte d'une destruction de l'épithélium caractérisée par l'accumulation de débris cellulaires, de cellules apoptotiques et de pathogènes infectieux qui déclenchent un phénomène inflammatoire localisé. Cette destruction engendre une perméabilisation et donc une infiltration cellulaire importante. Il a très rapidement été montré que l'infiltration des monocytes au sein du poumon est un phénomène essentiel pour le développement de la fibrose pulmonaire²²⁷. L'utilisation de souris KO pour CCR2 (CCR2^{-/-}) a permis de mettre en évidence cet aspect. En effet, ces souris sont dépourvues de monocytes ou présentes une monocytopenie, ce qui rend impossible le recrutement de MoM (RM-DM) dans le poumon. Les auteurs ont montré que les souris CCR2^{-/-} sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par administration de bléomycine et de FITC, ce qui démontre bien l'importance des monocytes et des RM-DMs dans le développement de la fibrose pulmonaire. De plus, les RM-DM infiltrent le poumon et sont capables d'auto-renouvellement via une signalisation autocrine M-CSF/M-CSFR. Elles vont former des niches de macrophages pro-fibrosants, riches en M-CSF, et qui sont essentielles pour l'activation des fibroblastes²²⁸.

Les macrophages alvéolaires résidants possèdent un plus haut niveau de marqueur M2 que les monocytes infiltrants^{194,229}. De plus, les patients atteints de FPI présentent un taux bien supérieur de CCL-18 (connue également sous le nom de MIP-4 pour *Macrophage Inflammatory Protein-4*) dans les LBA que des contrôles sains, et les auteurs ont mis en évidence que les AMs

issus de ces patients expriment de manière spontanée cette chimiokine²³⁰. La production de cette chimiokine est dépendante d'une immunité de type 2 et est connue pour être produite par les M2²³¹. De manière intéressante, la concentration de CCL-18 dans les LBA de patients est inversement corrélée avec la mesure de leur fonction pulmonaire (DLCO)²³⁰.

Comme nous l'avons vu précédemment, le TGF- β 1 est un médiateur clé dans le processus de fibrogenèse^{61,62}. Les macrophages alvéolaires ont très tôt été identifiés comme des cellules productrices de TGF- β dans un contexte de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine mais également dans des explants de poumons de patients FPI^{232,233}. La SAP (*Serum Amyloid P*) est une protéine membre de la famille des pentraxines et est connue pour inhiber la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine²³⁴. Cette protéine se fixe sur les Fc γ qui affecte l'activation et la différenciation des macrophages et notamment la polarisation de type 2. Ainsi, Murray *et al.*, (2011) grâce à l'utilisation de cette protéine dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, ont montré que les M2 sont essentiels au développement de la fibrose pulmonaire de par leur sécrétion massive de TGF- β 1²³⁵.

L'IL-4 et l'IL-13 activent et accélèrent la polarisation des macrophages de type 2, essentielle pour la résolution de l'inflammation et la fibrogenèse^{236,237}. Ces deux cytokines sont impliquées dans l'immunité de type II et favorisent la polarisation des macrophages en M2. L'IL-10 est également une cytokine anti-inflammatoire essentielle au développement de la fibrose pulmonaire. Dans le modèle murin de fibrose induite par surexpression d'IL-10, le développement de la maladie implique le recrutement de fibrocytes et la polarisation M2 dépendante de la signalisation CCR2/CCL2²³⁸.

Que ce soit les TR-AMs ou les RM-DMs, ces deux populations de macrophages ont montré leur capacité à se différencier en M2 en fonction du contexte environnemental, ce qui fait de ces deux populations des acteurs clés dans le processus de fibrogenèse²²⁶ (Figure 29).

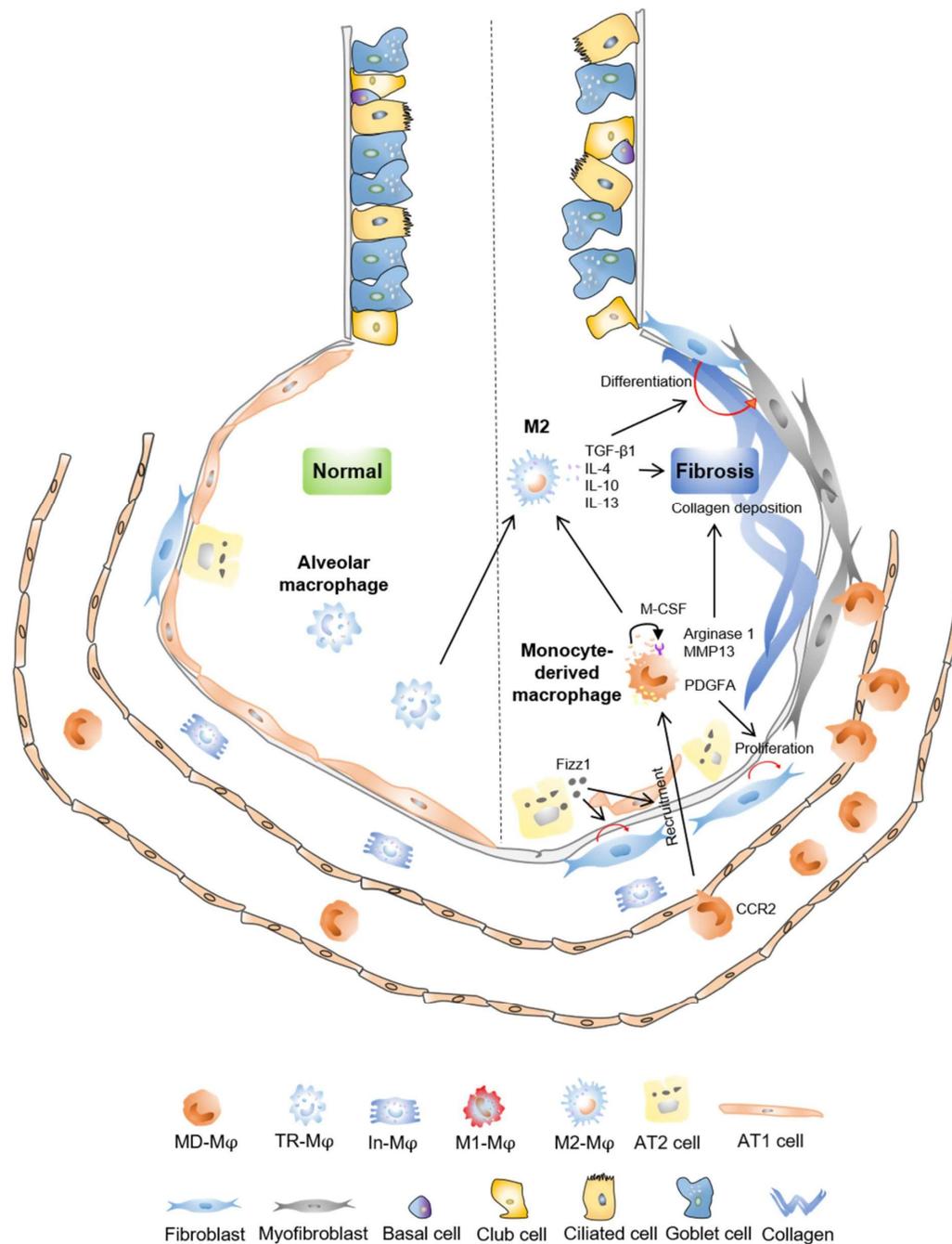


Figure 29 : Implication des macrophages de type II dans le développement de la fibrose pulmonaire : Les macrophages dérivés de monocytes (*Monocyte-derived Macrophages*, appelé RM-DM dans le corps du texte) infiltrent le poumon par l'intermédiaire d'une signalisation CCR2/CCL2. Les cellules épithéliales alvéolaires de types II participent également à ce recrutement par la sécrétion de Fizz1. Les RM-DMs (*Monocyte-derived Macrophages*) colonisent l'espace alvéolaire grâce à la présence de M-CSF ce qui leur permet d'acquérir une capacité d'auto-renouvellement et un phénotype de plus en plus proche de celui de TR-AMs. Sous l'action de médiateurs anti-inflammatoires et pro-fibrosants tels que le TGF-β1, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, les TR-AMs et RM-DMs adoptent un profil M2 nécessaire à l'activation des fibroblastes et au développement de la fibrose pulmonaire. Ainsi, le maintien de ces événements anti-inflammatoires est à l'origine du dépôt excessif de MEC dans le poumon et d'une fibrose chronique. Issue de Cheng *et al.*, (2021)²²⁶.

Nous avons précédemment décrit le CD206 comme un marqueur des M2. En effet, ce marqueur est très souvent utilisé en recherche afin d'identifier le phénotype macrophagique M2. Dans la fibrose, ce récepteur de la lectine de type C peut se révéler très intéressant. Bellamri *et al.*, ont montré sur une culture de macrophages issus de donneur sains, que le nintédanib limitait l'expression de CD206 après un traitement inducteur de la transformation macrophagique en phénotype M2 (IL-4+IL-13)²³⁹. Une autre équipe a développé un peptide inhibiteur spécifique de CD206 qui réduit au même titre que le nintédanib, la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris²⁴⁰. De plus, le tofacitinib, est un médicament utilisé en clinique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et qui a récemment obtenu une AMM pour le traitement de la rectocolite hémorragique²⁴¹. L'intérêt de cette molécule réside dans son rôle à inhiber JAK1/JAK3, qui comme nous l'avons vu précédemment, est une voie majeure de signalisation impliquée dans l'activation des M2. La stratégie d'inhibition du CD206 dans un contexte de fibrose semble être prometteuse, et le tofacitinib apparaît comme un candidat idéal dans une perspective de traitement de PID²⁴².

Enfin, l'importance des RM-DM dans la fibrose pulmonaire a été montrée par les travaux de Misharin *et al.* (2017). Dans cette étude, les auteurs montrent que la délétion spécifique des RM-DMs dans un modèle de fibrose pulmonaire murin induite par la bléomycine, atténue la sévérité de la fibrose. En revanche, une délétion spécifique des TR-AMs n'a aucun effet. De manière très intéressante, les auteurs montrent que les RM-DM expriment davantage de gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques que les TR-AMs, et constitueraient une population hétérogène qui ne se réduit pas à une simple polarisation M2 associée à la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires. De plus, ces gènes pro-fibrotiques exprimés par les RM-DM sont les mêmes que ceux retrouvés dans les macrophages alvéolaires de patients souffrant d'une fibrose pulmonaire. Dans cette étude, les auteurs ont testé les effets d'un traitement par glucocorticoïde sur le développement de la fibrose et n'ont observé aucun effet. En parallèle, ils se sont aperçus que le traitement anti-inflammatoire ne perturbait pas l'expression des macrophages alvéolaires. Cette donnée suggère l'intérêt d'inhiber spécifiquement cette population pour obtenir des effets anti-fibrosants. Enfin, lors d'un challenge fibrosant de type bléomycine, mais également en cas d'infection induite par le virus influenza A, ces auteurs montrent que les AMs sont constitués à 50% de RM-DM et à 50% de TR-AMs, alors que dans les souris naïves, la part des TR-AMs est supérieure à 95%. Ainsi, des lésions pulmonaires qu'elles soient infectieuses ou toxiques, modifient complètement le profil des AMs en

augmentant la proportion de RM-DMs qui exprime fortement des gènes pro-fibrosants. Ces données suggèrent un rôle majeur des RM-DMs dans le processus de fibrose (Figure 30)¹⁹⁴.

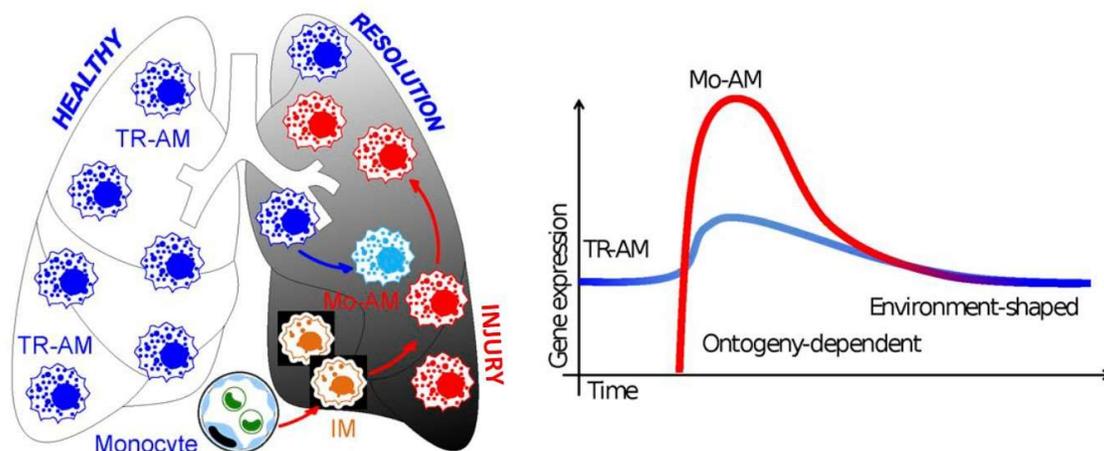


Figure 30 : Illustration schématique de la proportion de macrophages alvéolaires dans un poumon sain versus fibrosé : Dans un poumon sain, l'essentiel du pool d'AMs est constitué de TR-AMs. Les lésions pulmonaires précèdent un phénomène inflammatoire avec une infiltration monocytaire et la différenciation en RM-DMs (Mo-AM). Lors du phénomène de résolution de l'inflammation, les AMs ont une ontogénie différente avec 50% issus des macrophages résidents et 50% de macrophages infiltrants ce qui modifie complètement l'environnement pulmonaire. En cas de fibrose, l'ontogénie des macrophages résidents est perturbée et l'expression génique sera ainsi modifiée. Adaptée de Misharin *et al.*, (2017)¹⁹⁴.

Enfin, le rôle des IMs dans la fibrose pulmonaire est encore méconnu et très peu étudié²⁴³. Les études réalisées jusqu'à présent se sont concentrées sur l'aspect et la fonction des IMs chez des souris non malades. Le développement des techniques d'analyse d'une cellule (*Single-cell analysis*) va également accélérer et aider à étudier les IMs²⁰⁶. Ces cellules semblent avoir un intérêt dans l'inflammation des voies respiratoires dans un contexte allergique. En réponse au motif d'ADN bactérien non-méthylé CpG, les IMs infiltrent le poumon de manière CCR2 dépendante et indépendante, et produisent une grande quantité d'IL-10²⁴⁴. L'IL-10 étant une cytokine anti-inflammatoire largement impliquée dans le processus de fibrogenèse, une exploration plus approfondie du rôle des IMs dans ce contexte pourrait être intéressante

CHAPITRE III : Les protéines de choc thermique dans la FPI

I. Généralités

Les protéines de choc thermique ou *Heat Shock Protein* (HSP), aussi appelées protéines de stress, appartiennent à un groupe de protéines synthétisées par les cellules lors d'un stress cellulaire (choc thermique, stress oxydatif, UV...) et sont exprimées de manière ubiquitaire. On les retrouve chez les végétaux, les mammifères et les bactéries²⁴⁵. Chez les mammifères, les HSPs sont classiquement définies par leur poids moléculaire. On retrouve les HSP de haut poids moléculaire (HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 et HSP47) et celles de petit poids moléculaire, aussi appelés *small HSP* (sHSP), incluant HSP27 (correspondant à HSP25 chez la souris) et α B-crystallin. Leur synthèse est fortement inductible lors d'un stress mais elles possèdent également une expression constitutive afin de maintenir l'homéostasie cellulaire²⁴⁶. Les facteurs de transcription impliqués dans cette induction sont appelés les HSF (*Heat Shock Factors*) qui se fixent sur les éléments de réponse génique appelés HSE (*Heat Shock Elements*)²⁴⁷.

Comme leur nom l'indique, le rôle premier de ces protéines est de prendre en charge (on dit de chaperonner) des protéines mal repliées ou avec une synthèse défectueuse, incomplète et qui pourrait conduire à la formation d'agrégats protéiques, toxiques pour la cellule. En effet, elles collaborent très étroitement avec le système protéasome/ubiquitine (*Ubiquitin-Proteasome System* ou UPS) qui dégrade les protéines. Les HSP peuvent prendre en charge des protéines dénaturées et leur permettre de retrouver une conformation fonctionnelle. Quand cela n'est pas possible, elles peuvent les diriger vers le protéasome pour éviter leur agrégation dans la cellule et la mort cellulaire. Elles interviennent également dans la conformation des protéines nouvellement synthétisées et de manière générale, préviennent la cellule de la mort cellulaire (apoptose, autophagie). De cette façon, les HSP constituent un élément essentiel du réseau protéostatique. La protéostase est une balance entre la synthèse et la dégradation des protéines et est contrôlée par une ensemble d'éléments (le réseau protéostatique) dont les HSP font partie²⁴⁸ (Figure 31).

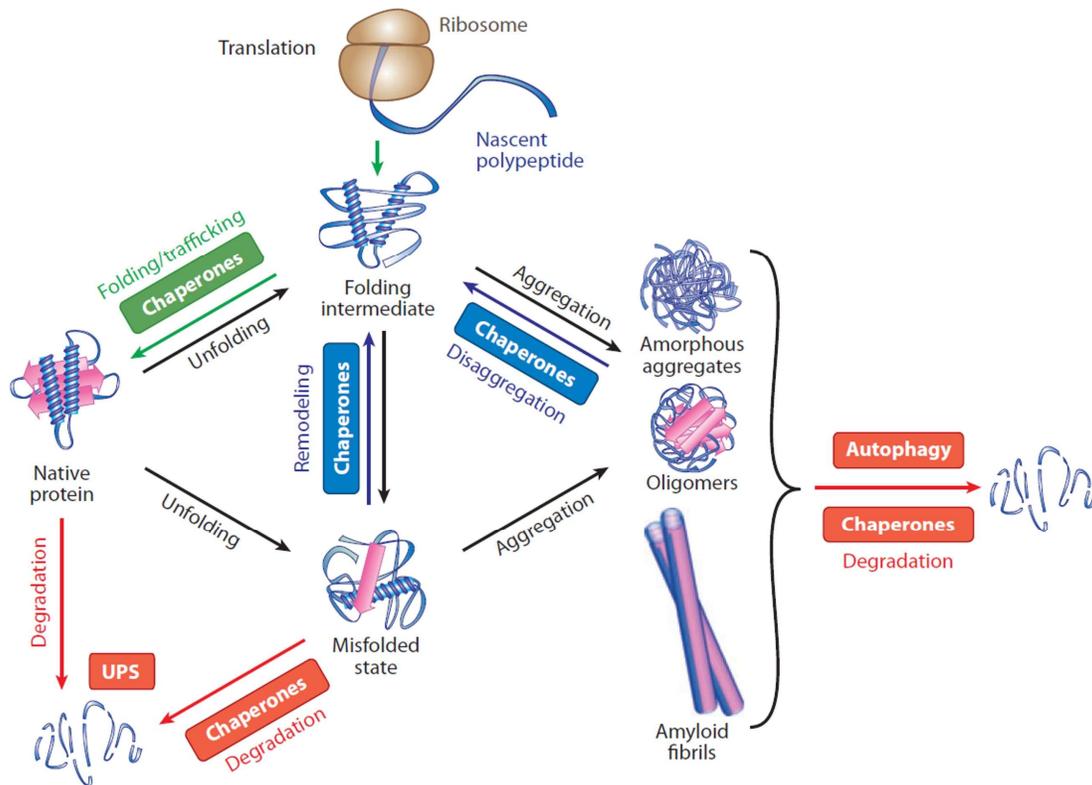


Figure 31 : Le réseau protéostatique : Les HSP sont des protéines essentielles pour maintenir l'homéostasie cellulaire via la protéostase. En Bleu, implication de la fonction chaperon des HSPs dans la synthèse protéique. En vert, implication dans le trafic des protéines dans la cellule et en rouge implication des chaperons dans la dégradation protéique. Issue de Kim *et al.*, (2013)²⁴⁸

Les HSP ont été intensément étudiées dans le domaine de la cancérologie. Elles sont impliquées dans la résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques. Les recherches ciblant ces protéines visent à les inhiber, principalement pour sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies.

Bien que les HSP sont connues pour être des protéines cytosoliques, il est maintenant bien admis que ces protéines peuvent être libérées dans le compartiment extracellulaire, et se comporter comme des ligands de récepteurs membranaires capables d'induire une signalisation et des effets différents de ceux associés à leur fonction dans le compartiment intracellulaire. L'étude des HSP extracellulaires suscite un intérêt croissant dans la théranostique. Par exemple, l'augmentation des concentrations d'HSP70 dans le milieu extracellulaire a été corrélée au phénotype malin de divers cellules²⁴⁹, et le blocage spécifique des exosomes tumoraux exprimant HSP70 semble être prometteur pour la restauration de l'immunité antitumorale²⁵⁰. De plus, la présence des HSP dans les fluides des patients atteints de PID fibrosantes pourraient

constituer des cibles thérapeutiques ou encore des biomarqueurs intéressants pour le diagnostic ou le suivi de ces pathologies.²⁵¹

Dans ce chapitre, nous allons décrire seulement les HSPs qui sont connues comme étant impliquées dans la fibrose pulmonaire et nous distinguerons les effets associés à leur compartimentation cytosolique de ceux associés à leur présence dans le milieu extracellulaire.

II. Les HSPs de haut poids moléculaire

a) HSP90

La famille des HSP90 est la plus abondante des HSP avec un taux intracellulaire pouvant atteindre 1% du total des protéines en conditions basales²⁵². On lui connaît deux isoformes majeures à savoir HSP90 α ou HSPC1 (forme majeure inductible) et HSP90 β ou HSPC3 (forme mineure constitutive). Il existe également deux autres analogues que sont Gp96 (*Glycosylated protein 96*), qui est située dans le réticulum endoplasmique, et TRAP1 (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Protein-1*) située dans la matrice mitochondriale²⁵³. HSP90 est ATP-dépendante puisqu'elle possède un domaine N-terminal qui comprend un site de liaison à l'ATP, un domaine central qui permet d'interagir avec des protéines clientes et un domaine C-terminal nécessaire à sa dimérisation. HSP90 forme majoritairement des homodimères mais peut également établir des hétérodimères entre ces isoformes. Un dimère d'HSP90 non-occupé va prendre en charge une protéine cliente et la stabilise en la repliant, en la renaturant, grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP²⁵⁴ (Figure 32).

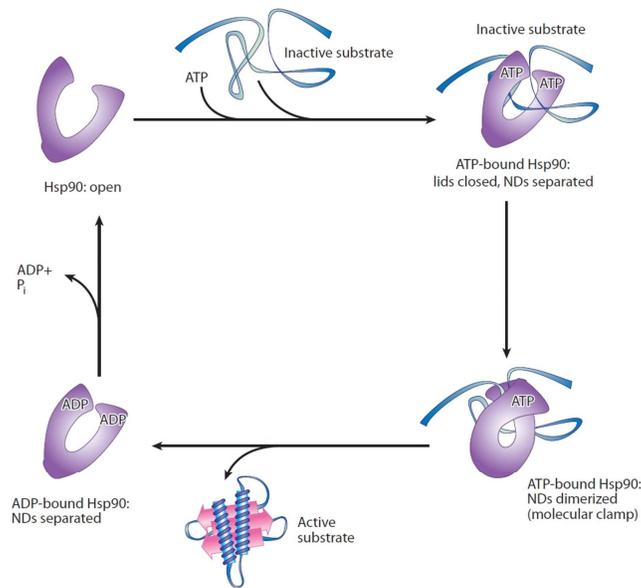


Figure 32 : Schéma simplifié du cycle d'HSP90 : HSP90 forme un dimère en position ouverte (domaine N (ND) séparé). Le dimère d'HSP90 prend en charge une protéine cliente, un substrat inactif, et fixe également de l'ATP. Les ND vont se rapprocher et permettre l'activation du substrat grâce à l'hydrolyse de l'ATP. La protéine fonctionnelle est libérée et HSP90 relargue de l'ADP+Pi afin de retrouver une forme initiale, ouverte à la recherche d'une nouvelle protéine cliente. Issue de Kim *et al.*, (2013)²⁴⁸

Plusieurs molécules ont été décrites comme étant capables d'inhiber l'activité d'HSP90 et constitue des solutions intéressantes dans le traitement de cancer. Le 17AAG (17-(allylamino)-17-déméthoxygeldanamycine) par exemple empêche la fixation de molécules d'ATP sur le dimère d'HSP90²⁵⁵. L'utilisation de tels inhibiteurs a permis d'améliorer la compréhension du rôle d'HSP90 dans la signalisation médiée par le TGF- β 1. Sontake *et al.*, décrivent HSP90 comme un activateur potentiel de la transformation myofibroblastique et de la production de MEC. Ils montrent que le 17AAG limite le développement de la fibrose induite par la bléomycine chez la souris²⁵⁶. D'autres stratégies d'inhibition ont été testées. Par exemple, un flavonoïde d'origine végétale, la myricétine a montré une efficacité inhibitrice du développement de la fibrose *in vivo* dans le même modèle murin de fibrose pulmonaire²⁵⁷. HSP90 a aussi été décrite comme étant capable de se lier au TGF- β R2 et ainsi de protéger son ubiquitinylation et donc sa dégradation protéasomale. Elle a également été décrite comme pouvant se lier au récepteur aux glucocorticoïdes afin de faciliter son export nucléaire et favoriser l'activation de la voie NF- κ B²⁵⁸ (Figure 33).

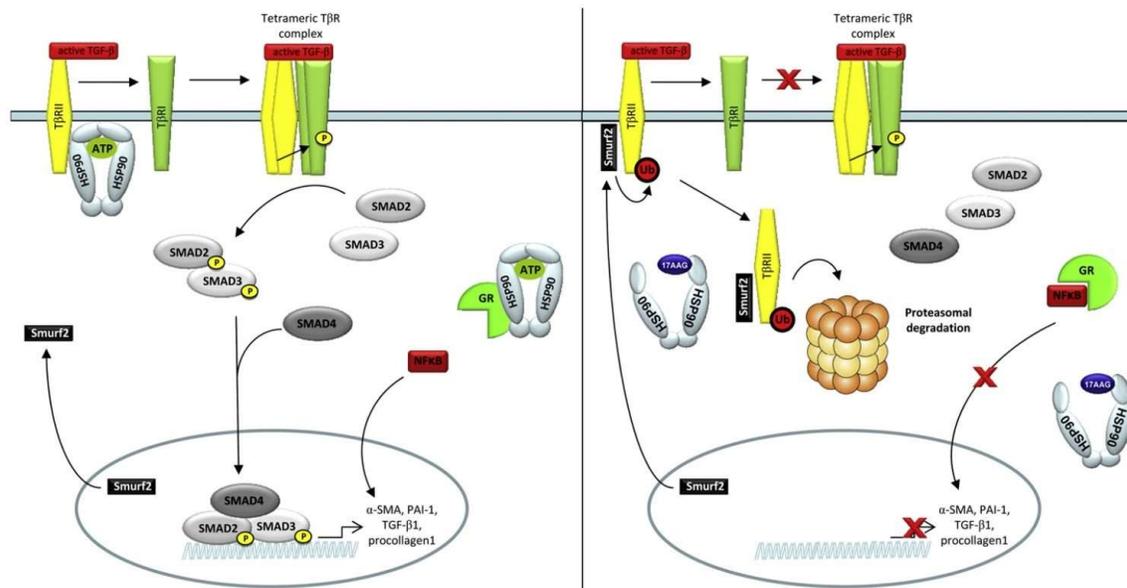


Figure 33 : Implication d'HSP90 dans la voie du TGF-β1 : Gauche : HSP90 interagit avec le TGF-βRII afin d'inhiber sa dégradation protéasomale. HSP90 est également capable de lier le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), ce qui facilite la translocation nucléaire de NF-κB. Droite : Mécanisme d'action du 17-AAG. Cette molécule se lie à HSP90 ce qui l'empêche d'interagir avec les protéines précédemment citées et ainsi permettre la régulation de la voie du TGF-β1. Issue de Bellaye *et al.*, (2014)²⁵⁸

Concernant la sécrétion d'HSP90, elle a initialement été décrite au niveau de cellules cancéreuses en conséquence d'un stress cellulaire telle que l'hypoxie ou encore la stimulation par des facteurs de croissance telle que le TGF-α^{259,260}. En 2017, Dong *et al.*, décrivent l'efficacité d'un anticorps monoclonal dirigé contre la forme extracellulaire d'HSP90 (eHSP90), le 1G6-D7. L'administration intra-nasale de cet anticorps permet l'inhibition d'eHSP90 ce qui atténue la fibrose pulmonaire dans un modèle murin induit par la bléomycine. Les auteurs décrivent également que cette atténuation est dépendante de la voie LRP1 (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*)-Erk, suggérant ainsi une signalisation eHSP90/LRP1²⁶¹. En 2018, Bellaye *et al.*, détectent des niveaux circulants d'HSP90α plus importants chez des patients atteints de FPI et ils montrent que sa concentration dans le sérum est corrélée avec la sévérité de la pathologie. De plus, ils montrent une surexpression de cette protéine dans les LBA et sérum de rat, chez qui la fibrose pulmonaire a été induite par administration d'AdTGF-β1, et une corrélation positive entre la concentration d'HSP90 dans ces compartiments et le niveau de collagène mesuré dans le tissu pulmonaire. De plus, ces travaux ont permis d'établir une corrélation directe entre HSP90β (forme intracellulaire) et LRP1, essentielle à la stabilisation de ce récepteur et favorisant ainsi la signalisation eHSP90α/LRP1 qui promeut la différenciation myofibroblastique²⁶².

b) HSP70

HSP70 fait partie des HSPs les plus étudiées et les plus connues en raison de son activité anti-apoptotique très importante, ce qui la positionne comme une cible thérapeutique potentielle dans le cancer^{263,264}. Le système chaperon HSP70 est essentiel pour le remodelage des protéines dénaturées. Ce groupe d'HSP comporte un grand nombre d'isoformes dont les deux formes principales et les plus étudiées sont la forme constitutive HSC70 (*Heat Shock Cognate 71*) appelée aussi HSPA8 et la forme inductible HSP70 appelée aussi HSPA1A. On retrouve également souvent le nom de DnaK qui est la forme bactérienne d'HSP70. Tous les membres de la famille HSP70 partagent une structure commune qui comprend : le domaine N-terminal de 45kDa NBD (*Nucleotide Binding Domain*) suivi du domaine SBD β (*Substrate Binding Domain*) de 15kDa, d'un domaine en couvercle hélicoïdal (SBD α) de 10kDa et d'une queue C-terminal de longueur variable (Figure 34).²⁶⁵

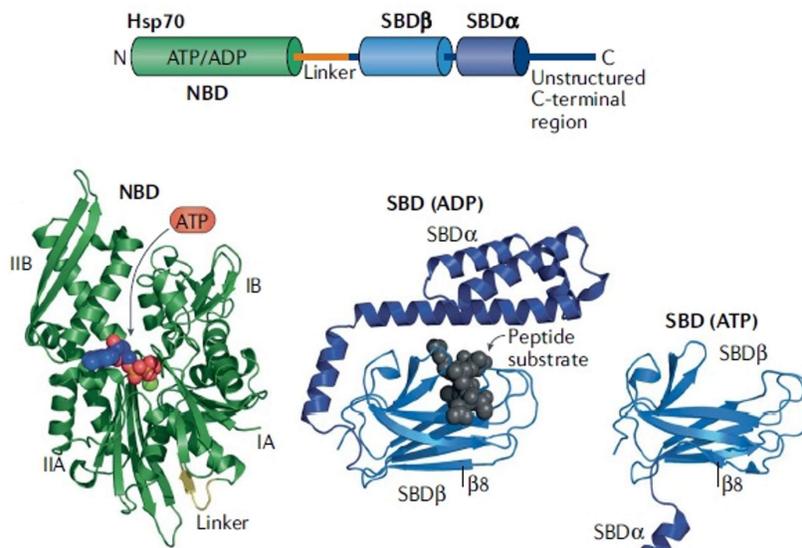


Figure 34 : Structure HSP70 : (Haut) Représentation schématique de la structure d'HSP70. (Bas) Structure cristallographique des domaines NBD et SBD indiquant la fixation de l'ATP et du peptide substrat. Issue de Rosenzweig *et al.*, (2019)²⁶⁵

Les domaines SBD constituent les domaines de liaison à la protéine cliente. Cette fixation est dépendante de la fixation d'une molécule d'ATP qui place HSP70 en position dite « ouverte », et qui présente une forte affinité pour le substrat²⁴⁸. Sous cette conformation, la protéine a une affinité pour HSP40 ce qui facilite la fixation au substrat et l'hydrolyse d'ATP²⁶⁶. La consommation d'une molécule d'ATP permet le repliement de la protéine native ou mal repliée. Le complexe HSP70-ADP possédant une affinité faible pour le substrat, il s'en suit la libération du substrat, catalysée par le facteur NEF (*Nuclear Exchange Factor*) qui n'est autre

qu'HSP110²⁶⁶. L'action d'HSP70 est donc finement régulée par les chaperonnes HSP40 et HSP110 (Figure 35).

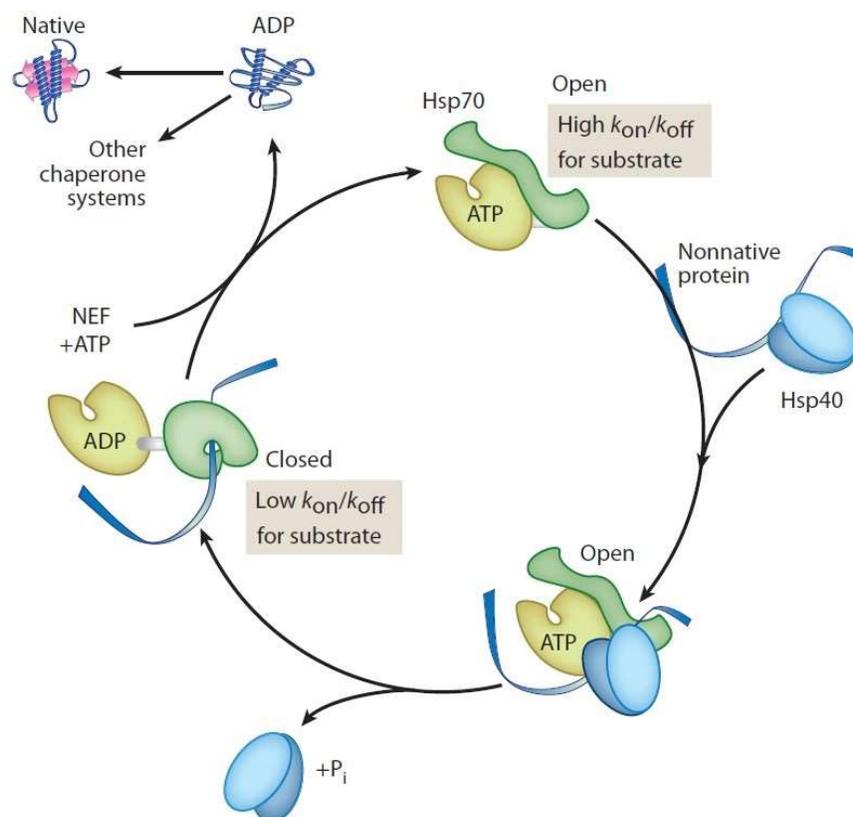


Figure 35 : Schéma simplifié du cycle d'activation d'HSP70 : La fixation de l'ATP permet de maintenir la protéine en position dite ouverte, capable de fixer son substrat. Après interaction avec HSP40, et hydrolyse de l'ATP, HSP70 exerce son action de protéine chaperone capable de replier une protéine cliente sous sa forme mature. Le complexe HSP70-ADP présentant une faible affinité pour le substrat, celui-ci est relâgué. Cette dissociation est facilitée par NEF, aussi connue sous le nom d'HSP110. Issue de Kim *et al.*, (2013)

A l'inverse d'HSP90, l'expression d'HSP70 est réduite dans le tissu pulmonaire des patients atteint de fibrose pulmonaire. HSP70 est décrite comme limitant la signalisation TGF- β 1 et des souris KO pour HSP70 présentent une plus grande sensibilité à la bléomycine²⁶⁷. La Geranylgeranylacetone (GGA), un inducteur d'HSP70, est décrit comme protégeant les animaux de la fibrose pulmonaire²⁶⁸. De manière intéressante, Yun *et al.*, ont montré en 2010 dans un modèle de fibrose rénale et dans des lignées cellulaires de poumon, que la geldanamycine (un inhibiteur d'HSP90) augmente l'expression d'HSP70 et entraîne une diminution du niveau d'expression des récepteurs au TGF- β 1. Un taux faible d'HSP90 entraîne l'interaction d'HSP70 avec les récepteurs au TGF- β 1 et favorise leur dégradation

protéasomale²⁶⁹. De plus, HSP70 est capable de séquestrer Smad2 et Smad3, ce qui favorise l'inhibition de la voie du TGF- β 1^{270,271} (Figure 36).

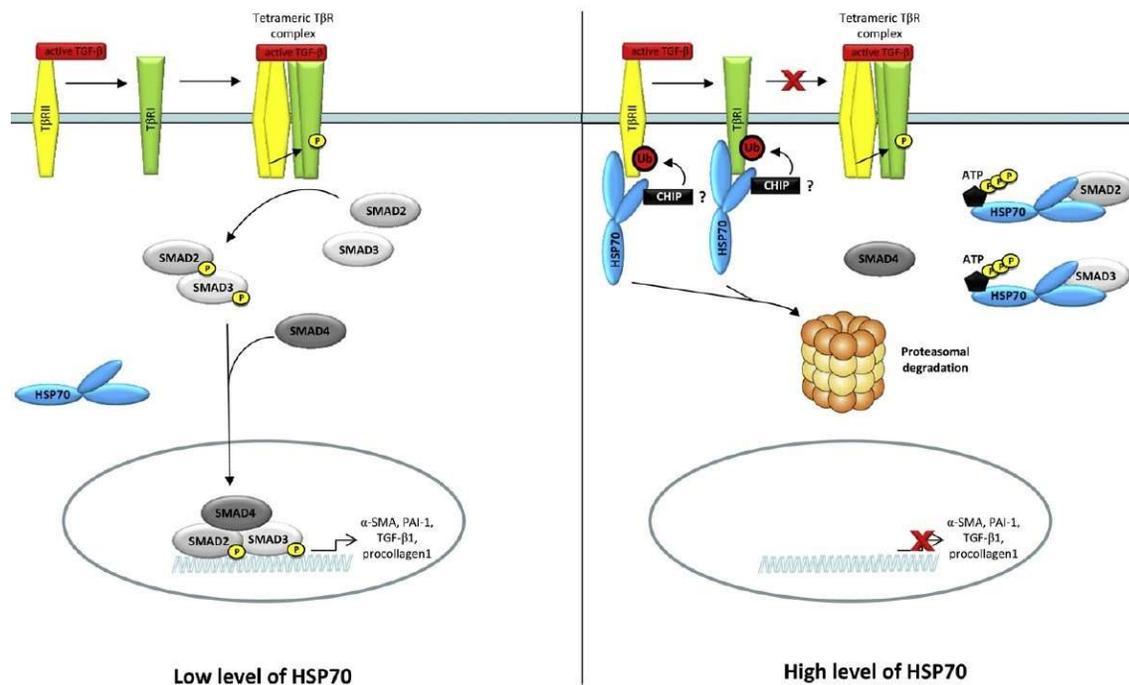


Figure 36 : Implication d’HSP70 dans la voie du TGF- β 1 : (Gauche) En cas de faible niveau d’expression d’HSP70, la protéine n’interfère pas avec la signalisation du TGF- β 1. A l’inverse (Droite), un niveau élevé d’HSP70 favorise la dégradation des récepteurs au TGF- β 1 et la séquestration des protéines Smad2 et Smad3, ce qui réduit la signalisation du TGF- β 1. Issue de Bellaye *et al.*, (2014)²⁵⁸

Différentes études se sont intéressées au rôle d’HSP70 retrouvée dans le milieu extracellulaire. L’étude de cette forme extracellulaire repose la plupart du temps sur la mesure d’anticorps dirigés contre HSP70. Kahloon *et al.*, ont détecté une concentration élevée d’IgG anti-HSP70 dans le sérum de patients atteints de FPI en comparaison à des volontaires sains. Dans cette même étude, les auteurs montrent que l’augmentation de la mortalité et de la fréquence d’exacerbations aiguës est corrélée avec le niveau circulant d’IgG anti-HSP70²⁷². Ces données sont controversées, puisque par exemple, Mills *et al.*, qui observent un niveau important d’HSP70 dans le sérum de patients atteint de FPI, ne montrent en revanche pas de différence de concentration entre ces patients et ceux du groupe comparatif atteints d’autres ILD. Cette donnée pose le problème du manque de spécificité de ce marqueur. Ils n’observent pas non plus de différence de concentration sérique des anticorps dirigés contre HSP70 entre les patient FPI en phase de progression versus sans progression. A l’inverse, un taux plus élevé de ces anticorps a été détecté dans les LBA de patients sans progression (versus patients avec

progression) et cette augmentation est associée à une survie plus importante.²⁷³. L'étude de Gonzáles-Ramos *et al.*, décrit en 2013 la capacité d'HSP70 extracellulaire à se lier au récepteurs TLR4 et à induire la production de TGF- β 1 par l'intermédiaire des voies JNK et ERK²⁷⁴. En tant que médiateur extracellulaire, HSP70 pourrait favoriser le développement de la fibrose, et son blocage spécifiquement dans ce compartiment pourrait être bénéfique pour limiter le développement de la maladie.

Néanmoins, de plus amples travaux semblent nécessaires pour éclaircir le lien entre la gravité de la fibrose et l'expression d'HSP70 dans le milieu extracellulaire.

c) HSP47

HSP47 (appelée aussi SERPINH1 ou encore gp46) est la protéine chaperonne la plus étudiée dans le processus de fibrogenèse puisque c'est la seule HSP à posséder un substrat spécifique qu'est le collagène. HSP47 est indispensable aux étapes finales de biosynthèse du collagène. Elle assure le repliement des triples hélices de procollagène²⁷⁵ (Figure 37). L'expression d'HSP47 est corrélée avec celle du collagène²⁷⁶ c'est pourquoi cela en fait une cible de choix dans le développement des thérapies anti-fibrosantes²⁷⁷.

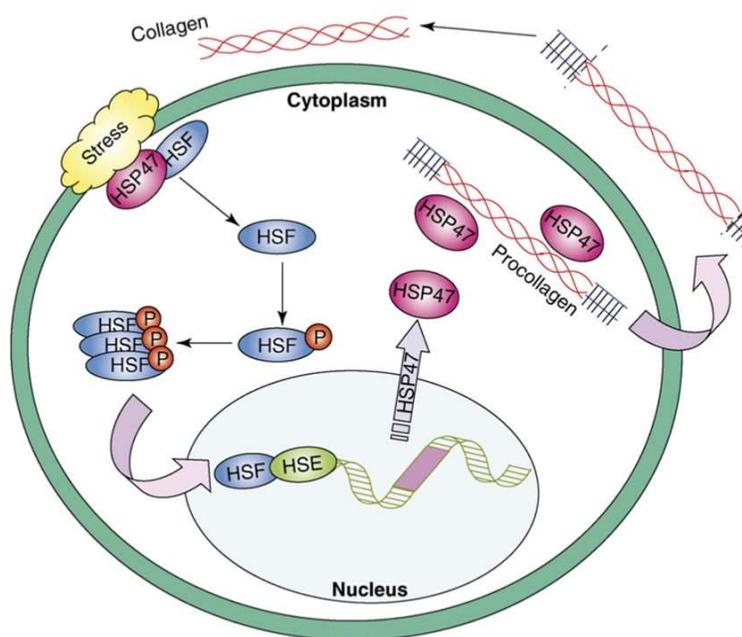


Figure 37 : Implication d'HSP47 dans la synthèse du collagène : Le Heat Shock Factor (HSF), régulateur majeur des HSP, est séquestré dans le cytosol en conditions natives par des HSP dont HSP47. Lors d'un stress, HSP47 et HSF se dissocient et HSF stimule l'expression d'HSP47. HSP47 libérée dans le milieu intracellulaire intervient dans la synthèse, la maturation du collagène en favorisant le repliement du procollagène ainsi que son export extracellulaire. Issue de Taguchi et al. (2006)²⁷⁵

Différents médiateurs pro-fibrosants comme le TGF- β 1 et l'IL-1 β augmentent l'expression de l'HSP47 en favorisant la localisation nucléaire de l'HSF-1 (*Heat Shock Factor-1*) et sa fixation sur des éléments de réponse du promoteur d'HSP47²⁷⁸. Dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine, Kakugawa *et al.*, (2010) montrent une surexpression d'HSP47 dans les myofibroblastes, les pneumocytes de types II et les macrophages issus de poumons présentant une fibrose²⁷⁹. Chez des patients atteints de fibrose pulmonaire, l'accumulation de collagène dans les poumons est associée à la présence d'HSP47 dans ces mêmes cellules²⁸⁰. Par ailleurs, la pirféridone diminue l'expression d'HSP47 dans un modèle de fibrose pulmonaire murin induit par la bléomycine⁴¹. HSP47 constitue donc une cible de développement de stratégies inhibitrices pour limiter ces effets et réduire la fibrose pulmonaire²⁷⁷.

Dans le compartiment extracellulaire, et en particulier dans le sérum, on retrouve des concentrations d'HSP47 plus importantes en cas d'exacerbation aiguë en cours de fibrose pulmonaire que chez les patients fibreux sans exacerbation.²⁸¹ En revanche, le niveau sérique d'anticorps anti-HSP47 ne semble pas plus élevé chez ces patients. Le rôle d'HSP47 dans le compartiment extracellulaire reste encore à être approfondi²⁸².

III. Les petites HSPs ou « *Small HSPs* »

a) Structure des sHSP

Comme leur nom l'indique, ces *small HSP* ou sHSP sont de faible poids moléculaire (entre 12-43 kDa)²⁸³. En revanche, elles sont connues pour leur capacité d'oligomérisation et peuvent former un complexe protéique pouvant dépasser les 800 kDa²⁸⁴. Il existe 10 membres dans cette famille, dont HSPB1 (HSP27), HSPB5 (α B-crystallin), HSPB6 (HSP20) et HSPB8 (HSP22) sont les plus étudiées²⁸⁵. A l'inverse des HSPs de haut poids moléculaire, les sHSP ne sont pas dépendantes de l'ATP pour fixer leur protéine cliente. Le rôle principal des sHSP est d'éviter la formation d'agrégats protéiques létales pour la cellule. Elles travaillent étroitement avec des HSP ATP-dépendantes pour, soit renaturer la protéine non conforme, soit la guider vers le protéasome pour sa dégradation. Les sHSP possèdent une structure primaire commune avec 3 domaines conservés : un domaine α -crystallin entouré d'un domaine N-terminal flexible et d'une région C-terminale courte²⁸⁶. Concernant HSP27 et α B-crystallin, elles possèdent toutes deux un domaine WPDF dans leur région N-terminale qui est responsable de la formation des grands oligomères. Les deux protéines peuvent être phosphorylées sur des résidus sérine en position 15, 78 et 82 pour HSP27 et 19, 45 et 59 pour α B-crystallin (Figure 38A). Ce niveau de phosphorylation est d'autant plus important qu'il régule l'oligomérisation de ces protéines

(Figure 38B). C'est un processus dynamique qui orchestre la fonction de la protéine. Les gros oligomères exercent leur activité en collaboration avec les chaperonnes ATP-dépendantes afin de les dégrader ou de les replier, alors que les petits dimères/oligomères vont favoriser la polymérisation de l'actine, donc avoir un rôle structural pour la cellule²⁸³.

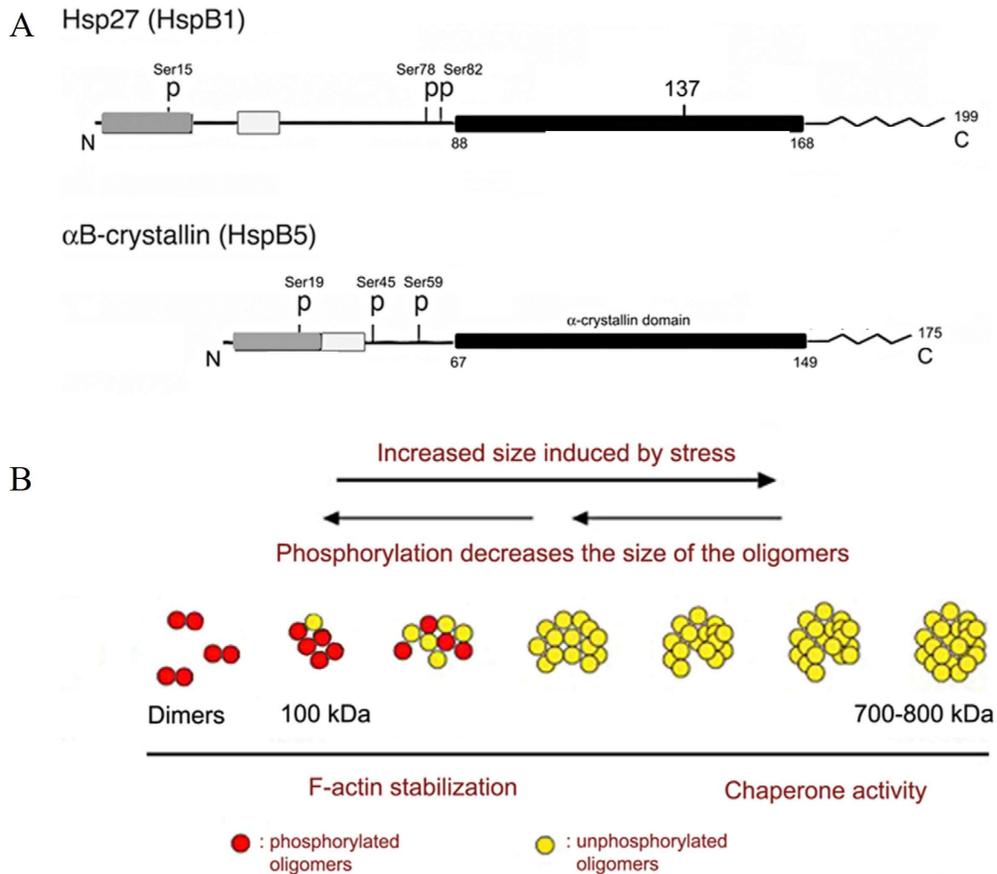


Figure 38 : Structure d'HSP27 et de αB-crystallin : A) Ces deux sHSP possèdent une structure commune avec un domaine α-crystallin (noir) entouré d'une région N-terminale et d'une queue flexible en C-terminal. On retrouve dans la région N-terminale, un domaine conservé (blanc) et le domaine WPDF (gris). La phosphorylation de ces deux protéines concerne trois résidus sérine différents (P). B) La structure tridimensionnelle de la protéine est gouvernée par son état de phosphorylation. Les dimères et petits oligomères sont constitués en majorité de protéines phosphorylées alors que suite à un stress, les sHSP adoptent une structure d'oligomères non-phosphorylés pouvant atteindre 800 kDa. Ces différents états suivent un équilibre dynamique au sein de la cellule. Issue de Arrigo *et al.*, 2007²⁸³

b) HSP27

HSP27 ou HSPB1 (HSP25 chez la souris), comme de nombreuses HSP, est impliquée dans la survie cellulaire et dans les processus cancéreux. En effet, cette protéine est surexprimée dans de nombreux cancers, par exemple dans les tissus pulmonaires et le sérum de patients atteint d'un cancer bronchique non à petites cellules. L'importance de son expression est un marqueur

de mauvais pronostic²⁸⁷. Notre équipe a montré que lors d'un stress, des petits oligomères d'HSP27 favorisent la dégradation d'IκBα et en conséquence, l'activation de la voie NF-κB. Ceci se traduit par l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire²⁸⁸. De manière générale, HSP27 stimule les voies de survie des cellules cancéreuses, la métastase et la TEM²⁸⁹ ce qui en fait donc une cible intéressante dans la recherche de thérapies anti-cancéreuses²⁹⁰. Le RP101 ou brivuldine est un nucléoside capable d'inhiber les fonctions d'HSP27 en se fixant sur cette protéine et ainsi limiter ses capacités à réduire l'apoptose en inhibant sa fixation sur les oncogènes telles que Akt1, pro-caspase 3 et cytochrome C.²⁹¹ Un essai clinique de phase II testant le RP101 couplé au gemcitabine dans le traitement du cancer pancréatique a été menée. Cette étude a montré une augmentation de la survie d'environ 2 mois chez les patients²⁹² traités par l'association, comparativement au groupe contrôle où les patients étaient traités par gemcitabine et un placebo. Le xanthone est également un composé prometteur dans des thérapies anti-cancéreuses, puisqu'il est décrit comme capable d'induire une dimérisation anormale d'HSP27²⁹³ et une sensibilité accrue des cellules issues de cancers bronchiques non à petite cellule à la radiothérapie²⁹⁴. De plus, une nouvelle stratégie d'inhibition a été développée via l'utilisation de peptides d'aptamères (PA) qui interfèrent avec l'oligomérisation d'HSP27. Les composés PA11 et PA50 se fixent spécifiquement à HSP27, et agissent comme des régulateurs négatifs d'HSP27 conduisant à l'apoptose cellulaire. Des résultats prometteurs ont été observés dans des xénogreffes de souris en combinaison avec de la radiothérapie²⁹⁵.

HSP27 est surexprimée chez les patients atteints de FPI, avec une présence accrue dans les zones de prolifération myofibroblastique^{129,296}. *In vitro*, la stimulation pro-fibrosante de cellules pulmonaires (épithéliales, mésothéliales, fibroblastes) augmente l'expression d'HSP27. HSP27 favorise la phosphorylation de ERK et de Smad3, ce qui contribue à potentialiser l'activation myofibroblastique²⁹⁷. *In vivo*, ces données ont été confirmées dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par radiothérapie. HSP27 est capable d'interagir avec IκB et ainsi potentialiser la voie NF-κB et la synthèse de facteurs pro-fibrosants²⁹⁸.

De manière très intéressante, notre équipe a breveté l'utilisation d'un oligonucléotide antisens (OGX-427), dirigé contre HSP27. Dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par administration d'Ad-TGF chez le rat, son utilisation a permis de limiter le développement de la fibrose. Dans cette étude Wettstein *et al.*, ont associé cet effet à une forte dégradation de Snail (un facteur de transcription impliqué dans la TEM) et dont HSP27 est le chaperon¹²⁹. L'OGX-

427 connaît un développement clinique en cancérologie. Un essai clinique de phase II, l'essai SPRUCE, montre que le traitement par Apatorsen (OGX-427) induit une très légère amélioration de la survie sans progression de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules de stade IV, lorsqu'il est associé au traitement carboplatine et perméthexed²⁹⁹. A ma connaissance, il n'existe pas à ce jour d'essai clinique testant l'efficacité de l'OGX-427 dans la fibrose pulmonaire.

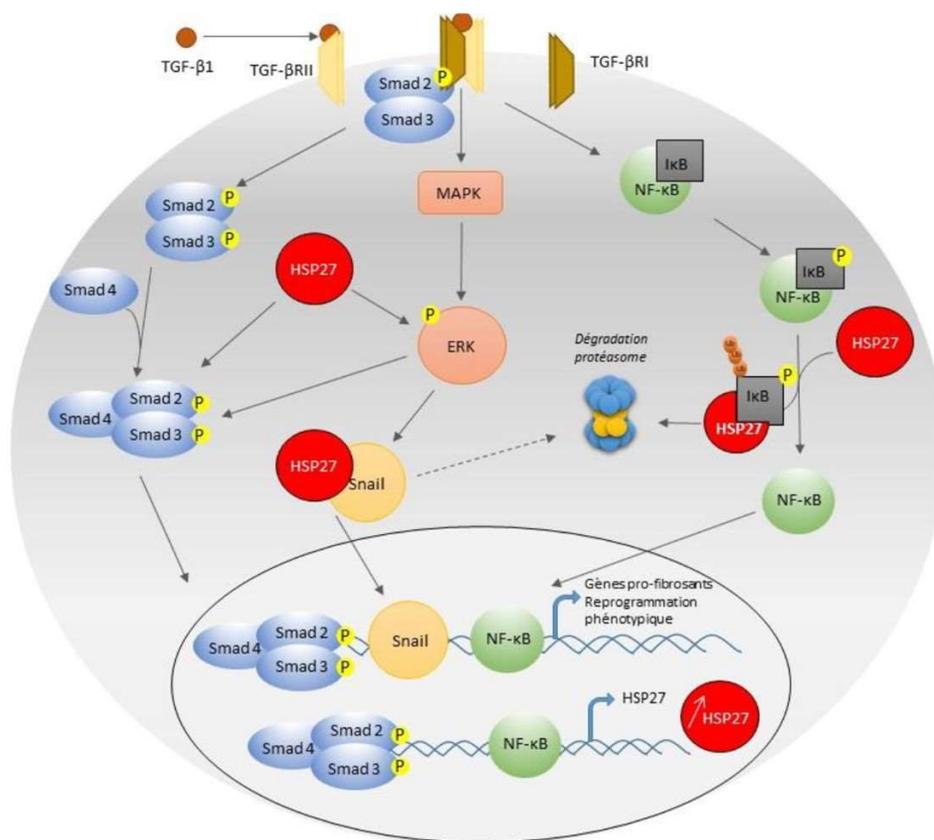


Figure 39 : Rôle d'HSP27 cytosolique en conditions pro-fibrosantes (stimulation de la voie du TGF-β1) : HSP27 favorise la phosphorylation de ERK et du complexe Smad2/3/4. HSP27 est également décrit comme un chaperon de Snail, favorisant ainsi son internalisation dans le noyau et la synthèse de gènes pro-fibrosants. HSP27 est capable d'interagir avec IκB et donc de favoriser la libération de NFκB, ce qui conduit aussi à la transcription de gènes pro-fibrosants et à l'induction de l'expression d'HSP27, ce qui amplifie le phénomène. Issue de Pommerolle *et al.*, (2020)

Bien qu'HSP27 ait été étudiée dans le compartiment cytosolique, un ensemble de travaux montrent que cette protéine peut être excrétée dans le compartiment extracellulaire. Dans un contexte d'ischémie cardiaque, HSP27 est décrit comme un DAMP ayant comme cible principale les TLRs (en particulier TLR2 et TLR4) capable d'induire une signalisation NF-κB³⁰⁰. *In vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires humaines, l'augmentation des

concentrations d'HSP27 induit des effets pro-migratoires et pro-angiogéniques via l'activation de TLR3³⁰¹. De plus, HSP27 induit l'expression et la sécrétion d'IL-10 et de TNF- α par des monocytes humains en culture et ce, via une signalisation MAPK (p38)³⁰². Sur une lignée cellulaire de monocytes cancéreux (THP-1), une étude montre qu'un traitement HSP27 induit la sécrétion d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires via encore une fois une signalisation NF- κ B³⁰³. Dans un contexte de cancer du sein, Banerjee *et al.* (2010) décrivent que la concentration d'HSP27 est augmentée dans le sérum de patientes (vs des patientes non malades). Ils montrent qu'à la suite d'une co-stimulation HSP27 et M-CSF, des monocytes humains issus de donneurs sains sécrètent davantage d'IL-10- d'IL-6, d'IL-1 β , de TNF- α et de VEGF. Enfin, dans cette même étude, HSP27 induit une augmentation de l'expression membranaire de CD206 et de CD163 dans des monocytes et donc leur transformation en macrophages de types II. L'ensemble de ces données décrivent des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires de HSP27 extracellulaire³⁰⁴. Concernant la compartimentation d'HSP27, une étude menée par l'équipe d'O'Brien, a montré la présence de HSP27 dans des vésicules extracellulaires dérivées de cellules THP-1 (lignée leucémique monocyttaire humaine). Les auteurs montrent que les exosomes enrichis en HSP27 induisent la sécrétion d'IL-10 par ces cellules.³⁰⁵ Concernant les voies d'externalisation extracellulaire d'HSP27, trois voies d'excrétion d'HSP27 sont décrites : la voie lysosomale, la translocation des protéines à travers la membrane via des canaux, et la voie impliquant les exosomes.

Ainsi, ces dernières décennies, quelques papiers ont montré les effets d'HSP27 présente dans le compartiment extracellulaire dans la physiopathologie de diverses maladies comme l'ischémie cardiaque ou le cancer. De plus, un environnement riche en HSP27 semble induire une réponse tolérogène pour certains auteurs^{302,304} et inflammatoire pour d'autres³⁰³. Bien que le rôle d'HSP27 intracellulaire a été démontré dans un contexte de fibrose pulmonaire, il n'existe aucune donnée à ce jour décrivant son rôle en cas de localisation dans le milieu extracellulaire.

c) α B-cristallin

α B-crystallin ou HSPB5 est une petite HSP présente dans de nombreux organes. Elle est abondamment présente dans le cristallin de l'œil, et son niveau d'expression est également élevé dans le cœur. On la retrouve avec une moindre importance dans presque tous les tissus dont le tissu pulmonaire. Sa mutation est associée à divers pathologies comme la maladie d'Alzheimer,

la maladie de Parkinson et certains cancers³⁰⁶. Comme HSP27, HSPB5 possède un fort pouvoir anti-apoptotique³⁰⁷ ce qui en fait également une cible potentielle dans le traitement du cancer³⁰⁸.

Dans un contexte de fibrose hépatique, α B-crystallin est surexprimée dans le cytoplasme suite à l'activation de HSC (*Hepatic Stellate Cells*) et se retrouve dans le noyau en condition de choc thermique^{309,310}. HSPB5 a également été décrite comme formant un complexe avec la protéine 14-3-3 ζ afin de la protéger d'une dégradation protéasomale. Ceci conduit à l'accumulation de 14-3-3 ζ dans la cellule et à l'activation d'Erk1/2 et de Slug, un facteur de transcription impliqué de façon importante dans la TEM³¹¹. Notre équipe a mis en évidence le rôle clé d' α B-crystallin dans la fibrose pulmonaire. En effet, Bellaye *et al.*, ont montré que cette petite protéine de choc thermique est surexprimée dans les poumons de patients atteints de FPI, surtout au niveau des foyers fibroblastiques. Sa surexpression est retrouvée dans différents modèles de fibrose pulmonaire murine, et les souris déficientes pour α B-crystallin ont une production de TGF- β 1 altérée, elles sont donc protégées de la fibrose pulmonaire induite. Les auteurs décrivent qu' α B-crystallin protège Smad4 de l'ubiquitination par l'E3-ubiquitine ligase TIF-1 γ , ce qui favorise la localisation nucléaire de Smad4. Cette localisation préférentielle de Smad4 dans le noyau favorise la transcription de gènes pro-fibrosants. L'inhibition d' α B-crystallin apparaît donc comme une stratégie intéressante dans le traitement de la FPI (Figure 40).

Il n'existe à ce jour aucune molécule capable d'inhiber spécifiquement HSPB5. Une étude s'intéressant à l'interaction d'HSPB5 avec le VEGF dont il est un chaperon, a identifié 40 composés capables *in silico* d'inhiber cette interaction. Un de ces composés, le NCI-41356 a montré des propriétés particulièrement intéressantes, dans le contexte du cancer du sein. Outre ses capacités à inhiber la liaison HSPB5-VEGF des cellules de cancer du sein triple négatif, son administration chez la souris a permis d'inhiber la croissance et l'angiogenèse tumorale induite³¹². Bien que l'effet du VEGF dans la fibrose pulmonaire reste encore mal compris, quelques études suggèrent l'intérêt du blocage des effets du VEGF dans ce contexte³¹³. L'inhibition d' α B-crystallin pour limiter la fibrose pulmonaire est une stratégie étudiée dans l'équipe du Pr. Philippe Bonniaud depuis plusieurs années.

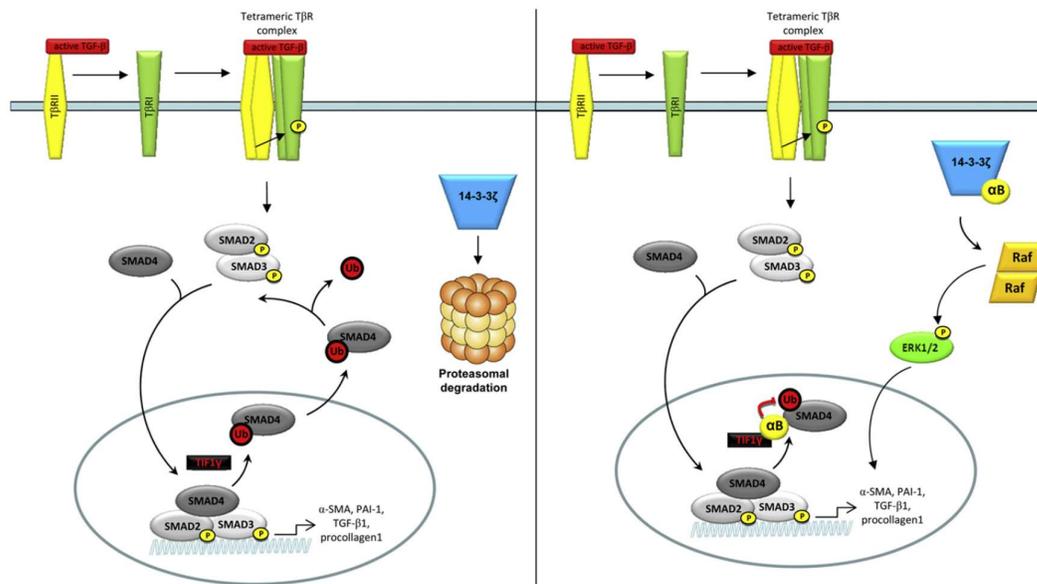


Figure 40 : Implication d' α B-crystallin dans la voie du TGF- β 1 : (Gauche). En l'absence d' α B-crystallin, la voie des Smads est régulée par l'E3 ubiquitine ligase TIF-1 γ qui ubiquitine Smad4 induisant ainsi sa sortie du noyau et sa dégradation. De plus, la protéine 14-3-3 ζ est dégradée par le protéasome l'empêchant d'induire sa signalisation. (Droite) α B-crystallin, inhibe l'ubiquitinylation de smad-4 par TIF-1 γ et son externalisation du noyau, ce qui favorise les voies pro-fibrosantes. Elle protège la protéine 14-3-3 ζ de la dégradation, ce qui favorise la signalisation ERK1/2 et donc l'expression de gènes pro-fibrosants. Issue de Bellaye *et al.*, (2014)²⁵⁸

IV. Les modèles animaux de fibrose pulmonaire

A ce jour, il n'existe aucun modèle animal de fibrose pulmonaire idiopathique. De nombreux modèles ont été développés dans le but de se rapprocher de cette pathologie. Le modèle le plus couramment utilisé est un modèle murin utilisant l'administration intra-trachéale de bléomycine. Il en existe d'autres, tels que l'injection de FITC, de silice, d'amiante, l'utilisation d'animaux transgéniques ou de vecteur viraux. Il est également important de signaler que le modèle murin de fibrose pulmonaire induite chez des souris âgées reste le plus proche de la pathologie humaine. Chacun de ces modèles possèdent des avantages et des inconvénients décrits dans le tableau 4, et pouvant constituer des arguments de choix de l'un ou de l'autre (Tableau 3)³¹⁴.

Je ne décrirai que plus précisément les modèles animaux utilisés par notre équipe c'est-à-dire bléomycine, surexpression génique de TGF- β 1, administré dans la trachée ou dans la plèvre.

MODELE MURIN	AVANTAGES	INCONVENIANTS
BLEOMYCINE (IT)	<ul style="list-style-type: none"> - Très bien caractérisé - Plusieurs voies d'administration possible - Pertinence clinique - Développement rapide (14-28 jours) 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibrose non homogène - Sans doses répétées, régression de la fibrose sous 28 jours
FLUORESCENT ISOTHIOCYANATE (FITC)	<ul style="list-style-type: none"> - Relativement reproductible et phénotype de fibrose persistante (jusqu'à 6 mois) - Développement rapide (14-28 jours) 	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de motif de PIC et d'inflammation précédent la fibrose
SILICE	<ul style="list-style-type: none"> - Modèle proche des lésions pulmonaires chez l'Homme - Persistance des lésions 	<ul style="list-style-type: none"> - Manque de reproductibilité - Difficile à délivrer - Développement lent (12-16 semaines) - Absence de lésion caractéristique de PIC
AMIANTE	<ul style="list-style-type: none"> - Modélisation de l'exposition à l'amiante chez l'Homme 	<ul style="list-style-type: none"> - Développement lent (au moins 1 mois) - Injection IT unique conduit à une fibrose centrale plutôt qu'un départ pleural
IRRADIATION	<ul style="list-style-type: none"> - Pertinence clinique de fibrose pulmonaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Développement de la fibrose très lente (supérieur à 30 semaines) - Onéreux
VECTEURS VIRAUX	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilité de surexpression d'une cytokine (ex : TGF-β1, IL-1β...) et d'observer les voies de signalisation <i>in vivo</i> - Possibilité d'adapter le tropisme 	<ul style="list-style-type: none"> - Adénovirus n'affecte que les cellules épithéliales
TRANSFERT ADOPTIF DE FIBROBLASTES HUMAIN	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilité d'étudier des fibroblastes dérivés de patients atteints de FPI 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de souris immunodéficientes (NOD/SCID)

Tableau 3 : Liste non exhaustive des modèles animaux de fibrose pulmonaire chez le rongeur faisant apparaître les avantages et inconvénients de chacun : FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique, PIC : Pneumopathie Interstitielle Commune, IT : IntraTrachéale, NOD : *Non-Obese Diabetic*, SCID : *Severe Combined ImmunoDeficiency*. Traduit et adapté de Tashiro *et al.*, (2017)³¹⁴, Moore *et al.*, (2013)³¹⁵

a) Modèle de fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine

La bléomycine est un agent antibiotique chimiothérapeutique utilisé dans le traitement de certains cancers tel que le lymphome et le cancer des testicules. Il présente une forte toxicité

pulmonaire³¹⁶, ce qui peut diminuer de façon importante le bénéfice de son utilisation thérapeutique³¹⁷. De manière générale, la bléomycine est associée, chez l'homme, à une toxicité pulmonaire dose-dépendante qui apparaît dans 2 à 42% des patients traités et qui est associée à un taux de mortalité allant de 1 à 5%³¹⁸. L'atteinte pulmonaire induite par la bléomycine présente des similitudes avec celle observée en cas FPI, avec notamment un départ sous-pleural de la fibrose³¹⁹. Le mécanisme principal de la bléomycine est d'induire la mort cellulaire. A faibles doses, elle peut induire des cassures doubles-brins et de nombreux dommages à l'ADN³²⁰. Le poumon et la peau sont particulièrement sensibles à ses effets toxiques parce que ces tissus n'expriment pas ou à des taux très faibles, la bléomycine hydrolase, une enzyme capable de dégrader ce dérivé peptidique bactérien³²¹. Récemment, l'équipe du Pr. Bonniaud a décrit l'utilisation d'une forme déglycosylée de la bléomycine comme étant tout aussi efficace que la bléomycine dans ses effets anti-tumoraux testés *in vivo* dans plusieurs modèles de cancers murins, mais n'entraînant pas le développement de la fibrose pulmonaire.³²²

Dans ce modèle, le choix de la souche murine est important. Les souris C57Bl/6J sont particulièrement sensibles à la bléomycine et sont préférentiellement utilisées³²³. Au contraire, les souches BALB/c ou SV129 possèdent une résistance à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, probablement du fait d'une altération de l'expression du TGF- β 1³²⁴. La bléomycine peut être administrée par différentes voies : l'injection intratrachéale (IT), intrapéritonéale, sous-cutanée, intraveineuse ou encore par voie inhalée (chambre d'inhalation). Cependant, la voie IT reste la plus utilisée. En réalité, il ne s'agit pas précisément d'une administration dans la trachée, mais de l'utilisation de la voie orotrachéale qui ne nécessite pas d'intubation endotrachéale de la souris, mais qui génère le même type de lésions de fibrose³¹⁴. Le modèle de fibrose pulmonaire induite par injection IT de bléomycine est très bien caractérisé (Figure 41). La bléomycine induit des lésions importantes au niveau de l'épithélium pulmonaire et la sécrétion de médiateurs inflammatoires, tels que IL-1 β , IL-6, le TNF- α et l'IFN γ . Cette période d'inflammation s'étale sur une période de 7 jours post-injection de bléomycine. Il s'en suit une augmentation de la sécrétion de facteurs pro-fibrosants, et le modèle est en particulier caractérisé par une production massive de TGF- β 1 dans le tissu pulmonaire. Le pic de production des médiateurs pro-fibrosants se situe 14 jours post-injection. Lors de la troisième semaine, on observe une production massive de MEC qui envahit les espaces alvéolaires avec une prédominance péri-bronchique et au niveau des régions sous pleurales³²⁵.

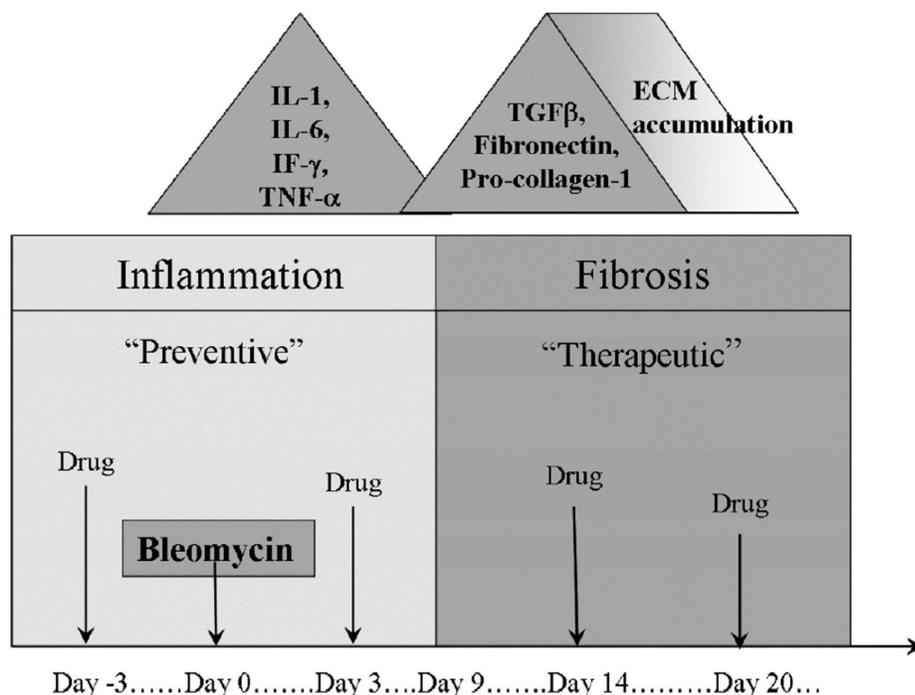


Figure 41 : Cinétique de développement de la fibrose pulmonaire post-injection intratrachéale (IT) de bléomycine : L’injection IT de bléomycine à J0 va induire de nombreuses lésions au niveau de l’épithélium pulmonaire induisant ainsi une phase inflammatoire s’étalant sur 7-9 jours. La phase inflammatoire s’éteint ensuite pour laisser place à la phase fibrosante caractérisée par l’expression du TGF-β1 et l’accumulation excessive de MEC jusqu’à une vingtaine de jours post-injection de bléomycine. Issue de Moëller *et al.*, (2008)³²⁵

Comme il l’est d’écrit sur la figure 41, le modèle est couramment utilisé pour tester des molécules pour leurs effets thérapeutiques antifibrotiques. L’administration de molécule durant la phase inflammatoire permet de conclure plutôt sur une activité préventive sur le développement de la fibrose pulmonaire, et sur des effets impactant davantage la cascade d’évènements inflammatoires qui conduit à la fibrose. La délivrance des composés actifs au cours de cette période est d’ailleurs assez controversée puisqu’elle permet difficilement de conclure sur les effets antifibrosants des composés, mais plutôt sur leurs effets anti-inflammatoires^{314,325}. Les équipes de recherche administrent plus classiquement les composés thérapeutiques après J9 post-injection de bléomycine^{326,327}.

Ainsi, bien que ce modèle soit l’un des plus utilisés et qu’il possède également des avantages indéniables tels que la simplicité de mise en œuvre et l’induction d’une fibrose plutôt homogène au niveau du parenchyme, ce modèle ne respecte pas le caractère progressif et irréversible de la FPI ainsi que son départ sous-pleural³²⁸ (Figure 42). En effet, la fibrose pulmonaire dans ce

modèle n'est pas progressive, avec un départ plutôt bronchique qui aurait tendance à régresser après 28 jours, surtout lors de l'utilisation de souris d'âge adulte³¹⁴.

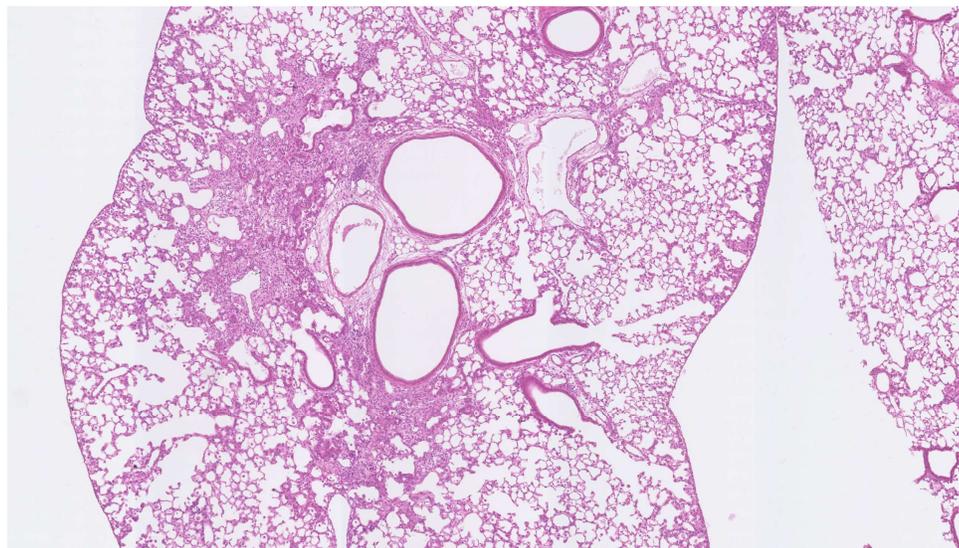


Figure 42 : Fibrose pulmonaire induite par injection intratrachéale de bléomycine : Coloration H&E de coupes histologiques pulmonaires de souris traitées par injection IT de bléomycine à 1,5mg/kg et sacrifiées 21 jours post-injection.

En 2010, Degryse *et al.*, ont proposé un modèle d'injections d'IT répétées de bléomycine qui induit des lésions plus proches histologiquement des poumons FPI, que lors d'une administration unique IT. La fibrose induite est plus sévère, et se développe dans le parenchyme des structures ressemblant à des foyers fibroblastiques¹⁵⁹.

b) Modèle de fibrose pulmonaire induite par transfert de gène du TGF- β 1

Ce modèle se base sur l'administration d'un adénovecteur qui induit une surexpression localisée du gène souhaité. Dans le cas de modèle induisant la fibrose pulmonaire, plusieurs cytokines ont été ciblées : TGF- β 1, IL-1 β , IL-13 et TNF- α ³¹⁵. Le modèle de surexpression de TGF- β 1 par injection d'un adénovirus (AdTGF- β 1) a été décrit en 1997 par Sime *et al.*. Il nécessite l'utilisation d'un adénovirus codant pour la forme active du TGF- β 1 (et non la forme latente) capable d'induire une fibrose pulmonaire. Dans ce modèle, l'administration de l'AdTGF- β 1 est effectuée par voie IT à une dose de 10^9 PFU (*Plaque Formation Unit*) chez des rats. Il en résulte une accumulation cellulaire périvasculaire et péribronchique à 7 jours post-injection (J7) (Figure 43A) qui s'étend dans le parenchyme et persiste 64 jours post-injection (Figure 43B). Les auteurs ont aussi montré que cette pluricellularité s'accompagnait d'un dépôt de MEC important dans le poumon et de l'expression d' α -SMA, caractéristique de l'activation des myofibroblastes³²⁹. Ce modèle induit une fibrose pulmonaire progressive et sévère avec une

faible inflammation en comparaison au modèle de fibrose induite par la bléomycine. L'autre avantage majeur de ce modèle est son caractère progressif puisque la fibrose pulmonaire progresse de façon autonome jusqu'à J64, Cette progression est indépendante de l'expression de la cytokine cible, induite par l'administration de l'AdTGF- β 1, puisque les auteurs ont décrit que les taux de TGF- β 1 revenaient à la normale 14 jours après son administration. Ainsi ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle central du TGF- β 1 dans l'initiation de la fibrose pulmonaire.

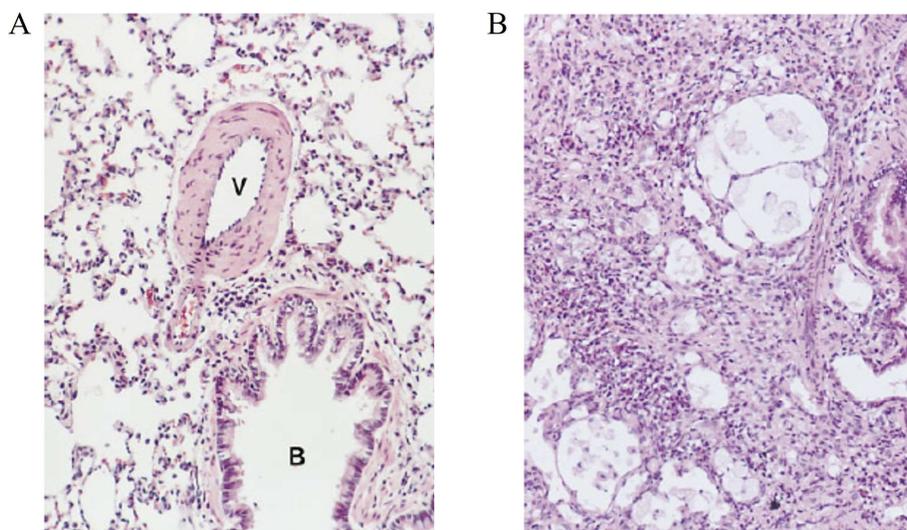


Figure 43 : Modèle de fibrose induite par injection d'adénovirus codant pour le TGF- β 1 : A) Observation de sections de poumons de rats 7 jours après injection intratrachéale (IT) d'un adénovirus codant pour le TGF- β 1 actif (AdTGF- β 1) et B) 64 jours après injection. Marquage Hématoxyline & Eosine, grossissement x250. V : structure vasculaire, B : structure bronchique. Issue de Sime *et al.*, (1997)³²⁹

Malgré ces nombreux avantages, ce modèle présente également des limites. Il nécessite une animalerie de niveau 2 et du personnel habilité à la manipulation des adénovirus. L'utilisation d'un adénovecteur vide est essentiel afin de pallier les effets non contrôlés de l'inflammation induite seulement par l'administration d'un adénovirus, ce qui multiplie le coût et le nombre d'animaux par expérimentation. De plus, les adénovecteurs utilisés possèdent un tropisme spécifique pour les cellules épithéliales ce qui limite la surexpression du TGF- β 1 à ces cellules, et ne reflète pas la réalité physiologique. Enfin, le niveau de surexpression du transgène induit lors de l'infection est bien supérieur au niveau d'expression physiologique observé en cas de fibrose ³¹⁵.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'équipe du Pr.Bonnaud a développé des modèles de fibrose pleurale chez le rat et la souris^{127,128}. L'objectif est d'induire une fibrose à

départ pleural, et le geste technique consiste donc à administrer l'adénovirus codant pour le TGF- β 1 entre les feuillets de la plèvre.¹²⁸ Cette injection se réalise dans le flanc droit au niveau du sixième espace intercostal. Pour valider le modèle, un adénovirus codant pour le gène LacZ a été utilisé. Il code pour l'expression de l'enzyme β -galactosidase. Le bon déroulement de l'injection a été vérifiée par administration concomitante du substrat de l'enzyme. Sa transformation induit la formation d'un composé bleu. La coloration du tissu pulmonaire pleural permet de valider cette voie d'administration intrapleurale (Figure 44).

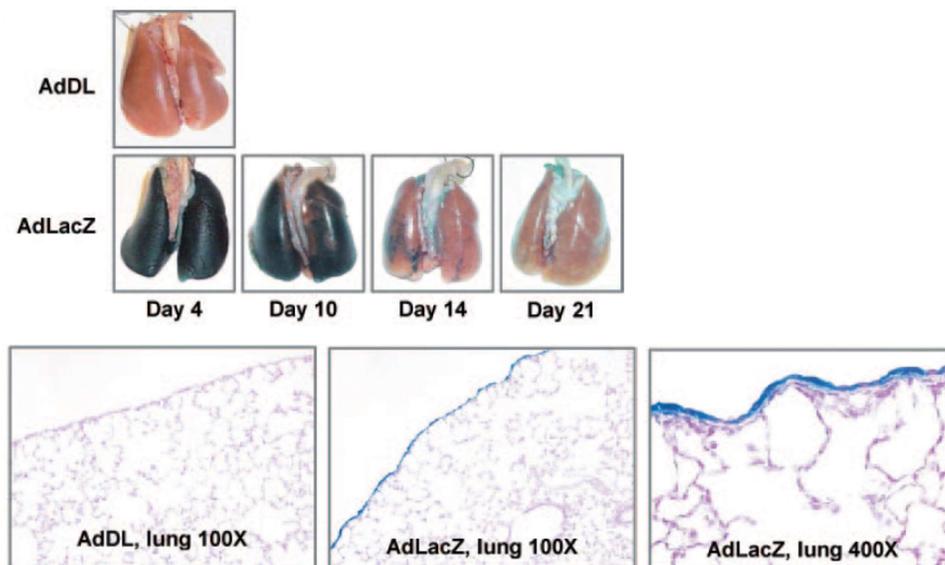


Figure 44 : Validation du modèle d'injection intra-pleurale d'un vecteur adénoviral codant pour la β -galactosidase : (Haut) Photo de poumons de rats 4, 10, 14 et 21 jours après l'injection intra-pleurale de l'adénovirus contrôle (AdDL) ou codant pour la β -galactosidase (AdLacZ). (Bas) Coupe histologique de poumons de rats 4 jours après injection intra-pleurale de l'AdLacZ. Contre coloration : « Nuclear fast Red ». Issue de Decologne *et al.*, (2007)¹²⁷.

En remplaçant l'AdLacZ par l'AdTGF- β 1, les auteurs ont développé un modèle de surexpression pleurale du TGF- β 1 et caractérisé l'évolution de la fibrose dans ces conditions expérimentales. La fibrose pleurale est progressive et se développe jusqu'à 64 jours post-administration de l'adénovirus. Ce modèle a permis de montrer l'importance des cellules mésothéliales dans le développement de la fibrose (Figure 45).

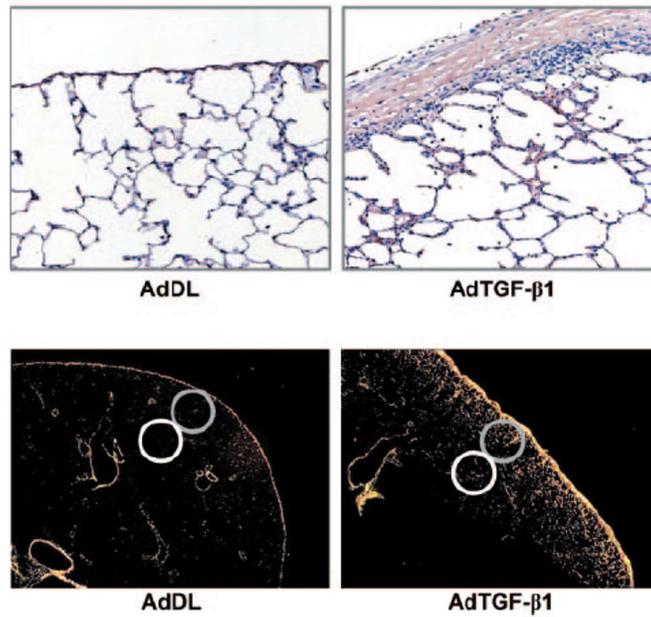


Figure 45 : Modèle de fibrose pleurale induite par injection d'adénovirus TGF-β1 : (Haut) Coupe histologique de poumon de rat montrant un marquage immunohistochimique (IHC) du collagène de type I dans la zone pleurale ainsi que dans le parenchyme pulmonaire 64 jours après l'injection d'un adénovirus contrôle (AdDL) ou d'un adénovirus TGF-β1 (AdTGF-β1). (Bas) Coupe histologique de poumon de rat suite à un marquage au rouge sirius permettant d'évaluer la présence de collagène 64 jours après l'injection d'AdDL ou d'AdTGF-β1. Le cercle gris représente une zone proche de la plèvre et le cercle blanc une zone plus profonde dans le parenchyme. Issue de Decologne *et al.*, (2007)¹²⁷

CHAPITRE IV : Objectifs de thèse

L'objectif de ma thèse est d'améliorer les connaissances des mécanismes de fibrogenèse, mais également de proposer de nouvelles solutions pour la prise en charge des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Ce travail s'articule en trois parties :

- La première a pour but de montrer l'intérêt d'inhiber les macrophages qui expriment CD206 pour réduire le développement de la fibrose pulmonaire. L'imagerie de cette population de macrophages CD206+ se révèle être prometteuse pour orienter et améliorer la prise en charge des patients mais constitue également une stratégie innovante conduisant vers une médecine personnalisée des patients souffrant de FPI.
- La seconde a consisté à étudier les effets de la petite protéine de choc thermique HSP27 lorsqu'elle est présente dans le compartiment extracellulaire, sur les mécanismes pro-fibrosants. Cet axe contribue à améliorer notre connaissance sur l'implication des HSP dans le processus de fibrogenèse et présente HSP27 extracellulaire comme un potentiel biomarqueur de la pathologie.
- Dans la dernière partie, nous avons testé un oligonucléotide antisens dirigé contre HSPB5, pour ces propriétés inhibitrices sur les mécanismes de la fibrogenèse et le développement de la pathologie.

MATERIEL & METHODES

La première partie de mes travaux étant présentée sous forme d'article scientifique comprenant l'exposé de la méthodologie, le matériel & méthode de cette étude ne sera pas présenté ici.

I. Echantillons humains pour dosage d'HSP27

Selon l'autorisation du comité d'éthique de la recherche intégrée d'Hamilton (*the Hamilton Integrated Research Ethics Board*, HIREB #00-1839), le sang des donneurs volontaires sains ou des patients atteints de FPI a été prélevé, rapidement centrifugé, les sérums aliquotés et conservés à -80°C. Le dosage sérique d'HSP27 a été réalisé en utilisant un kit ELISA (Thermofischer scientific) selon les recommandations du fabricant.

II. Les modèles animaux

Les souris étaient hébergées à l'animalerie centrale de l'Université de Bourgogne, selon des protocoles conformes aux recommandations du ministère de la recherche et de la technologie et validés par le comité d'éthique du Grand Campus Dijon.

a) Protocole d'étude *in vivo* de la sécrétion d'HSP27 dans liquides broncho-alvéolaires et pleuraux

Des souris femelles C57Bl/6 âgées de 8 semaines (Charles River) ont été traitées 3 fois par semaine avec de la bléomycine (Bleomycin Sulfate, Calbiochem®) à la dose de 15 mg/kg à raison de 100µl par injection intraveineuse par voie rétro-orbitale (maximum 6 injections). Les animaux du groupe contrôle ont été traités par une solution saline NaCl 0,9%. Les souris ont été sacrifiées à J5, J10 ou J14. Les souris ont été sacrifiées après l'injection d'un cocktail anesthésiant (Kétamine + Xylazine), puis exsanguination par section de l'aorte abdominale. Après canulation de la trachée, le prélèvement des liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA) a été effectué par injection puis aspiration de 600µl de NaCl 0,9% dans l'arbre broncho-alvéolaire. Les LBA ont été centrifugés puis stockés à -80°C avant analyse.

Des rats Sprague-Dawley (Charles River) ont subi une injection intratrachéale (IT) d'un adénovecteur dilué dans 300µl de NaCl 0,9% stérile et contenant 1.10^9 PFU (*Plaque Forming Units*) d'AdTGF-β1 ou AdDL (fournis par le Dr Martin Kolb, Hamilton University)^{329,330}. Les rats ont été euthanasiés après anesthésie profonde par exsanguination par section de l'aorte abdominale. Après une fine incision du diaphragme, 2,5mL de NaCl 0,9% ont été injectés dans l'espace pleural puis récupérés, constituant ainsi le liquide de lavage pleural (LLP). Les LLP ont été immédiatement centrifugés puis stockés à -80°C avant analyse.

b) Protocole d'étude des effets de l'administration d'rHSP27 sur la gravité de la fibrose pulmonaire

Cette expérience a été effectuée sur un modèle de fibrose induite par injections IV répétées de bléomycine comme décrit en a) et sur le même type de souris C57Bl/6 âgées de 8 semaines. Deux injections IT (J10 et J18) de la protéine recombinante rHSP27 murine (60µl à raison de 200µg/ml) ou de NaCl ont été réalisées sur des souris traitées par bléomycine et anesthésiées par isoflurane (groupes BLM+NaCl et BLM+HSP27). Elles ont été sacrifiées à 21 jours post-injection de la première dose de bléomycine (J21) sous anesthésie profonde (kétamine+xylazine) et par exsanguination par section de l'aorte abdominal. Les poumons ont été prélevés post-mortem après un lavage cardiaque avec 5mL de NaCl 0,9%. Les poumons ont été insufflés avec une solution de formol puis placés dans cette même solution pendant 24h pour fixation. L'inclusion en paraffine, la coupe et la mise sur lames ont été réalisées par la plateforme d'histologie (CellImaP, Dijon). Une coloration Hématoxyline & Eosine ainsi qu'une coloration Rouge Sirius ont été réalisées.

L'évaluation d'un score de fibrose a été réalisé suite à la coloration H&E. Ce score traduit en réalité le niveau d'infiltration et de prolifération cellulaire au sein du tissu. Ce score a été déterminée à l'aide du score Ascroft modifié³³¹ par deux investigateurs, en aveugle. Pour chaque animal dix champs d'analyse choisis aléatoirement ont été cotés par un score allant de 0 à 8. Le score de fibrose est la moyenne de ces 10 chiffres.

La quantité de collagène présente dans les tissus pulmonaires a été évaluée par marquage histologique au rouge sirius (marquage réalisé par la plateforme CellImaP, Dijon). Les coupes pulmonaires sur lames ont été observées sous lumière polarisée et dix champs aléatoires ont été photographiés sur chaque lame. Le pourcentage d'émission du marquage (logiciel Histolab/Microvision Instruments) sur chaque photo correspondait au pourcentage de collagène. La quantité de collagène contenue dans le parenchyme pulmonaire a été mesurée par un cercle de diamètre constant via l'utilisation du logiciel ImageJ. Les bronches, les vaisseaux sanguins et la plèvre ont été exclus de la mesure. Le score correspond à une unité arbitraire relatif à l'intensité du signal mesuré par le logiciel.

c) Etude des effets du LASO 22 (versus ASO 22) sur le développement de la fibrose induite par bléomycine

Des Souris C57Bl/6 femelles âgées de 8 semaines ont subi une injection IT de 60 µl de bléomycine (1,5mg/kg, Santa Cruz), sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Les oligonucléotides antisens ASO 22 et LASO-22 ont été administrés par voie IV dans la veine

caudale à J9, J11, J13, J15 et J17 post-administration de bléomycine, aux concentrations de 3, 6 ou 12 mg/kg dans du NaCl 0,9%. Dans le groupe contrôle, quatre souris ont reçu du NaCl à la place de la bléomycine. Les souris ont été sacrifiées 21 jours après l'administration de bléomycine, sous anesthésie profonde (kétamine+xylazine) et par exsanguination par section de l'aorte abdominale. Après un lavage cardiaque avec du NaCl 0,9%, les poumons ont été collectés. Le poumon gauche dans sa totalité a été recueilli pour doser le collagène. Le dosage de collagène été réalisé par l'utilisation du kit Sircol Assay (Biocolor LTD) selon les recommandations du fabricant. Le lobe supérieur droit a été dissocié en 2 parties conservées à -80° pour évaluation de l'expression génique ou protéique des marqueurs de la fibrose par RT-qPCR ou western-blot respectivement. Le reste du poumon droit a été insufflé pour réalisation de marquages histologiques, puis conservé dans un fixateur adapté.

III. **Modèle de culture *ex-vivo* de coupes pulmonaires (ou precision-cut lung slices, PCLS)**

Des coupes fines de poumons de souris ont été réalisées chez des souris C57Bl/6 anesthésiées puis sacrifiées selon le protocole précédemment décrit. Après lavage cardiaque (NaCl 0,9%) et canulation de la trachée, les poumons ont été insufflés à l'aide d'une solution d'agarose (Ultrapure™ Low Melting Point Agarose, ThermoFisher) à 2% dans du milieu de culture DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de PSA (Pénicilline G, Streptomycine, Amphotéricine). Les poumons ont ensuite été retirés de la cavité thoracique de l'animal et placés dans du milieu de culture sur glace pendant 15 min, pour permettre à l'agarose de se solidifier. Des coupes de poumons de 300µm ont été alors réalisées, à l'aide d'un Vibratome (LEICA VT1200S) et ces fines coupes de poumons ont été ensuite mises en culture dans du DMEM 10%SVF 1%PSA^{332,333}.

Ces coupes ont été réalisées sur les poumons de souris traitées par de la bléomycine 21 jours. Elles ont été mises en culture et conservées pour expérimentation 96h au total. Après un conditionnement de 24 h, les PCLS sont traitées à deux reprises durant les 72h suivantes avec du LASO 22 ou son L-scramble (Lscr), de l'ASO 22 ou son scramble (scr). Au terme de cette expérience, les PCLS sont collectées puis stockés à -80°C avant extraction pour le dosage du collagène par la technique de Sircol ou pour extraction de l'ARN pour analyse RT-qPCR.

IV. Culture cellulaire primaire

a) Les Fibroblastes Primaires Murins (FPM)

Les fibroblastes primaires de souris (FPM) ont été isolés à partir de souris C57Bl/6 âgées de 8 semaines. Les souris sous anesthésie profonde ont été euthanasiées par exsanguination (section de l'aorte abdominale). Les poumons ont été perfusés via le cœur par du NaCl 0.9% pour laver les lobes pulmonaires et ensuite placés dans un milieu de culture DMEM-high Glucose supplémenté par 20% de SVF. Après rinçage des tissus dans du PBS stérile, les poumons ont ensuite été coupés en petits morceaux et placés durant 30 à 45 min dans 1 mL de collagénase (10 mg/mL) à 37°C avec agitation toutes les 10 minutes. Après arrêt de l'action de cette dernière par dilution, le milieu a été séparé des explants par filtration. Il est ensuite déposé dans des boîtes de culture afin de faire adhérer et donc d'éliminer les macrophages. Ce milieu contenant des fibroblastes est ensuite mis en culture. Les explants ont quant à eux été placés dans une boîte de Pétri sans milieu pendant 45 minutes à 37°C, ce qui leur permet d'adhérer. Après cette étape, du milieu DMEM High Glucose supplémenté avec 20% SVF + 1% d'antibiotiques Pénicilline G, Streptomycine, Amphotéricine B (PSA) a été ajouté. Après 5 à 7 jours, les cellules mésenchymateuses commencent à se développer. Lorsque la confluence des cellules est atteinte, les cellules sont trypsinées, remises en culture et utilisées pour les expérimentations jusqu'à 3 passages.

b) Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM)

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont générés à partir des tibias et fémurs de la même souris. Brièvement, les muscles sont dissociés des os au moyen de sopalin, puis les extrémités sont coupées aux ciseaux. Les os sont ensuite flushés, avec une seringue contenant du PBS, sur filtre 0.7µm. Une première centrifugation est réalisée afin de culoter les cellules, puis une lyse des globules rouges est effectuée à l'aide d'une solution hémolytique. Les cellules dépourvues de globules rouges sont ensuite culotées et reprises dans du RPMI 1640 glutamax supplémenté de 10% de SVF et 1% de PSA. Les monocytes sont ensuite mis en culture avec 20ng de M-CSF pendant environ 5 jours (renouvellement à J+2) avant d'être traités.

c) Macrophages humains dérivés de *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC)

Les monocytes humains contenus dans les concentrés leuco-plaquettaires (CLP) humains fournis par l'Etablissement Français du Sang de Bourgogne Franche-Comté (Dijon) ont été purifiés par gradient de densité. Pour cela, le CLP a été dilué 2 fois dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Dutscher) avant d'être déposé sur une couche de polyfluorocarbone liquide

(Ficoll). Le tube est centrifugé puis l'anneau blanc intermédiaire, contenant les cellules blanches mononuclées (PBMC pour « *Peripheral Blood Mononuclear Cells* »), a été récupéré. Les cellules ont été lavées puis re-suspendues dans un tampon d'hémolyse pendant 5 minutes à 4°C. Les PBMC sont lavées puisensemencées. Un premier traitement a été réalisé afin d'amorcer la différenciation des monocytes en macrophages. Pour cela, du M-CSF (*Monocyte Colony-Stimulating Factor*) a été ajouté au milieu à une concentration de 100 ng/ml. Une seconde stimulation a été réalisée après 72h (J3) par renouvellement du milieu de culture.

V. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales humaines (A549) ont été cultivées dans du DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) high glucose (Dominique Dutsher) supplémenté avec 10% de SVF. Les cellules fibroblastiques pulmonaires humaines ont été cultivées dans du milieu EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) supplémenté avec 10% de SVF. Les cellules mésothéliales pulmonaires humaines (MeT-5A) ont été cultivées dans du Medium-199 supplémenté avec du L-glutamine et 25mM d'HEPES supplémenté avec 10% de SVF.

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Avant traitement, la croissance des cellules est stoppée à la confluence désirée par privation de milieu nutritif (1% de SVF dans le milieu de culture) durant 24h. Dans le cas où le milieu de culture est récupéré dans le but de le concentrer pour la mise en évidence par western-blot d'une protéine, le milieu utilisé est le milieu de culture Opti-MEM I Gibco® (ThermoFisher Scientific).

a) Les traitements cellulaires

- TGF-β1 recombinant (rTGF-β1) (R&D systems) : 10 ng/ml pendant 24 ou 48h.
- HSP27 recombinant (rHSP27) : Deux protéines recombinantes sont utilisées. Une recombinante humaine HSP27 (ADI-ESP-715, Enzolife) pour le traitement sur cellules humaines et une recombinante murine HSP25 (non référencée, low endotoxin, Enzolife). Afin de faciliter la compréhension des expériences, nous parlerons uniquement de rHSP27 qui peut à la fois faire référence à la forme humaine (rHSP27) ou murine (rHSP25) en fonction de la nature des cellules. Les cellules sont traitées à raison de 10µg/ml ou 30µg/ml pendant 30min, 1h, 24h ou 48h. Un traitement contrôle est réalisé avec le tampon dans lequel est formulé la protéine recombinante. Lorsque ce contrôle est réalisé, la mention CT est suivie de (buffer). Ceci permet de s'affranchir des effets résiduels d'endotoxines présentes dans la solution de protéine recombinantes.

- HSP27 recombinante His tag (HSP27-His) (R&D systems) : La protéine contient un tag poly-histidine en position C-terminale. Le traitement est effectué à une concentration de 10µg/ml selon le temps indiqué.
- Anticorps bloquant les TLRs : Les cellules sont pré-incubées 1h avant un traitement HSP27 avec des anticorps bloquant TLR4 (Biolegend, 312813) ou TLR2 (Biolegend, 153001) à une concentration de 1, 10 ou 20 µg/ml. Les anticorps ne sont pas retirés lors du traitement rHSP27.
- Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) : Le traitement par LPS (1h, 100 ng/mL) est utilisé comme contrôle positif d'activation des récepteurs TLR.
- ASO 22/LASO 22 : Ces ASO sont synthétisés par l'équipe du Dr Palma Rocci (UMR-INSERM 1068). ASO 22 et LASO 22 sont utilisés à une concentration de 100nM sur une période de 72h pour traiter les PLCS *ex vivo*. In vitro, les cellules sont traitées 48h par l'ASO 22 à 100 nM et par le LASO 22 à 25nM ou 100nM, selon l'expérimentation.

b) Protocole de concentration d'un milieu de culture

Pour mettre en évidence l'HSP27 sécrétée par les cellules dans le milieu de culture, par western-blot, nous avons dû avoir recours à la concentration des surnageants cellulaires. Pour ce faire, les surnageants sont passés sur colonnes 10k (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices, Merck Millipore), ce qui permet de ne retenir que les protéines de poids moléculaire supérieur à 10kD. Après centrifugation à 14 000 G pendant 17 min sur ces colonnes, le milieu de culture est récupéré du filtre de la colonne par retournement de cette dernière dans un tube eppendorf, et une centrifugation de 2 min à 1000g. L'échantillon est ensuite mélangé à une solution de Leammi puis stocké à -20° avant analyse.

c) Transfection

Les cellules sont transfectées avec l'ASO 22 ou son scramble (scr) à l'aide d'un agent transfectant TransIT-X-2 (Mirus) selon les recommandations du fournisseur avec un ratio 1µg d'ADN pour 1,5µl d'agent transfectant.

d) Utilisation des milieux conditionnés après traitement par rTGF-β1 immunodéplété ou non par HSP27

Après un traitement de 24h avec du rTGF-β1, le milieu de culture est récupéré puis incubé sur la nuit à 4°C sur roue, au contact de billes A/G⁺ (60µl par condition) (Protein A/G PLUS-agarose, Santa-Cruz) préalablement coâtées avec des immunoglobulines (Ig) (Santa-Cruz) ou des anticorps dirigés contre HSP27 (ADI-SPA-803, EnzoLife), à raison de 1µg d'anticorps (Ac)

ou d'Ig par condition. Une deuxième série de cellules est alors incubées 48h avec ce milieu conditionné. Les billes ayant permis l'immunodéplétion sont récupérées afin d'être éluées par 50µl de Laemmli 2X, 10 min à 95°C sous agitation. Les échantillons protéiques en Laemmli sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

VI. Western-Blot

Les cellules sont récupérées et lavées au PBS1X puis incubées avec un tampon de lyse RIPA (NaCl 150mM, Tris HCL 50mM, EDTA 1mM, EGTA 0,5mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1% et Na déoxycholate 0,1%) complétement avec un inhibiteur de protéases (PIC, Sigma) et des inhibiteurs de phosphatases, pendant 45 min à 4°C. S'en suit une étape de centrifugation (10min à 16 000 G, 4°C) afin de récupérer le surnageant contenant les protéines. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Lowry modifiée à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Les échantillons protéiques sont ensuite dénaturés 5 min à 95°C dans du Laemmli et une quantité de 20 à 50µg de protéines est déposée sur gel de polyacrylamide (de 8 à 12% selon l'analyse). La séparation par migration dans le gel s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 60V (20min) puis 120V (2h) dans un tampon de migration (Tris 25mM, glycine 200mM, SDS 0,01%). Les protéines sont ensuite transférées du gel de migration sur une membrane de PolyVinylideneFluoride (PVDF) ou de nitrocellulose (GE Healthcare Europe GmbH). Le transfert s'effectue à 50V pendant 2h dans un tampon de transfert Tris-glycine éthanol (20%). Les membranes sont ensuite saturées dans une solution de BSA (*Bovine Serum Albumin*) 4% pendant 45 min à température ambiante sous agitation, puis incubées à 4°C sur la nuit dans une solution d'anticorps primaire (Tableau 4) diluée selon les recommandations du fabricant. S'en suivent 3 lavages PBS-Tween 0,1% et l'incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase diluée au 5000^{ème} dans une solution de BSA 1%. De nouveau, 3 lavages sont effectués puis les membranes sont séchées et mises en contact avec un réactif chimiluminescent (solution ECL, Santa-Cruz Biotechnology, et/ou Luminata Crescendo Western HRP substrate, Millipore). La luminescence est révélée avec l'appareil ChimiDoc XRS+ (Bio-Rad) et les résultats sont analysés avec le logiciel Image Lab (version 5.1 build 8, Bio-RA laboratories).

Anticorps	Références	Anticorps	Références
HSP27	Enzo Life Sciences, ADI-SPA-803, ADI-SPA-800	β -actine	Sigma 1978
HSP25	Enzo Life Sciences, ADI-SPA-801	α SMA	Abcam ab5694
HSC70	Santa-Cruz sc7298	P-ERK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling 9106
E-cadhérine	Cell Signaling 3135	ERK	Cell Signaling 9107
N-Cadhérine	Cell Signaling 40619	P-Akt (Ser473) (587F11)	Cell Signaling 4051
Vimentine	Cell Signaling 3932	Akt (40D4)	Cell Signaling 2920
PAI	ThermoFisher Scientific, MA5-17171	P-p65 (Ser536) (93H1)	Cell Signaling 3033
Fibronectine	Novus Bio, NBP1-912258	P65 (D14E12)	Cell Signaling 8242
Collagène	Sigma Prestige, HPA008405	P-I κ B α (Ser32/36)	Cell Signaling 9246
α B-crystallin	Enzo Life Sciences, ADI-SPA-222	I κ B α	Cell Signaling 9242

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisé pour le western-blot

VII. RT-qPCR

Les ARN totaux des cellules ou des morceaux de poumons sont extraits à l'aide de TRIzol (Ambion). Les poumons ont été broyés dans 1ml de TRIzol avec un Ultra-Turrax. S'en suit une extraction par séparation de phase avec ajout de chloroforme, puis d'isopropanol qui nous permet de précipiter l'ARN. L'ARN est alors resuspendu dans de l'H₂O « RNAase-free » après 2 lavages à l'éthanol 70%. La concentration d'ARN est mesurée au moyen d'un nanodrop (NanoDrop 2000). La transcription inverse a été réalisée par le kit M-MLV (Promega). Brièvement, les ARN ont été mixés avec des amorces aléatoires hexamériques et chauffés 5 minutes à 70°C pour l'hybridation. La reverse-transcriptase, un inhibiteur de RNAases et un cocktail de désoxyriboNucléotide TriPhosphate (dNTP) sont ajoutés puis chauffés 60 min à 37°C puis 10 min à 65°C. La Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative en Temps Réel (RT-qPCR) a été réalisée sur les ADNc ainsi obtenus en utilisant le « SYBR green master mix » (Applied Biosystems). Les séquences d'amorces humaines/murines sens et anti-sens utilisées sont décrites dans le tableau 5. La q-PCR a été réalisée dans des plaques de qPCR de type Micro Amp FAST OPTICAL. Le programme ViiA7 (Applied Biosystems) a permis l'analyse. La méthode de quantification relative $2^{-\Delta\Delta CT}$ a été utilisée pour déterminer l'expression des différents gènes. Les valeurs de Ct (*Cycle Threshold*) de gènes cibles ont été normalisés avec un gène de référence (L32, Actine- β)

Amorces humaines			Amorces murines		
Gènes	Sens (S)	Anti-sens (AS)	Gènes	Sens (S)	Anti-sens (AS)
<i>PAI</i>	5'CTGGGTTTCTCA CCCTATGG 3'	5'CTGGGTTTCTCCTCC TGTTGTC 3'	<i>IL-10</i>	5'TGCTAACCAGACTCC TTAATGCAGGAC 3'	5'CCTTGATTCTGGGCCA TGCTTCTC 3'
<i>TGF-β1</i>	5'CTGCTGTGGCTA CTGGTCC 3'	5'CTTCACCAGCTCCAT GTCGAT 3'	<i>IL-1β</i>	5' CAC CAAGCT TTT TTG CTG TGA 3'	5' GCACGATGCACCTGT ACGAT 3'
<i>SNAIL</i>	5'ACCCCAATC GGAAGCCTAAC 3'	5'AGGGCTGCTGGAAGG TAAAC 3'	<i>CXCL10</i>	5'GACGGTCCGCTGCA ACTG 3'	5'GCTTCCTATGGCCCTC ATT 3'
<i>IL-1β</i>	5' CACCAAGCTTTT TTGCTGTA3'	5'GCACGATGCACCTGT ACGAT 3'	<i>L32</i>	5' GAA ACT GGC GGA AAT CCCA 3'	5' GGATCTGGCCGAAC CTT 3'
<i>PPARγ</i>	5'GGGTCATATAAA GTCACCAA 3'	5'GCTGTGCAGGAGATC ACAGA 3'	<i>HSPB5</i>	5'AGGGAAGTGGCTGT TGAGAAG 3'	5'GCCTCTCGACCAGTTC TTCG 3'
<i>MRC1</i>	5'GGGCAGTGAAAG CTTATGGA 3'	5'CCTGTCCAGGTATGTTT GCTCA 3'	<i>Actine-β</i>	5'AGAGCTACGAGC TGCCTGAC 3'	5' AGCACTGTGTTGGCG TACAG 3'
<i>TNF-α</i>	5'TCCTTCAGACACC CTCAACC 3'	5'AGGCCCCAGTTGAA TTCTT 3'			
<i>Actine-β</i>	5'AGAGTACG AGCTGCCTGAC 3'	5'AGCACTGTGTTGGCG TAAG 3'			

Tableau 5 : Amorces humaines/murine de qPCR

VIII. Tests de cicatrisation

Des cellules A549 ont été cultivées dans des plaques 6 puits jusqu'à une confluence d'environ 80%. Une blessure a ensuite été réalisée sur un diamètre de la zone de culture de chaque puits à l'aide d'une pointe de cône stérile (environ 1mm de largeur). Les cellules ont été incubées 72h avec du TGF-β1, du TGF-β1+rHSP27 ou du milieu contrôle (CT). Les plaques ont ensuite été placées dans une atmosphère humide contrôlée (37°C, 5% CO₂) sous un microscope Zeiss équipé d'une caméra vidéo haute résolution. Des images ont été réalisées automatiquement sur 3 champs par puits toutes les heures pendant 72h. L'analyse de ces images (temps définis : 0h, 15h, 30h, 48h et 72h) a permis de mesurer le pourcentage de recouvrement de la blessure dans chacune des conditions testées. L'analyse de ces images a été réalisée grâce à la macro Wound Healing Tool (Image J).

IX. Immunofluorescence

Des cellules A549 ont été mises en culture sur des coverslips de diamètre 13mm et d'épaisseur No.1,5 (Cover Glass, VWR). Une fois la confluence cellulaire désirée obtenue, le milieu de culture est retiré puis les cellules sont lavées avec du PBS. Les cellules sont ensuite fixées par ajout de paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 15min. Les lamelles sont ensuite lavées plusieurs fois avec du PBS puis de la glycine 100mM. Afin de permettre aux anticorps de pénétrer dans la cellule, une perméabilisation est réalisée par ajout de PBS-Triton 0,1% durant 5min. Il est important de noter que l'expérience de colocalisation d'HSP27-His avec TLR4 a été réalisée sur cellules vivantes fixées avec un faible pourcentage de PFA (0,5%) afin de ne pas perméabiliser les cellules mais de stopper le métabolisme cellulaire.

S'en suit une étape de saturation avec du PBS-BSA 5% pendant 20 min sous agitation, puis l'incubation des anticorps primaires (Tableau 6) toute la nuit à 4°C en chambre humide. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS puis incubées pendant 45 min à température avec l'anticorps secondaire couplé à Alexa Fluor® Plus 488 (Polyclonal Goat Secondary Antibody, Thermofisher, A11008) pour détecter l'anticorps dirigé contre le His tag (vert). Un autre lavage est effectué puis une autre incubation avec un anticorps secondaire couplé à Alexa Fluor® Plus 568 (Polyclonal Goat Secondary Antibody, Thermofisher, A10042) pour l'anticorps dirigé contre le TLR4 et p65 (rouge). Les cellules sont ensuite mises en contact avec du DAPI (milieu de montage ProLong® Gold Antifade Moutant with DAPI, Thermofisher) sur lames frost toute la nuit à l'obscurité. Les lames sont finalement analysées par un microscope de fluorescence.

Anticorps	Références	Dilution	Isotype
His tag	Novus Biologicals, NBP1-31055	1/1000	Mouse
TLR4	Novus Biologicals, NB100-56580	1/100	Rabbit
p65 (D14E12)	Cell Signaling 8242	1/1000	Rabbit

Tableau 6 : Anticorps primaires pour Immunofluorescence

X. Cytométrie en flux

Les Macrophages sont récupérés par action d'une accutase pendant 30min puis lavées avec du PBS avant marquage. Les cellules sont culotées par centrifugation 300 G, 5 min et le culot est resuspendu dans une solution saturante (Stain buffer, 554656 BD biosciences) contenant des anticorps bloquants les récepteurs Fc (FcR Blocking reagent, 130-059-901, Miltenyi Botec). Les cellules sont ensuite lavées et incubées 30 min avec un panel d'anticorps primaires (Tableau 7). Les anticorps sont dilués dans la solution saturante. Les cellules sont ensuite lavées à deux reprises avec du PBS avant analyse au cytomètre. Juste avant l'analyse, du 7-AAD a été ajouté afin d'exclure les cellules mortes. L'analyse s'est effectuée sur un LSR Fortessa (BD Biosciences, USA). Un minimum de 20 000 évènements CD11b positifs ont été sélectionnés. Les valeurs de compensation ont été déterminées par l'utilisation de billes de compensation (BD™ Comp Beads anti-Mouse Ig κ, 552843, BD Biosciences) selon les recommandations du fabricant. L'analyse et le calcul des compensations ont été effectués sur le logiciel FlowJo Version 10.7.2 (Treestar Inc, USA). L'expression des marqueurs est présentée par l'expression de l'intensité de la médiane de fluorescence (MFI). Les contrôles FMO (*Fluorescence Minus One*) ont été réalisés pour chaque expérience ainsi que les contrôles isotypiques.

Cibles	Fournisseur	Référence	Clone	Hôte	Isotype	Fluorochrome	Bande Pass	Dilution
CD11b	BD	557918	44	Mouse	IgG1, κ	AF700	730/45	1/200
CD80	Ozyme	305220	2D10	Mouse	IgG1, κ	APC	670/14	1/100
HLA-DR	BD	561224	G46-6	Mouse	IgG2a, κ	V500	525/50	1/200
CD206	BD	555954	19.2	Mouse	IgG1, κ	PE	586/15	10 μ l/test

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage cytométrie

XI. Analyses Statistiques

La comparaison entre deux groupes a été réalisée en utilisant le teste t non-paramétrique Mann-Whitney. La comparaison entre plusieurs groupes a été réalisée en utilisant le test ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

RESULTATS

Premier Projet : Les macrophages alvéolaires CD206+ comme cible théranostique de la fibrose pulmonaire

Les macrophages alvéolaires occupent une place importante dans la fibrogenèse pulmonaire. Selon l'environnement immunologique, les macrophages peuvent se différencier en phénotypes M1 plutôt pro-inflammatoire ou M2 plutôt anti-inflammatoire et pro-fibrosants. Le développement de la fibrose pulmonaire s'accompagne d'une infiltration tissulaire de cellules macrophagiques au phénotype M2 dominant. Il est connu que ces cellules sont des producteurs majeurs de TGF- β 1, une des principales cytokines impliquées dans la transformation mésenchymateuse des cellules pulmonaires et dans le développement de la fibrose. Les macrophages M2 expriment à leur surface le récepteur CD206, qui est couramment utilisé pour la caractérisation de ce phénotype. Dans cette partie de mon travail de thèse, nous avons mis en avant :

- L'augmentation de l'expression des macrophages alvéolaires CD206+ en cas de fibrose dans le tissu pulmonaire humain ou murin, et la corrélation entre cette expression et la gravité de la pathologie.
- L'intérêt d'utiliser le CD206 comme un marqueur de suivi et de pronostic du développement de la fibrose
- L'efficacité d'un inhibiteur du CD206 à limiter le développement de la fibrose

Ce travail a donné lieu à un article, dont je suis le premier auteur, soumis dans le journal « *Nature Communication* » (IF 2020 : 14,9) et est actuellement en révision.

1 **Title: CD206⁺ alveolar macrophages are theranostic targets in experimental lung fibrosis**

2 **Authors:** Lenny Pommerolle^{1,2}, Hugo Sikner³, Olivier Burgy^{1,2}, Julie Tanguy^{1,2}, Lucile
3 Dondaine^{1,2}, Nicolas Pernet^{1,4}, Victor Goncalves⁵, Alexanne Bouchard³, Marie Monterrat³, Anaïs-
4 Rachel Garnier³, Carmen Garrido¹, Bertrand Collin^{3,5}, Philippe Bonniaud^{1,2*}, Françoise
5 Goirand^{1,2†}, Pierre-Simon Bellaye^{2,3†}.

6 **Affiliations:**

7 ¹*INSERM U1231, Equipe HSP-pathies, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of*
8 *Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France.*

9 ²*Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adultes de Dijon, réseau*
10 *OrphaLung, Filère RespiFil, Centre Hospitalier Universitaire de Bourgogne, Dijon, France.*

11 ³*Centre George-François Leclerc, Service de médecine nucléaire, Plateforme d'imagerie et de*
12 *radiothérapie précliniques, 1 rue du professeur Marion, Dijon, France.*

13 ⁴*Plateforme de Cytométrie, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc*
14 *21000 Dijon, France.*

15 ⁵*Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR CNRS 6302, Université de*
16 *Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France.*

17 *Corresponding author. Email: philippe.bonniaud@chu-dijon.fr.

18 † These authors contributed equally to this work

19 **One Sentence Summary:** CD206⁺ macrophage inhibition reduces lung fibrosis (LF) in mice and
20 CD206 *in vivo* imaging to guide targeted therapy is a promising tool towards personalized
21 medicine in LF.

22 **Abstract:** Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive disease characterized by an
23 excessive collagen deposition leading to functional decline. Therapeutic options for IPF are limited
24 to nintedanib and pirfenidone which are only able to reduce fibrosis progression. CD206-
25 expressing M2 macrophages are involved in fibrosis progression. Whether CD206⁺ macrophages
26 may be relevant therapeutic targets or biomarkers remain an open question. In our study, CD206⁺
27 lung macrophages were monitored in bleomycin-induced lung fibrosis in mice by combining flow
28 cytometry and *in vivo* molecular imaging using a SPECT radiopharmaceutical, ^{99m}Tc-tilmanocept,
29 targeting CD206. We demonstrate that CD206⁺ macrophages are increased in correlation with
30 collagen from early to advanced stages of the disease and in IPF lung biopsies. We demonstrate a
31 decrease in CD206⁺ lung macrophages upon treatment with nintedanib and tofacitinib, a known
32 inhibitor of M2 macrophages. Tofacitinib also reduced lung fibrosis. Thus, M2 may be a relevant
33 theranostic target towards personalized medicine in IPF.

34 **INTRODUCTION**

35 Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a rare and devastating chronic interstitial lung disease with
36 a poor median survival (5 years, ¹) and an increased prevalence in the elderly population ².
37 Currently, no curative treatment is available to reverse or even stop the disease progression. Only

38 nintedanib and pirfenidone are commonly used and slow down lung function decline ^{1,3}. IPF is
39 characterized by the usual interstitial pneumonia (UIP) histopathological and imaging pattern and
40 because of its rare and diffuse form, early diagnosis is a clinical challenge. Despite increasing
41 knowledge, the physiopathology of IPF remains misunderstood and finding new therapeutic
42 targets and associated biomarkers are major clinical concerns. While High-Resolution Computed
43 Tomography (HRCT) considerably improved IPF diagnosis ², a significant number of patients
44 requires invasive procedures such as lung biopsy with a high associated morbidity and mortality.
45 As there is currently no tool to predict disease progression in IPF patients, the discovery of non-
46 invasive biomarkers to promote early diagnosis and monitor fibrosis evolution is key to improve
47 patients' outcome and therapy efficiency. The unpredictable interpersonal-variability of current
48 anti-fibrotic drugs, pirfenidone and nintedanib, in term of efficiency is another evidence that IPF
49 biomarkers are desperately needed. Accordingly, new imaging predictive biomarkers may
50 constitute candidates to ameliorate patients' care towards personalized managements of IPF
51 patients.

52 Macrophages have been recently described as cells involved in the physiopathology of IPF ⁴.
53 Depending on the microenvironment, macrophages can be classically activated as pro-
54 inflammatory (M1) or alternatively activated as anti-inflammatory/pro-fibrotic (M2)
55 macrophages. IPF lungs are predominantly infiltrated by M2 macrophages during the course of
56 disease development and progression ⁵. Interestingly, M2 macrophages produce high levels of
57 profibrotic mediators such as TGF- β 1, one of the main cytokines involved in fibrosis ⁶, which
58 induce myofibroblast activation and *in fine* fibrosis progression ⁷. In addition, M-CSF is a well-
59 known actor of lung fibrosis which drives the recruitment of macrophages in the lungs and
60 promotes their polarization into the M2 phenotype ⁸. M2 macrophages express CD206 on their

61 surface, a C-type lectin mannose receptor, which is commonly sought to identify M2 polarization.
62 Interestingly, M2 macrophages have been used as therapeutic targets or imaging biomarkers
63 through CD206 in other diseases such as rheumatoid arthritis (RA) or cancer^{9, 10}. Technetium-
64 99m labelled tilmanocept (^{99m}Tc-tilmanocept, Lymphoseek™), is a radiopharmaceutical
65 diagnostic imaging agent designed for the sentinel lymph nodes mapping through the targeting of
66 their abundant M2 macrophages content. This radiolabelled probe is suitable for *in vivo* Single
67 Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging, and is able to bind mannose receptors
68 (CD206) expressed by M2 macrophages with a very high affinity¹¹. The Janus-associated Kinases
69 JAK 1 and JAK 3 inhibitor Tofacitinib has recently been shown to reduce CD206 expression in
70 M2 macrophages¹². Interestingly, Tofacitinib is currently evaluated in clinical phase I/II trials for
71 systemic sclerosis (NCT03274076) and has been approved for RA¹³, both diseases with lung
72 fibrosis involvement. Tofacitinib has also been shown to reduce lung fibrosis in a bleomycin-
73 induced model of scleroderma and RA-associated interstitial lung disease^{14, 15}.

74 In this context, the aim of this study was first to identify the cellular population driving CD206
75 expression in the lungs and to determine whether CD206⁺ macrophages may be relevant
76 therapeutic targets or biomarkers in lung fibrosis. ^{99m}Tc-tilmanocept was used to monitor CD206⁺
77 macrophages during lung fibrosis progression. The impact of the anti-fibrotic drug nintedanib on
78 CD206⁺ macrophages was evaluated and the anti-fibrotic potential of tofacitinib was tested in
79 experimental lung fibrosis.

80

81 **Results**

82 **CD206 tracking in bleomycin-induced lung fibrosis**

83 Flow cytometry phenotyping and an unsupervised visual implementation of t-distributed stochastic
84 neighbor embedding (t-SNE) analysis were used in order to study lung macrophages at several
85 stages of BLM-induced lung fibrosis. Our t-SNE analysis was based on 7 markers (CD45, CD11b,
86 CD11c, F4/80, Ly6g, SiglecF and CD206) and clusterization was performed in order to obtain 10
87 clusters of pulmonary cells identified according to the expression levels of phenotypic markers as
88 previously described (Fig. 1A-B, ¹⁶). Regarding macrophages, 4 populations were identified.
89 Tissue resident-alveolar macrophages (TR-AMs) were defined as CD45⁺, CD11b⁻, F4/80⁺,
90 CD11c^{high}, CD206^{high}, SiglecF⁺. On the contrary, the interstitial macrophages (IMs) did not express
91 CD11c but were described as CD45⁺, F4/80⁺, CD11b⁺, CD11c⁻, SiglecF⁻, CD206⁻. Interestingly,
92 we could observe another IMs population, that we called IMs3 and which has been described by
93 *Gibbins et al.*, characterized by the acquisition of CD11c (CD45⁺ F4/80⁺ CD11b⁺ CD11c^{low}
94 SiglecF⁻ CD206⁻, ¹⁷). The last subpopulation of macrophages was defined as a recruited population
95 following bleomycin injury and was called recruited monocyte-derived macrophages (RM-DMs)
96 identified as CD45⁺ F4/80⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ CD206^{high} SiglecF^{low}.
97 Interestingly, t-SNE analysis showed a high CD206 expression mainly in two macrophages
98 populations: RM-DMs and TR-AMs (Fig. 1C). IMs and IMs3 did not express CD206 compared
99 to RM-DMs and TR-AMs. To note, the apparent expression of CD206 by eosinophils represented
100 an artefact due to their autofluorescence in the phycoerythrin (PE) channel as previously described
101 ¹⁸. All the other clusters did not express CD206 (Fig. 1B), therefore our study focused on RM-
102 DMs and TR-AMs. A t-SNE representation of CD11b compared to CD206 indicated that only
103 RM-DMs co-expressed CD206 and CD11b (Fig. 1C).
104 Fig 1D shows the evolution of the different clusters at each time point upon BLM challenge
105 compared to control mice (NaCl). As expected, RM-DMs were not found in control mice in which

106 macrophage population was mostly composed of TR-AMs (Fig. 1D). At day 8 post-BLM, a RM-
107 DMs population arose in BLM treated mice. This new macrophage population remained present
108 throughout the BLM challenge even during the fibrosis phase (from D8 to D21, Fig. 1D). On the
109 contrary, TR-AMs arose only from D15 to D21 in BLM-treated mice and were significantly higher
110 compared to NaCl and BLM-treated mice at D8 (Fig. 1D). No changes in the IMs population was
111 observed (Fig. 1D).

112 In order to quantify the expression of CD206 in TR-AMs and RM-DMs, a conventional flow
113 cytometry analysis was performed using a gating strategy (Fig. S1) previously described^{16, 19}.
114 CD206 and CD11b expression were quantified using Median Fluorescence Intensity (MFI) and
115 the percentages of positive cells for each marker were determined. In TR-AMs, we observed an
116 increase in CD206 expression only at D8 post BLM compared to NaCl (Fig. 2A). However, the
117 percentage of CD206-positive TR-AMs significantly dropped from D8 to D22 after BLM
118 administration compared to NaCl. In RM-DMs, BLM induced a significant increase in CD206
119 expression at D22 compared to NaCl (Fig. 2A). The percentage of CD206-positive RM-DMs
120 considerably increased from D8 up to D22 after BLM compared to NaCl. Interestingly, while the
121 expression of CD206 in TR-AMs remained higher than in RM-DMs throughout the experiment,
122 BLM induced a switch in the dominant population as RM-DMs become significantly more
123 numerous compared to TR-AMs from D8 up to D22 (Fig.2B). Regarding the expression of CD11b
124 expression, we observed a higher expression in RM-DMs than in TR-AMs regardless of the
125 treatment conditions (Fig. 2B). Nevertheless, CD11b expression dropped in RM-DMs at D22 in
126 BLM-treated mice compared to NaCl. CD11b expression in TR-AMs was increased by BLM at
127 D8 and D15. At the cellular level, there was a huge increase in RM-DMs CD11b⁺ cells upon BLM

128 treatment from D8 to D22 compared to NaCl. The percentage of TR-AMs CD11b⁺ cells remained
129 low despite a slight increase at D8 and D15 after BLM treatment compared to NaCl.
130 Finally, we showed by a bi-parametric plot the dynamic of evolution of cells expressing CD206
131 and/or CD11b (Fig. 2C). In TR-AMs, BLM induced a significant decrease in CD11b-/CD206⁺
132 cells which then increased at D15 and D22 to return at a level similar to controls. Double positive
133 TR-AMs followed an opposite evolution with an increase at D8 followed by a decrease at D15 and
134 D22 (Fig. 2C). Interestingly, BLM treatment induced a similar kinetic of variation for RM-DMs
135 compared with TR-AMs, suggesting similar phenotypic modifications between both cell
136 populations (Fig. 2C).

137

138 **CD206 and collagen are relevant targets for *in vivo* imaging in experimental lung fibrosis**

139 Immunostaining of lung sections from NaCl and BLM-receiving mice demonstrated that CD206
140 was upregulated in lung fibrosis (Fig S2A). CD206 expression strongly co-localized with CD68,
141 a pan-macrophage marker, indicating that CD206 was mainly expressed by a subtype of
142 macrophages in the fibrotic lung. Interestingly, CD206 upregulation was found in fibrotic but also
143 in non-fibrotic lung areas of BLM-receiving mice (Fig S2A). These results were confirmed by
144 autoradiography using ^{99m}Tc-tilmanocept to target CD206. Autoradiographic signal of ^{99m}Tc-
145 tilmanocept was significantly higher in lung sections from BLM-receiving mice compared with
146 controls (Fig. S2B). Interestingly, areas with higher ^{99m}Tc-tilmanocept signal correlated with areas
147 with higher signal of picrosirius red staining which represent areas with higher collagen content
148 (Fig. S2B). The concomitant addition of an excess of unlabeled tilmanocept (blocking conditions)
149 strongly reduced ^{99m}Tc-tilmanocept autoradiographic signal, demonstrating a competition between
150 radiolabeled and unlabeled tilmanocept therefore showing the specificity of the binding (Fig. S2B).

151 Similar results were obtained with a ^{68}Ga -labelled radiotracer targeting collagen, ^{68}Ga -collagelin,
152 which showed a higher autoradiographic signal in lung sections from BLM-receiving mice
153 compared with controls (Fig. S2C). Similarly, the concomitant addition of an excess of unlabeled
154 collagelin (blocking conditions) strongly reduced ^{68}Ga -collagelin autoradiographic signal
155 demonstrating the specificity of the binding (Fig. S2C).

156

157 ***In vivo* imaging of CD206 can detect BLM-induced lung fibrosis**

158 NaCl and BLM-receiving mice underwent SPECT/CT imaging with the CD206 targeting agent
159 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tilmanocept at several stages of experimental fibrosis (Fig. S3A). The $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tilmanocept
160 lung uptake was significantly increased in BLM-treated mice at D8, D15 and D22 compared to
161 controls (Fig. 3A, B). *Ex vivo* radioactivity quantification of the lungs confirmed the increase in
162 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tilmanocept lung uptake at D8, D15 and D22 in BLM-treated animals (Fig. S4A). Similarly,
163 lung CT of BLM-receiving mice showed an increase in fibrotic consolidations compared with
164 control mice with an increase in mean lung density (MLD) in BLM-treated mice compared with
165 controls at D8, D15 and D22 (Fig. 3C). The concomitant administration of an excess of unlabeled
166 tilmanocept (blocking conditions) induced a significant decrease in $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tilmanocept lung uptake
167 in fibrotic mice (Fig. 3B, C, Fig. S4A). Interestingly, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tilmanocept lung uptake on SPECT/CT
168 significantly correlated with MLD measured on CT (Fig. 3D). Similarly, *ex vivo* $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tilmanocept
169 lung uptake correlated with collagen content measured by histology (picrosirius red quantification)
170 in BLM-receiving mice at D22 (Fig. S4B).

171

172 ***In vivo* imaging of collagen to detect BLM-induced lung fibrosis**

173 NaCl and BLM-receiving mice underwent PET/CT imaging with the collagen targeting agent
174 ^{68}Ga -collagelin at several stages of experimental fibrosis (Fig. S3A). The ^{68}Ga -collagelin lung
175 uptake was significantly increased in BLM-treated mice at D14 and D21 compared to controls
176 (Fig. 3E, F). *Ex vivo* radioactivity quantification of the lungs confirmed the increase in ^{68}Ga -
177 collagelin lung uptake at D14 and D21 in BLM-treated animals (Fig. S4C). Similarly, lung CT of
178 BLM-receiving mice showed an increase in fibrotic consolidations compared with control mice
179 with an increase in MLD in BLM-treated mice compared with controls at D14 and D21 (Fig. 3G).
180 The concomitant administration of an excess of unlabeled collagelin (blocking conditions) induced
181 a significant decrease in ^{68}Ga -collagelin lung uptake in fibrotic mice (Fig. 3F, G and Fig. S4C).
182 Interestingly, ^{68}Ga -collagelin lung uptake on PET/CT significantly correlated with MLD measured
183 on CT (Fig. 3H). Similarly, *ex vivo* ^{68}Ga -collagelin lung uptake correlated with collagen content
184 measured by histology (picrosirius red quantification) in BLM-receiving mice at D21 (Fig. S4D).

185

186 **Nintedanib limits the BLM-induced CD206 upregulation in experimental fibrosis**

187 The effects of nintedanib on macrophage polarization and CD206 expression was evaluated *in*
188 *vitro* on macrophages isolated from human buffy coat and treated by IL-4, an inducer of M2
189 polarization. As expected, nintedanib induced a dose-dependent inhibition of IL-4-induced M2
190 polarization associated with a decrease in CD206 expression (Fig. S5A).

191 *In vivo* NaCl- and BLM-receiving mice were treated with nintedanib from D7 to D20 and a
192 cytometry analysis of pulmonary macrophages (TR-AMs and RM-DMs) was performed at D21.
193 CD206 and CD11b expression were quantified using Median Fluorescence Intensity (MFI) and
194 the percentage of positive cells for each marker were determined. While nintedanib did not affect
195 BLM-induced CD206 expression in TR-AMs, nintedanib significantly reduced CD206 expression

196 in RM-DMs after BLM (Fig. 4A). Interestingly, nintedanib did not affect the BLM-induced
197 decrease in CD206⁺ TR-AMs while it significantly prevented the increase in the percentage of
198 CD206⁺ RM-DMs induced by BLM challenge (Fig. 4A).

199 Regarding CD11b, nintedanib had a slight inhibitory effect on the increase of CD11b expression
200 induced by BLM in TR-AMs but did not change the proportion of CD11b⁺ TR-AMs (Fig 4B).

201 However, nintedanib did not show any effect on CD11b expression nor on the proportion of
202 CD11b⁺ RM-DMs (Fig. 4B). A bi-parametric analysis of CD11b and CD206 expression showed

203 a slight, non-significant, decrease in the percentage of double positive TR-AMs after nintedanib.

204 The percentage of double positive RM-DMs decreased significantly after nintedanib compared to

205 BLM mice (Fig. 4C). However, BLM treatment decreased CD11b⁻ CD206⁺ cells in TR-AMs while

206 increasing them in RM-DMs. Interestingly, nintedanib limited the BLM-induced decrease of

207 CD11b⁻ CD206⁺ cells in TR-AMs while had no impact of CD11b⁻ CD206⁺ RM-DMs population.

208

209 ***In vivo* imaging of CD206 and collagen is a useful tool to monitor nintedanib efficacy on**
210 **fibrosis and CD206 expression**

211 NaCl and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib underwent longitudinal imaging with

212 ^{99m}Tc-tilmanocept and ⁶⁸Ga-collagelin successively at D8-9, D15-16 and D22-23 (Fig. S3B). Lung

213 uptake of ^{99m}Tc-tilmanocept and ⁶⁸Ga-collagelin increased at early stage (D8-9) in BLM-receiving

214 mice and remained higher compared to control up to D23 (Fig. 5A, C). Interestingly, in BLM-

215 receiving mice nintedanib treatments dramatically decreased ^{99m}Tc-tilmanocept and ⁶⁸Ga-

216 collagelin lung uptake at D16 and D23 (Fig. 5A, C). These results were confirmed by gamma

217 counting at D23 in which ^{99m}Tc-tilmanocept lung uptake was significantly higher in BLM-

218 receiving mice and was decreased by nintedanib (Fig. S5B). Similarly, MLD measured on CT

219 significantly increased from D9 to D23 in BLM-receiving mice and was decreased by nintedanib
220 treatments (Fig. 5B). Importantly, collagen quantification on lung sections confirmed that
221 nintedanib reduced collagen content in BLM-receiving mice treated with nintedanib compared
222 with mice receiving vehicle at D23 (Fig. 5D).

223

224 **Tofacitinib reduces CD206 expression in BLM-induced fibrosis model**

225 The effect of tofacitinib, a Janus-associated Kinases JAK 1 and JAK 3 inhibitor, on CD206
226 expression was first evaluated *in vitro* on macrophages isolated from human buffy coat and treated
227 with IL-4 to induce a M2 polarization. Tofacitinib significantly inhibited the IL4-induced CD206
228 overexpression in macrophages in a dose-dependent manner (Fig. S6).

229 *In vivo*, NaCl- and BLM-treated mice were treated with tofacitinib from D7 to D20 and cytometry
230 analysis of pulmonary macrophages was performed at D20. In line with figure 2, BLM induced a
231 significant increase in CD206 expression in TR-AMs and RM-DMs (Fig 6A). Tofacitinib
232 treatment partially inhibited this increase in the RM-DMs population but not in TR-AMs. When
233 expressed in percentage of CD206 positive cells, the results showed also that the increase induced
234 by BLM is prevented by tofacitinib (Fig. 6A). However, tofacitinib did not modify CD11b
235 expression and percentage of CD11b-positive cells (Fig. 6B). A bi-parametric analysis of CD11b
236 and CD206 expression in RM-DMs and TR-AMs showed that tofacitinib did not prevent the BLM-
237 induced increase in the number of CD11b⁺ CD206⁺ populations TR-AMs nor RM-DMs. In
238 addition, tofacitinib had no impact on CD11b⁻ CD206⁺ TR-AMs while it prevented the rise of
239 CD11b⁻ CD206⁺ RM-DMs induced by BLM (Fig. 6C).

240

241 ***In vivo* imaging of CD206 and collagen is a useful tool to monitor tofacitinib efficacy on**
242 **fibrosis and CD206 expression**

243 NaCl and BLM-receiving mice treated or not with tofacitinib underwent longitudinal imaging with
244 ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagelin successively at D8-9, D15-16 and D22-23 (Fig. S3B). Lung
245 uptake of ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagelin increased at early stage (D8-9) in BLM-receiving
246 mice and remained higher compared to control up to D23 (Fig. 7A, C). Interestingly, in BLM-
247 receiving mice tofacitinib treatments dramatically decreased ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -
248 collagelin lung uptake at D16 and D23 (Fig. 7A, C). These results were confirmed by gamma
249 counting at D23 in which ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake was significantly higher in BLM-
250 receiving mice compared with mice receiving BLM and tofacitinib (Fig. S7A). Similarly, MLD
251 measured on CT significantly increased from D16 to D23 in BLM-receiving mice and this effect
252 was prevented by tofacitinib treatments (Fig. 7B). Interestingly, collagen quantification on lung
253 sections confirmed that tofacitinib reduced collagen content in BLM-receiving mice treated with
254 tofacitinib compared with mice receiving vehicle at D23 (Fig. 7D). Further, a strong correlation
255 was shown between ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagelin lung uptakes in BLM receiving mice
256 (Fig. S7B).

257 Fibrosis progression as well as tofacitinib efficacy was quantified using the variation of ^{68}Ga -
258 collagelin lung uptake between D8 and D22 ($\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$). BLM induced an increase in
259 $\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$ demonstrating fibrosis progression between D8 and D22 (Fig. S7C). Tofacitinib
260 significantly decreased $\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$ showing the anti-fibrotic potential of this drug (Fig. S7C).
261 In order to determine the predictive value of early collagen/CD206 imaging, correlation studies
262 between $\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$ and values of ^{99m}Tc -tilmanocept or ^{68}Ga -collagelin lung uptake at D9
263 were performed. Interestingly, in BLM-receiving mice, ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake at D9

264 positively correlated with $\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$ showing that lungs with higher $^{99\text{m}}\text{Tc-tilmanocept}$
265 uptake at D9 were those with higher fibrosis progression (Fig. S7D). Interestingly, $^{99\text{m}}\text{Tc-}$
266 tilmanocept uptake at D9 negatively correlated with $\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$ in tofacitinib-treated mice
267 demonstrating that lungs with higher $^{99\text{m}}\text{Tc-tilmanocept}$ uptake at D9 were those in which
268 tofacitinib showed the best efficacy (Fig. S7E). On the contrary, $^{68}\text{Ga-collagelin}$ lung uptake at D9
269 did not correlate with $\Delta^{68}\text{Ga-coll}^{\text{D8-D22}}$ in BLM-receiving mice nor in mice treated with tofacitinib
270 showing that D9 $^{68}\text{Ga-collagelin}$ was not predictive of fibrosis progression nor of tofacitinib
271 efficacy (Fig. S7F-G).

272

273 **CD206 is a relevant target in human IPF**

274 Immunostaining of lung biopsies from IPF patients and controls demonstrated that CD206 was
275 upregulated in IPF (Fig. 8A). CD206 expression strongly co-localized with CD68, a pan-
276 macrophage marker, indicating that CD206 was mainly expressed by a subtype of macrophages in
277 the fibrotic lungs. Immunostainings also demonstrated that collagen was upregulated in IPF
278 biopsies compared with controls (Fig. 8A). These results were confirmed by autoradiography in
279 which autoradiographic signal of $^{99\text{m}}\text{Tc-tilmanocept}$ was significantly higher in IPF biopsies
280 compared with controls (Fig. 8B). The concomitant addition of an excess of unlabeled tilmanocept
281 (blocking conditions) strongly reduced $^{99\text{m}}\text{Tc-tilmanocept}$ signal demonstrating the specificity of
282 the binding (Fig. 8B). In addition, analysis of publically available datasets demonstrates an
283 upregulation of CD206 gene, MRC1, in IPF lungs (Fig. 8C). Interestingly, this upregulation of
284 MRC1 was found both in fibrotic and non-fibrotic areas of IPF tissues (Fig. 8D). Further, MRC1
285 expression was found upregulated in IPF patients with a progressive disease compared with IPF

286 patients who did not show progression over a year (Fig. 8E), demonstrating the potential interest
287 of CD206 as a marker of active fibrosis in IPF patients.

288

289 **Discussion**

290 Macrophages have a high plasticity and can acquire several phenotypes with pro-inflammatory
291 (M1) or anti-inflammatory/pro-fibrotic (M2) properties depending on the microenvironment. It
292 has been largely demonstrated that IPF lungs are predominantly infiltrated by M2 macrophages
293 which produce high levels of profibrotic mediators such as TGF- β 1^{6, 20, 21}. Here, we demonstrate
294 in our models that M2 macrophages expressing CD206 are upregulated from early stage of fibrosis
295 and remain present at high levels up to later stages. A critical issue is the origin of these pro-fibrotic
296 M2 macrophages during lung fibrosis. Among macrophages in the lungs, AMs have been clearly
297 identified as the population responsible for the resolution of inflammation and tissue repair²².
298 Misharin *et al.* were the first group to identify a population of monocyte-derived AMs appearing
299 during BLM-induced lung fibrosis in mice^{16, 23}. Their work described this AMs population as
300 SiglecF^{low} CD11c^{high} expressing CD11b named monocyte-derived alveolar macrophages (Mo-
301 AMs). As in our study, Misharin *et al.* described a heterogeneity of AMs in the lungs with two
302 main populations, tissue resident AMs (TR-AMs) and monocyte-derived recruited AMs (Mo-
303 AMs/RM-DMs)²³. While TR-AMs have been shown to self-renew during homeostasis, RM-DMs
304 have been demonstrated to be largely recruited in the alveolar space during chronic inflammation
305 where they actively participate in the development of a fibrotic microenvironment²². In addition,
306 the deletion of RM-DMs after their recruitment to the lung is able to prevent fibrosis, whereas the
307 deletion of TR-AMs had no effect on fibrosis severity²³. Our study confirms that both TR-AMs
308 and RM-DMs express CD206 as previously described²⁴. Interestingly, our study highlights the

309 kinetic of RM-DMs recruitment and demonstrates a close interconnection between CD11b and
310 CD206 expression in recruited macrophages in the lungs after BLM challenge. RM-DMs present
311 a strong CD11b⁺ expression at D8 which rapidly decreases at D16 and D22 concomitantly with a
312 stable gain of CD206 expression. Accordingly, after a significant increase in CD11b⁺ CD206⁺
313 RM-DMs cells at D8, the percentage of this population decreases in favor of CD11b⁻ CD206⁺ at
314 later stage of the disease. These findings are in accordance with previous studies demonstrating
315 that BLM induces apoptosis of TR-AMs ²⁵ which may be replaced by RM-DMs after BLM-
316 induced inflammation ^{4, 8, 26}. In our work, TR-AMs, despite their weak percentage at D8, were
317 strongly CD11b⁺ CD206⁺ at D8, as the RM-DMs, and then, at later stages lost CD11b expression
318 but maintained a high expression of CD206. As TR-AMs are known to be CD11b⁻ cells, the high
319 proportion of TR-AMs expressing CD11b⁺ SiglecF^{low} CD206⁺ at D8 may suggest that upon BLM,
320 RM-DMs are the main cell population responsible for the maintenance of the AMs population
321 instead of a self-renewal of TR-AMs as previously described ¹⁶. In addition, in accordance with
322 previous studies, we confirm here that TR-AMs exhibit a higher expression of CD206 compared
323 with RM-DMs at basal level and in BLM-induced fibrosis ^{16, 23}. However, upon BLM the
324 percentage of TR-AMs considerably drops in favor of CD206⁺ RM-DMs. Consequently, our study
325 identifies the RM-DMs, the population responsible for the worsening of fibrosis ²³, as the
326 population responsible for CD206 expression in BLM-induced lung fibrosis in mice. Therefore,
327 CD206 may be a potent biomarker of fibrosis progression and activity.

328 The potential use of CD206 as a non-invasive biomarker of fibrosis progression was further
329 confirmed in our study by using *in vivo* CD206-targeted molecular imaging. *In vivo* molecular
330 imaging has recently become a central tool in preclinical research, clinical trials and medical
331 practice for diagnosis and monitoring of several diseases. Our group and others recently

332 demonstrated that longitudinal CT-scan in preclinical BLM-induced lung fibrosis was a reliable
333 tool to monitor the severity and progression of lung fibrotic areas^{27, 28, 29, 30}. We confirm here these
334 findings by showing an increased MLD throughout BLM-induced fibrosis. An excessive and
335 aberrant deposition of collagen is the hallmark of lung fibrosis. As a consequence, *ex vivo* collagen
336 quantification in lung tissue is often used to quantify the severity of fibrosis in animal models.
337 Here, we used a probe targeting collagen I and III radiolabelled with Gallium-68, a PET
338 radionuclide, in order to detect collagen *in vivo*. The main advantage of our probe, ⁶⁸Ga-collagelin,
339 is that it allows a longitudinal evaluation of lung collagen content during fibrosis development.
340 We demonstrate that ⁶⁸Ga-collagelin is able to specifically and accurately detect lung fibrosis in
341 strong correlation with fibrosis evaluation by CT-scan and histology showing the potential of this
342 probe to stage pulmonary fibrosis in our animal model. These results are in accordance with
343 previous work with this collagen-binding probe on other preclinical models of fibrosis^{31, 32}.
344 Désogère *et al.* showed similar results with a collagen I-specific PET probe, CBP8 also
345 radiolabelled with ⁶⁸Ga, with high specificity of ⁶⁸Ga-CBP8 for pulmonary fibrosis *in vivo* in
346 BLM-treated mice³³. In addition, our findings with ⁶⁸Ga-collagelin were in accordance with ⁶⁸Ga-
347 CBP8 lung uptake, which correlated with lung collagen content and showed sensitivity to monitor
348 response to treatment in BLM-induced lung fibrosis³³. Similarly, we demonstrate here that *in vivo*
349 longitudinal imaging of CD206 is able to specifically and accurately detect lung fibrosis severity
350 and progression in correlation with CT-scan data and collagen imaging. Surprisingly, even though
351 we identified a TR-AMs population expressing high basal levels of CD206 in untreated mice,
352 ^{99m}Tc-tilmanocept imaging did not show a high background in the lungs and image quality was
353 sufficient for an accurate quantification of fibrosis in BLM-treated mice compared with controls.
354 Even if TR-AMs show a high expression of CD206 their proportion in the untreated lung may be

355 too low to generate a residual lung uptake. Nevertheless, TR-AMs proportion and ^{99m}Tc-
356 tilmanocept imaging needs to be further investigated in humans in order to determine whether the
357 threshold of detection of CD206 between healthy individuals and IPF patients is relevant for the
358 use of ^{99m}Tc-tilmanocept as a diagnostic/follow-up imaging tool in this disease. Taken together,
359 our flow cytometry and imaging data strongly suggest that CD206 upregulation in BLM-induced
360 lung fibrosis is mainly due to the recruitment of pro-fibrotic RM-DMs at site of injury and that
361 these CD206⁺ cells may represent a promising biomarker for non-invasive lung fibrosis
362 monitoring. Further, our data showing that CD206 gene expression in human is able to
363 discriminate non-progressor *versus* progressor IPF patients is another evidence supporting CD206
364 as a biomarker which may improve IPF patients' management.

365 The main clinical challenge in IPF is the unpredictable evolution of lung fibrosis and the
366 impossible monitoring of anti-fibrotic therapy efficacy. Here, we confirm *in vitro* on PBMC and
367 *in vivo* by flow cytometry and imaging of CD206 the results of *Bellamri et al.*, which showed that
368 nintedanib considerably altered human macrophages phenotype towards a reduction of M2
369 markers including CD206³⁴. Nintedanib induced a rapid decrease in CD206 expression in the
370 lungs especially in RM-DMs. Furthermore, both RM-DMs and TR-AMs CD11b⁺ CD206⁺
371 population were impacted by nintedanib, in contrast to CD11b⁻ CD206⁺, that might suggest an
372 inhibition at an early stage of monocyte/macrophage infiltration in the lung. Our data suggest that
373 the decrease in CD206 by nintedanib may be at least in part driven by a direct role on M2
374 polarization. This hypothesis is supported by previous reports³⁴. On the other hand, nintedanib in
375 addition to its role on macrophage polarization might also reduce the recruitment of M2
376 macrophages as shown by the decrease in CD11b⁺ cells upon nintedanib treatment. Whether the
377 impact of nintedanib is direct or indirect to reduce CD206 expressing M2 macrophages remains to

378 be further investigated. The rapid decrease in CD206 expression was also significantly detected
379 by molecular imaging in correlation with a decrease in CT consolidations and collagen content
380 suggesting that CD206-targeted imaging may represent a step toward the development of tools to
381 monitor anti-fibrotic efficacy of nintedanib. However, the clinical relevance of the effect of
382 nintedanib on M2 polarization should be taken with caution since nintedanib inhibits macrophage
383 functions *in vitro* at higher concentrations than those measured in IPF patients ³⁵. In our study
384 nintedanib significantly reduced CD206 expression at concentration of 500 nM, whereas the
385 highest blood concentrations measured in IPF patients are about 10 folds lower ³⁵.

386 Therapeutic strategies targeting CD206 in lung fibrosis have recently been shown to be efficient
387 in preventing fibrosis progression. It has been demonstrated that the CD206-specific blocking
388 peptide RP-832c significantly reduced bleomycin-induced fibrosis in a dose dependent manner, as
389 well as decreased CD206, TGF- β 1 and α -SMA expression in mouse lungs. Interestingly, RP-832c
390 did not induce any changes in the expression of resident alveolar macrophage markers suggesting
391 that CD206 inhibition and subsequent fibrosis prevention was mainly due to an action on RM-
392 DMs ³⁶. In addition, Wang *et al.* demonstrated that microcystin-LR, a cyclic peptide produced by
393 cyanobacteria, was able to ameliorate experimental lung fibrosis via the inhibition of CD206⁺ M2-
394 like macrophage polarization ³⁷. In accordance with these findings, we demonstrate here that
395 tofacitinib, a known JAK inhibitor able to modulate macrophages polarization limiting the CD206
396 expressing M2 phenotype ^{12, 38}, induces a loss of CD206 expression in the lung mainly in RM-
397 DMs. In opposition with nintedanib, the inhibition of CD206 induced by tofacitinib was focused
398 on the RM-DMs CD11b⁻ CD206⁺ population, probably at late stage of macrophage infiltration into
399 the alveoli. Interestingly, tofacitinib did not impact CD11b expression. The decrease in CD206
400 may be either the consequence of a lower proportion of RM-DMs or a direct inhibition of CD206

401 that leads to the reduction of infiltrated-macrophages. Interestingly, *in vivo* CD206 imaging
402 showed a significant decrease in ^{99m}Tc-tilmanocept lung uptake in correlation with ⁶⁸Ga-collagelin
403 lung uptake and MLD. In addition, we demonstrate here that early CD206 imaging with ^{99m}Tc-
404 tilmanocept is correlated with fibrosis progression and tofacitinib efficacy. As a consequence,
405 ^{99m}Tc-tilmanocept lung imaging may have a great interest as a non-invasive companion biomarker
406 to select patients for anti-CD206 therapy and to predict fibrosis progression in patients, a tool that
407 is currently not available for lung fibrosis, what could improve the personalized management of
408 IPF patients. In addition, based on our findings CD206 inhibition also appears as a novel
409 therapeutic strategy for lung fibrosis. Tofacitinib is a JAK inhibitor under investigation in
410 scleroderma and approved for the treatment of RA ¹³, two pathologies with a significant proportion
411 of patients who ultimately develop progressive lung fibrosis ^{39,40}. Interestingly, a *post-hoc* analysis
412 of 21 clinical trials showed a lower incidence rate of progressive lung fibrosis in RA patients under
413 tofacitinib treatment compared with placebo ⁴¹. Further, several case reports demonstrated a
414 beneficial effect of tofacitinib on pre-existing progressive lung fibrosis in RA-patients ^{42, 43}.
415 Similarly, Chen *et al.* demonstrated that tofacitinib ameliorated survival, lung function parameters
416 and findings on HRCT in patients with progressive lung fibrosis associated with amyopathic
417 dermatomyositis. These findings further support the anti-fibrotic potential of tofacitinib and its
418 potential benefit for IPF patients.

419 While our preclinical results are certainly promising, their relevance for human IPF needs further
420 investigation. Indeed, BLM-induced fibrosis may show some important limitations for clinical
421 translation regarding the study of M2 macrophages. For instance, in our study BLM induces a
422 massive recruitment of RM-DMs in the lungs at D9, which may not be occurring in IPF patients
423 who usually present at late stage of the disease. Nevertheless, we report here that CD206 is

424 upregulated in IPF patients' biopsies and that ^{99m}Tc -Tilmanocept is able to detect this upregulation
425 *ex vivo*. This constitutes a first step in the validation of this radiotracer for further investigations in
426 humans. In addition, our data from human gene expression clearly demonstrate that CD206 is a
427 relevant target in IPF. We are presently planning an early clinical study to evaluate the relevance
428 of ^{99m}Tc -Tilmanocept imaging in IPF patients.

429

430 **Material and Methods**

431 *Human tissue samples*

432 Lung tissue samples (n = 4) were obtained by open lung biopsy (FIRH, Hamilton, Canada). IPF
433 was diagnosed according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society
434 consensus criteria, including clinical, radiographic, and characteristic histopathologic features.
435 Control non-IPF lung tissue samples were obtained from smokers who underwent thoracic surgery
436 for localized primary lung carcinoma (biopsy away from cancer lesion, n= 4). The local ethics
437 committee (Hamilton, Canada) approved the study, and patients provided informed consent before
438 lung surgery.

439

440 *Animal experiments*

441 All animal studies were conducted in accordance with the legislation on the use of laboratory
442 animals (directive 2010/63/EU) and were approved by accredited Ethical committee (C2ea Grand
443 Campus n°105) and the French Ministries of Research and Agriculture (project #12816 and
444 #24399). Eight-week old C57/B16 mice received at D0 a single intratracheal injection of 2mg/kg
445 of BLM (Santa Cruz biotechnology, USA) or NaCl (Controls) under anaesthesia (3% isoflurane).
446 BLM-induced lung fibrosis is characterized by an initial inflammatory phase lasting from D0 to

447 D7 which moves on to a fibrotic phase from D7 to D23. When indicated animals were treated with
448 nintedanib (OfevTM, 60mg/kg) or tofacitinib (XeljanzTM, 30mg/kg) by daily gavage during the
449 fibrotic phase of BLM-induced lung fibrosis from D9 to D23 as recommended ⁴⁴.

450

451 *Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)-derived macrophages isolation from healthy*
452 *donors*

453 Buffy coats were obtained from Etablissement Français du Sang (EFS, Dijon, France) and PBMC
454 separated using Ficoll density gradient. After adhesion, monocytes were cultivated in RPMI 10%
455 FBS with 100ng/ml M-CSF (130-096-492, Miltenyi Biotec, Germany) for 7 days. Then, cells were
456 activated with IL-4 (130-093-922, Miltenyi Biotec) in presence of nintedanib (BIBF 1120,
457 Selleckchem.com) or tofacitinib citrate (PZ0017, Sigma-Aldrich, Merck, France) for 48h.
458 Tofacitinib were added to the culture 1h before IL-4 treatment and keep during all procedure. Cells
459 were harvested by AccutaseTM Cell Detachment solution (561527, BD Bioscience) before flow
460 cytometry analysis.

461

462 *Immunophenotyping of lung tissue cells and PBMC-derived macrophages*

463 Cells obtained from lung tissue digestion were first resuspended in 100µl PBS and stained on ice
464 for 30 min with 1/1000^{ème} of BD HorizonTM Fixable Viability Stain 575V (565694, BD
465 Biosciences). After washing step with PBS and centrifugation at 300g for 5 min, pellet was then
466 resuspended in Stain buffer (554656, BD biosciences) with hamster anti-mouse CD16/32, clone
467 2.4G2 (554656, BD Bioscience) for 20 minutes in order to block Fc receptor-mediated binding of
468 antibodies. These cells were then washed, and incubated on ice for 30 minutes with fluorochrome-
469 conjugated monoclonal antibodies (see table 1, panel: tissue lung cells) Antibodies dilution)

470 diluted in BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (563794, BD Biosciences). After one more wash,
471 cell fixation was performed with the BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Solution
472 Kit (554714, BD Biosciences) using the manufacturer's protocol. Cells were finally resuspended
473 in 300 µL PBS before analysis on cytometer.

474 PBMC-derived macrophages were stained according to the same protocol with slight
475 modifications. Cells were first incubated with saturated with a mix of PBS-BSA 3% and FcR
476 Blocking reagent (130-059-901, Miltenyi Biotec). There were stained then with a mix of
477 fluochrome-conjugated antibodies (see table 1, panel: PBMC). Just before analysis, 7-AAD (51-
478 68981E, BD Bioscience) were added to exclude dead cells.

479

480 *Conventional Flow cytometry analysis*

481 Both panel (PBMC and tissue lung cells) were analyzed on LSRFortessa flow cytometer (BD
482 Biosciences, USA) using application settings in order to standardize cytometer between days. A
483 minimum of 50,000 single events negative for FVS staining were recorded for each sample.
484 Compensation values for spectral overlap were determined using BD™ Comp Beads anti-Rat and
485 anti-Hamster Ig κ (552845, BD Bioscience) or BD™ Comp Beads anti-Mouse Ig κ (552843, BD
486 Bioscience) depending on panel. A 2 µl suspension of both the positive and negative capture beads
487 was singly stained with each fluorescent antibody as before. Post-acquisition analysis and
488 compensation was performed with FlowJo Version 10.7.2 (Treestar Inc, USA) software. Data
489 analysis was performed using supervised method. The expression of selected markers was
490 presented as Median Fluorescence Intensity (MFI). For gating control, Fluorescence Minus One
491 (FMO) staining were used on cells where all antibodies except one were added to individual
492 control tubes following the same protocol than antibodies staining.

493

494 *Unsupervised t-SNE analysis*

495 For lung tissue, an unsupervised t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) analysis was
496 performed in FlowJo version 10.7.2 implementing R×64 Version 4.1.0. FCS files from each mouse
497 was first cleaned using FlowAI plugin Version 2.3 (Monaco et al., 2016). Single live cells were
498 then gated and exported to new FCS files. Prior to FlowSOM and FIt-SNE analyses, samples were
499 subjected to random downsampling to 30,000 events using the DownSample plugin, Version 3.3.1
500 All files were finally concatenated together to generate a single expression matrix. FlowSOM
501 analyses were performed using the FlowSOM plugin, version 3.0.16 (23), based on the 7 channels
502 (Comp-CD45-A, Comp-CD11b-A, Comp-F4/80-A, Comp-Ly6g-A, Comp-SiglecF-A and Comp-
503 CD206-A) with standard settings. The number of metaclusters was set to 10. The output generate
504 a heat map showing each marker expression in all 10 clusters. t-SNE analyses were performed
505 using the Fast Fourier Transform-accelerated Interpolation-based t-SNE (FIt-SNE) plugin,
506 Version 0.5.1 (22), using the 7 channels as for FlowSOM, and with standard settings. The output
507 generate two-dimensional dot (t-SNE dimension 1 and t-SNE dimension 2). Intensities for interest
508 markers were overlaid with the dot-plot in order to facilitate assignment of cells subset. Clusters
509 generated by FlowSUM were finally visualized on t-SNE plot.

510

511 *In vivo imaging*

512 Two pilot studies were performed on NaCl- and BLM-receiving mice at several stages by
513 SPECT/CT and PET/CT imaging with ^{99m}Tc-tilmanocept (NaCl n=12, BLM J8 n=6, BLM J15
514 n=6, BLMJ22 n=15) and ⁶⁸Ga-collagelin (NaCl n=15, BLM J7 n=3, BLM J14 n=3, BLMJ21 n=12)
515 respectively (Fig. S1A). Mice were anesthetized through isoflurane (1.5%) inhalation for
516 intravenous injection (tail vein) of ^{99m}Tc-tilmanocept (10MBq, 235µg/mouse) one hour before

517 imaging or ⁶⁸Ga-collagelin (5MBq, 1.5nmol/mouse) 15 minutes before imaging. For each tracer,
518 a group of mice received a concomitant injection of radiolabelled tracer (^{99m}Tc-tilmanocept or
519 ⁶⁸Ga-collagelin) with an excess (x100) of unlabelled tilmanocept or collagelin (Blocking, n=12
520 and n=3 respectively). Mice were then maintained under anesthesia (1.5% isoflurane) and placed
521 on an imaging heated bed inside a NanoSPECTTM-CT (Mediso, Hungary) or a BioPETTM/CT
522 (Sedecal, Spain). A CT scan of a lung-centered region was obtained (500ms, 45kV, 180
523 projections, pitch 1, binning 1:4) followed by SPECT acquisition with 90–120s per projection
524 frame resulting in acquisition times of 45–60 min of the same region or a PET acquisition (30
525 minutes) of the same region (lung-centered, 250-700 keV).

526 In other experiments, longitudinal imaging of lung fibrosis was performed on NaCl- (n=4) and
527 BLM-receiving mice treated with vehicle (n=4), nintedanib (n=4) or tofacitinib (n=4) by
528 successive SPECT/CT and PET/CT with ^{99m}Tc-tilmanocept and ⁶⁸Ga-collagelin before BLM
529 installation, at D8/D9, D15/D16 and D22/D23 following the same imaging protocol as described
530 above (Fig. S1B).

531 For each experiments, after the last imaging, mice were sacrificed and lungs and blood were
532 harvested for *ex vivo* quantification using a γ -counter (Wizard, Perkin Elmer). Lungs were
533 collected in 10% formalin for further histological analysis.

534

535 *Image analysis*

536 All SPECT/CT and PET/CT fusion images were obtained using the VivoQuantTM software
537 (Invivo, USA). Each image was visually interpreted and 3D regions of interest (3DROI)
538 corresponding to the lungs were manually drawn for CT quantification and to determine their
539 radioactivity content. Injected doses per animal were measured at the time of injection in MBq.

540 Lung Radioactivity content was expressed in MBq, converted to percentage of injected dose per
541 gram of tissue (%ID/g). All images were decay corrected for quantification.

542

543 *Collagen quantification*

544 For histochemical assay, the amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was
545 quantified by staining with PicroSirius Red as previously described ⁴⁵.

546

547 *Immunofluorescence*

548 After deparaffination (Xylene) and antigen unmasking (30 min in citrate buffer pH 6), sections
549 from human biopsies from control or IPF patients as well as mice receiving NaCl or BLM were
550 saturated (BSA 8%) and incubated overnight at 4°C with specific antibodies at a dilution of 1:100
551 for the detection of collagen (thermofischer scientific, USA), CD206 (Abcam, France) and CD68
552 (thermofischer scientific). Alexa488-, Alexa568- and Alexa 647-conjugated secondary antibodies
553 (Abcam) were used (1:250, 45 min). Slides were mounted in Prolong-gold with DAPI (ProLong®
554 Gold antifade reagent with DAPI, Life technologies).

555

556 *Autoradiography*

557 After deparaffination (Xylene) and antigen unmasking (30 min in citrate buffer pH 6), sections
558 from human biopsies from control or IPF patients as well as mice receiving NaCl or BLM were
559 saturated (BSA 8%) and incubated for 1h with ^{99m}Tc-tilmanocept (1MBq, 235ng/slide) or ⁶⁸Ga-
560 collagelin (1MBq, 1.5nmol/slide). After 4 washes with cold DPBS, slides were exposed to
561 phosphor imaging plates (Fuji imaging plates, Fujifilm). After 2-3h of exposure time, the imaging
562 plates were scanned and the autoradiograms were obtained with a phosphor imaging system (GE,

563 Amersham, Molecular Dynamics) and the images were analysed for count densities. Data were
564 used to calculate autoradiographic signal intensity in the lung sections.

565
566 *Statistical analysis*
567 Comparison between two groups were performed using the Mann-Whitney non-parametric t tests.
568 Comparison between multiple groups have been performed using the Kruskal-Wallis non-
569 parametric ANOVA tests. A $p < 0.05$ was considered significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).
570 Results are presented as median +/- interquartile range.

571 **List of Supplementary Materials**

572 Supplemental methods: *radiolabelling, Lung tissue dissociation*

573 Fig. S1 Gating strategy

574 Fig. S2 CD206 is relevant target in lung fibrosis

575 Fig. S3 *In vivo* experiment protocols

576 Fig. S4 ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagelin are able to detect advanced BLM-induced lung
577 fibrosis.

578 Fig. S5 Nintedanib reduces lung fibrosis and CD206 in fibrotic lungs

579 Fig. S6 Tofacitinib inhibits CD206 expression induced by IL4

580 Fig. S7 Predictive value of ^{99m}Tc -tilmanocept on lung fibrosis progression

581

582 **References**

583

- 584 1. Wijisenbeek M, Cottin V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N Engl J Med* **383**, 958-968 (2020).
585
586 2. Raghu G, *et al.* Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical
587 Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* **198**, e44-e68 (2018).
588

- 589 3. Raghu G, *et al.* An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic
590 Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, e3-
591 19 (2015).
592
- 593 4. Cheng P, Li S, Chen H. Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. *Cells* **10**, (2021).
594
- 595 5. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450-462
596 (2016).
597
- 598 6. Ye Z, Hu Y. TGFbeta1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review). *Int J Mol Med*
599 **48**, (2021).
600
- 601 7. Gharib SA, *et al.* MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary
602 fibrosis. *Journal of leukocyte biology* **95**, 9-18 (2014).
603
- 604 8. Joshi N, *et al.* A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR
605 signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. *Eur Respir J* **55**, (2020).
606
- 607 9. Toribio RE, *et al.* Cy3-tilmanocept labeling of macrophages in joints of mice with antibody-induced arthritis
608 and synovium of human patients with rheumatoid arthritis. *J Orthop Res* **39**, 821-830 (2021).
609
- 610 10. Surasi DS, O'Malley J, Bhambhani P. 99mTc-Tilmanocept: A Novel Molecular Agent for Lymphatic
611 Mapping and Sentinel Lymph Node Localization. *J Nucl Med Technol* **43**, 87-91 (2015).
612
- 613 11. Azad AK, *et al.* gamma-Tilmanocept, a New Radiopharmaceutical Tracer for Cancer Sentinel Lymph Nodes,
614 Binds to the Mannose Receptor (CD206). *J Immunol* **195**, 2019-2029 (2015).
615
- 616 12. Lescoat A, *et al.* Combined anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of JAK-inhibitors on macrophages
617 in vitro and in vivo: Perspectives for scleroderma-associated interstitial lung disease. *Biochem Pharmacol*
618 **178**, 114103 (2020).
619
- 620 13. Dhillon S. Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **77**, 1987-2001 (2017).
621
- 622 14. Sendo S, Saegusa J, Yamada H, Nishimura K, Morinobu A. Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-
623 derived suppressor cells and ameliorates interstitial lung disease in SKG mice. *Arthritis Res Ther* **21**, 184
624 (2019).
625
- 626 15. Wang WBSMRCMD-AKYAWJVJ. The JAK/STAT pathway is activated in systemic sclerosis and is
627 effectively targeted by tofacitinib *Journal of Scleroderma and Related Disorders* **5**, 40-50 (2020).
628
- 629 16. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H. Flow cytometric analysis of
630 macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 503-510 (2013).
631
- 632 17. Gibbings SL, *et al.* Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am J Respir*
633 *Cell Mol Biol* **57**, 66-76 (2017).
634
- 635 18. Eversole RR, Mackenzie CD, Beuving LJ. A photoreactive fluorescent marker for identifying eosinophils
636 and their cytoplasmic granules in tissues. *J Histochem Cytochem* **51**, 253-257 (2003).
637
- 638 19. Han H, Ziegler SF. Bronchoalveolar Lavage and Lung Tissue Digestion. *Bio Protoc* **3**, (2013).
639
- 640 20. Byrne AJ, Maher TM, Lloyd CM. Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung
641 Disease? *Trends Mol Med* **22**, 303-316 (2016).
642
- 643 21. Zhang W, *et al.* S100a4 Is Secreted by Alternatively Activated Alveolar Macrophages and Promotes
644 Activation of Lung Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol* **9**, 1216 (2018).

- 645
646 22. Shi T, Denney L, An H, Ho LP, Zheng Y. Alveolar and lung interstitial macrophages: Definitions, functions,
647 and roles in lung fibrosis. *J Leukoc Biol* **110**, 107-114 (2021).
648
- 649 23. Misharin AV, *et al.* Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over
650 the life span. *J Exp Med* **214**, 2387-2404 (2017).
651
- 652 24. Kaku Y, *et al.* Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients
653 with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **9**, e87400 (2014).
654
- 655 25. Hamilton RF, Jr., Li L, Felder TB, Holian A. Bleomycin induces apoptosis in human alveolar macrophages.
656 *Am J Physiol* **269**, L318-325 (1995).
657
- 658 26. Joshi N, Walter JM, Misharin AV. Alveolar Macrophages. *Cell Immunol* **330**, 86-90 (2018).
659
- 660 27. Ruscitti F, *et al.* Longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis by Micro-CT correlates with
661 histological evaluation in mice. *Multidisciplinary respiratory medicine* **12**, 8 (2017).
662
- 663 28. Rodt T, *et al.* Micro-computed tomography of pulmonary fibrosis in mice induced by adenoviral gene transfer
664 of biologically active transforming growth factor-beta1. *Respiratory research* **11**, 181 (2010).
665
- 666 29. Ruscitti F, *et al.* A Multimodal Imaging Approach Based on Micro-CT and Fluorescence Molecular
667 Tomography for Longitudinal Assessment of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Journal of*
668 *visualized experiments : JoVE*, (2018).
669
- 670 30. Tanguy J, *et al.* [(18)F]FMISO PET/CT imaging of hypoxia as a non-invasive biomarker of disease
671 progression and therapy efficacy in a preclinical model of pulmonary fibrosis: comparison with the
672 [(18)F]FDG PET/CT approach. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, (2021).
673
- 674 31. Velikyan I, *et al.* Synthesis and preclinical evaluation of 68Ga-labeled collagelin analogs for imaging and
675 quantification of fibrosis. *Nucl Med Biol* **41**, 728-736 (2014).
676
- 677 32. Muzard J, *et al.* Non-invasive molecular imaging of fibrosis using a collagen-targeted peptidomimetic of the
678 platelet collagen receptor glycoprotein VI. *PLoS One* **4**, e5585 (2009).
679
- 680 33. Desogere P, *et al.* Type I collagen-targeted PET probe for pulmonary fibrosis detection and staging in
681 preclinical models. *Science translational medicine* **9**, (2017).
682
- 683 34. Bellamri N, *et al.* Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. *Int*
684 *Immunopharmacol* **72**, 112-123 (2019).
685
- 686 35. Ogura T, *et al.* Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis.
687 *Eur Respir J* **45**, 1382-1392 (2015).
688
- 689 36. Ghebremedhin A, *et al.* A Novel CD206 Targeting Peptide Inhibits Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis
690 in Mice. *bioRxiv*, (2020).
691
- 692 37. Wang J, *et al.* Microcystin-LR ameliorates pulmonary fibrosis via modulating CD206(+) M2-like
693 macrophage polarization. *Cell Death Dis* **11**, 136 (2020).
694
- 695 38. Aung WW, *et al.* Immunomodulating role of the JAKs inhibitor tofacitinib in a mouse model of bleomycin-
696 induced scleroderma. *J Dermatol Sci* **101**, 174-184 (2021).
697
- 698 39. Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, Verpillat P. Epidemiology of systemic sclerosis and systemic
699 sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol* **11**, 257-273 (2019).
700

701 40. Shaw M, Collins BF, Ho LA, Raghu G. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur Respir Rev* **24**, 1-
702 16 (2015).
703
704 41. Citera G, *et al.* Incidence Rates of Interstitial Lung Disease Events in Tofacitinib-Treated Rheumatoid
705 Arthritis Patients: Post Hoc Analysis From 21 Clinical Trials. *J Clin Rheumatol*, (2020).
706
707 42. Saldarriaga-Rivera LM, López-Villegas VJ. Janus kinase inhibitors as a therapeutic option in rheumatoid
708 arthritis and associated interstitial lung disease. Report of four cases. *Revista Colombiana de Reumatología*
709 *(English Edition)* **26**, 137-139 (2019).
710
711 43. Vacchi C, *et al.* Tofacitinib for the Treatment of Severe Interstitial Lung Disease Related to Rheumatoid
712 Arthritis. *Case Rep Med* **2021**, 6652845 (2021).
713
714 44. Kolb P, *et al.* The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Eur*
715 *Respir J* **55**, (2020).
716
717 45. Decolgne N, *et al.* TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* **179**,
718 6043-6051 (2007).
719
720

721 **Acknowledgments:** We thank the histology platform Cellimap for their invaluable and
722 professional help. This work was also possible with help from Flow Cytometry Core
723 Facility/Inserm U1231, at the University of Burgundy. The facility is supported by Burgundy
724 Regional Council. We would like to thank Camille Drouet, Valérie Bordat and Mélanie Guillemain
725 for their technical help. This work was performed within Pharm’image, a regional center of
726 excellence in Pharmacoinaging. Support was also provided by the French Government through
727 the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir”
728 (ANR-10-EQPX-05-01/IMAPPI Equipex).

729 **Funding:** This project was supported by « Agence National de la Recherche » (ANR-20-CE17-
730 0005 and ANR AAP2021 SMART-PROGRESS). Julie Tanguy is funded by « La Fondation du
731 Souffle et le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire FR-2019 ». O.B. is supported by the French
732 “Investissements d’Avenir” programme, project ISITE-BFC (ANR-15-IDEX-0003).

733 **Author contributions:**

734 Conceptualization: LP, OB, CG, BC, PB, FG, PSB

735 Methodology: LP, HS, JT, LD, NP, VG, AB, MM, ARG, PSB
736 Investigation: LP, HS, OB, JT, LD, NP, VG, AB, MM, ARG, PSB
737 Funding acquisition: PB, PSB
738 Supervision: CG, KA, BC, PB, FG, PSB
739 Writing – original draft: LP, FG, HS, PSB
740 Writing – review & editing: All authors

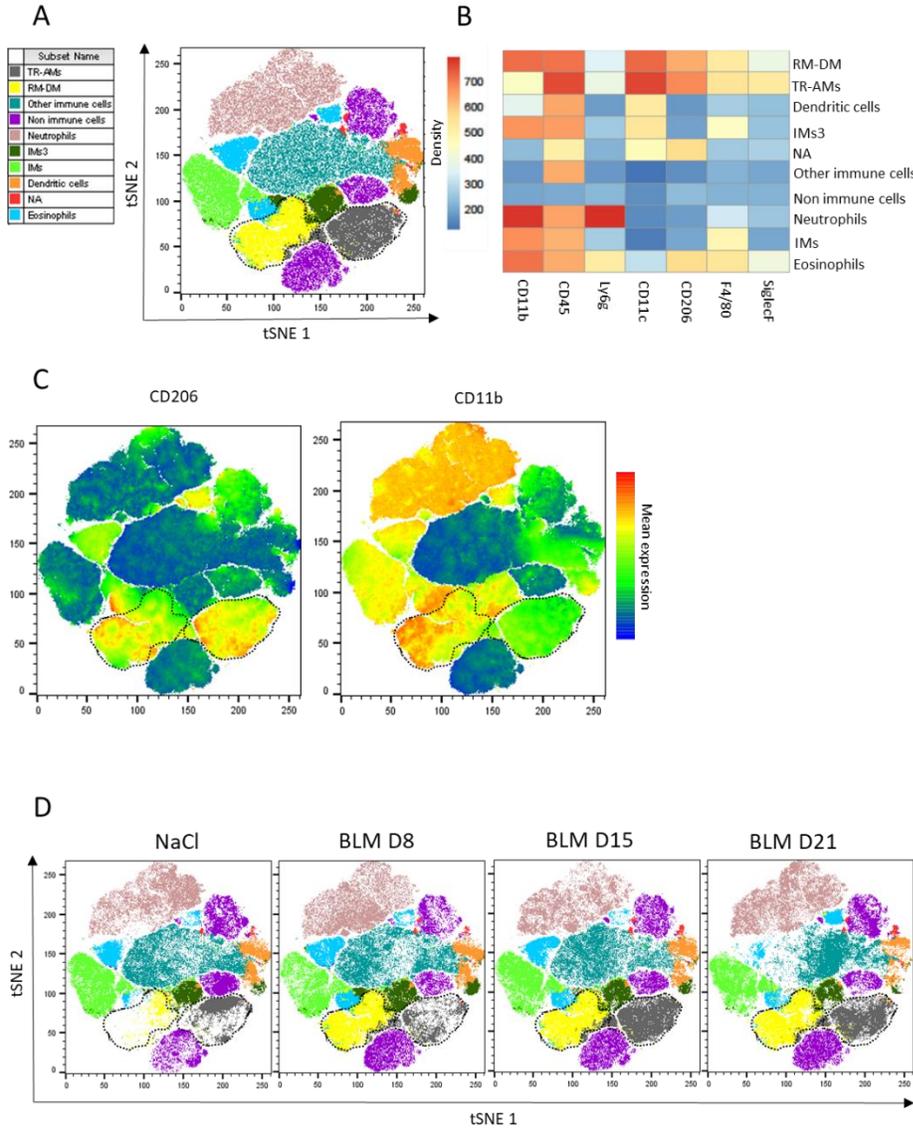
741 **Competing interests:** Authors have no competing interests to declare

742 **Data and materials availability:** All data will be available on request and after examination and
743 will require the signature of a materials transfer agreement (MTA) between parties.

744

745 **Figures**

Fig 1



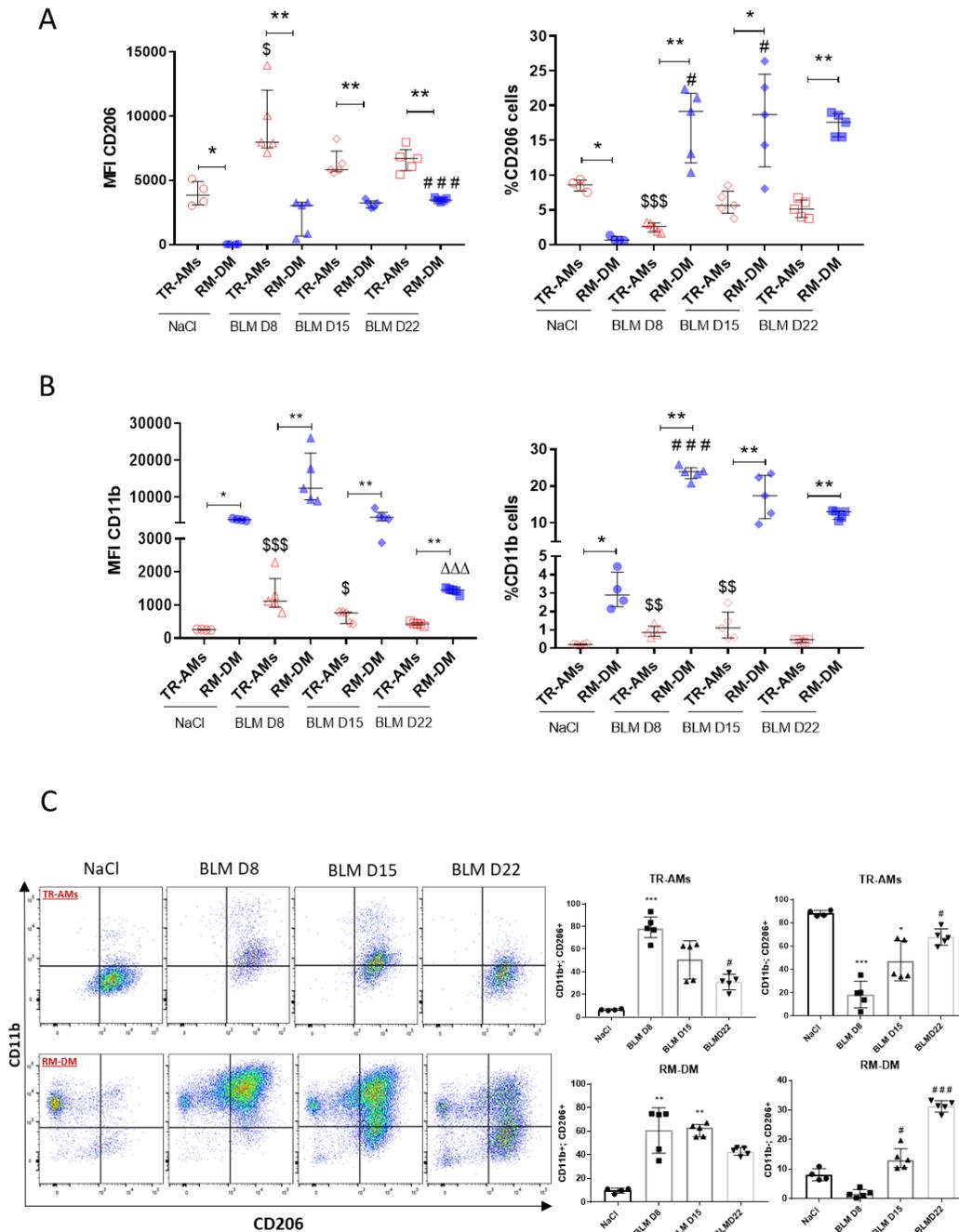
746

747 **Fig. 1 Characterization of bleomycin-induced lung fibrosis in mice by unsupervised flow**
748 **cytometry analysis**

749 (A) Representative tSNE dimension 1 and 2 density plots of the lung subpopulations determined
750 thanks to heat map (B) after intra-tracheal injection of bleomycin (BLM, 2mg/kg) or NaCl. The
751 four groups of mice (NaCl, BLM sacrificed at day 8, 15 and 21) were concatenated for this tSNE
752 analysis. (C) Representative tSNE dimension 1 and 2 density plots of lung CD206 expression (left)

753 and CD11b expression (right) in concatenated groups. (D) Representative tSNE dimension 1 and
 754 2 plots the lung subpopulations. Mice belonging to the same group were concatenated together in
 755 order to follow the evolution of each population for each time point.

Fig 2

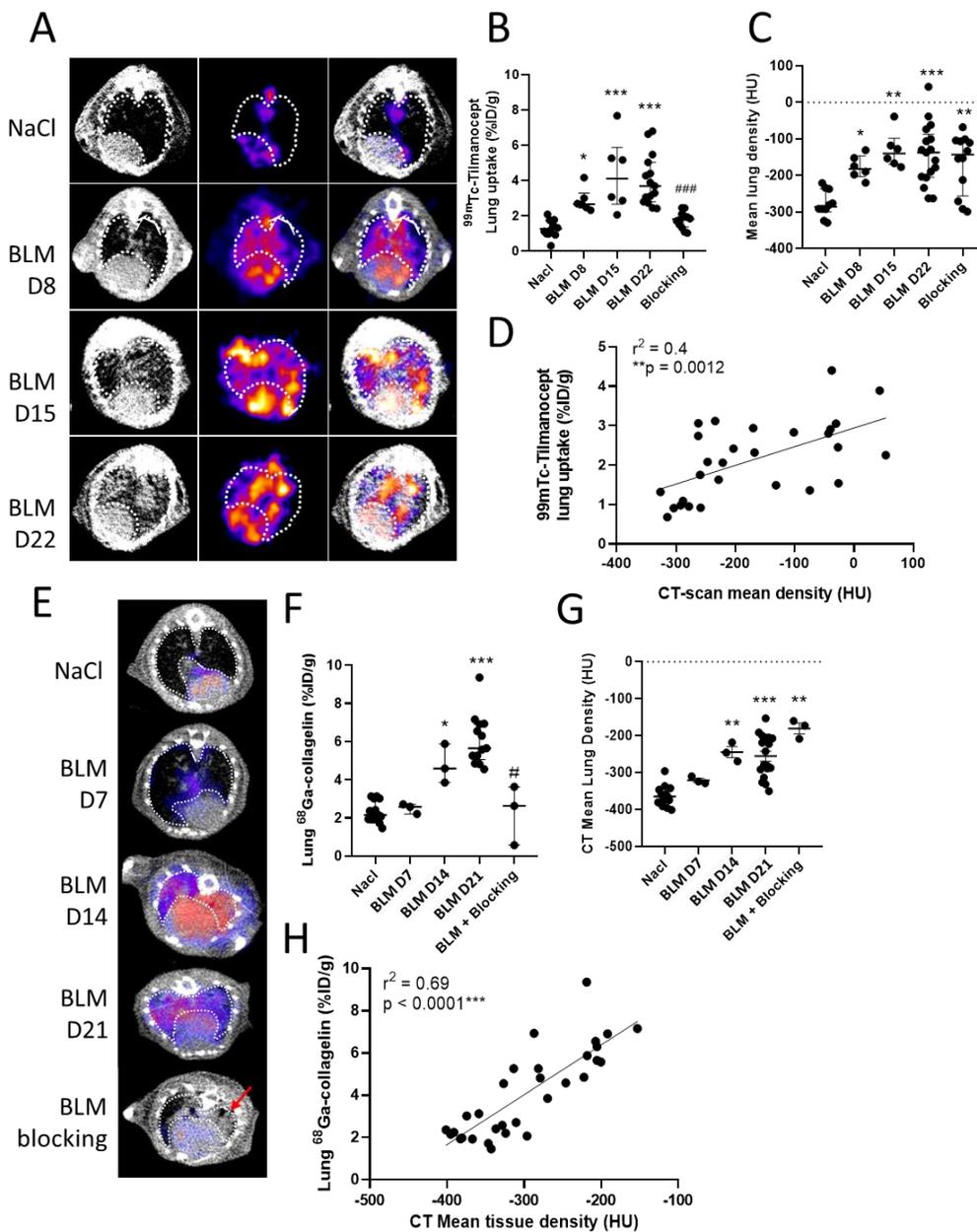


756

757 **Fig. 2** Bleomycin induces CD206 expression in lung and macrophage subpopulations

758 CD206 (A) and CD11b (B) expression were quantified using Median Fluorescence Intensity (MFI)
759 or expressed in percentage of cells expressing CD206 or CD11b in TR-AMs and RM-DMs cells.
760 Results are presented as median \pm interquartile range, NaCl n=4, BLM D8 n= 5, BLM D15 n=5,
761 BLM D22 n=5. Stars (*) are representative of comparison of RM-DMs with TR-AMs analyzed by
762 t-test Mann-Whitney. Dollars (\$) are representative of statistical comparison of each TR-AMs
763 group with TR-AMs NaCl, hashes (#) are representative of statistical comparison of each RM-DMs
764 group with RM-DMs NaCl and delta (Δ) are representative of statistical comparison of each RM-
765 DMs group with RM-DMs BLM D8. Difference between groups were compared using Kruskal-
766 Wallis non-parametric ANOVA. *(\$/#)p<0.05, **(\$\$)p<0.01, ***(\$\$\$/###/ΔΔΔ)p<0.001. (C) Supervisal
767 flow cytometry with bi-parametric analysis of CD11b and CD206 markers on RM-DMs and TR-
768 AMs populations. Results are presented as median \pm interquartile range, NaCl n=4, BLM D8 n=
769 5, BLM D15 n=5, BLM D22 n=5. Stars (*) are representative of comparison of each group with
770 NaCl and hash (#) are representative of statistical comparison each group with BLM D8.
771 Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA.
772 *(#)p<0.05, **p<0.01, ***(###)p<0.001.

Fig 3



773

774 **Fig. 3 ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagenin are able to detect advanced BLM-induced lung**
 775 **fibrosis.**

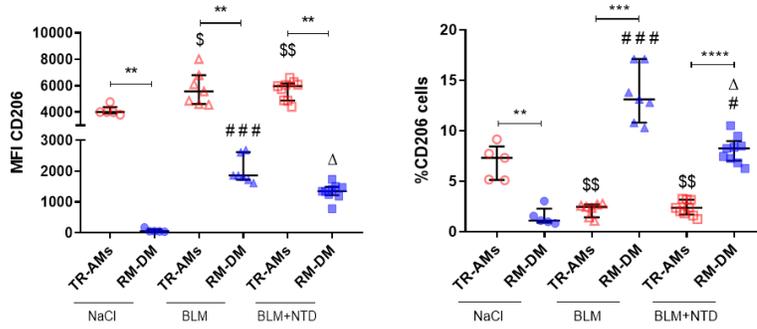
776 A/ Representative lung SPECT/CT images with ^{99m}Tc -tilmanocept of NaCl- and BLM-receiving
 777 mice at D8, D15 and D22. B/ Graph represents the ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake in %ID/g of
 778 NaCl- and BLM-receiving mice at D8, D15 and D22. Results are presented as median \pm

779 interquartile range, NaCl n=12, BLM J8 n=6, BLM J15 n=6, BLM J22 n=15. Stars (*) are
780 representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of
781 statistical comparison of blocking group with BLM D22 group. Difference between groups were
782 compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA, *p<0.05, ***(###)p<0.001. C/ Graph
783 represents the mean lung density quantified on CT images of NaCl- and BLM-receiving mice at
784 D8, D15 and D22. Results are presented as median ± interquartile range, NaCl n=12, BLM J8 n=6,
785 BLM J15 n=6, BLM J22 n=15. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis
786 non-parametric ANOVA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. D/ Correlation between mean lung
787 densities (HU) measured on CT images and ^{99m}Tc-tilmanocept lung uptake (%ID/g) of
788 corresponding lungs measured on SPECT/CT. E/ Representative lung PET/CT images with ⁶⁸Ga-
789 collagelin of NaCl- and BLM-receiving mice at D7, D14 and D21. F/ Graph represents the ⁶⁸Ga-
790 collagelin lung uptake in %ID/g of NaCl- and BLM-receiving mice at D7, D14 and D21. Results
791 are presented as median ± interquartile range, NaCl n=15, BLM J7 n=3, BLM J14 n=3, BLMJ21
792 n=12. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are
793 representative of statistical comparison of blocking group with BLM D21 group. Difference
794 between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. *(#)p<0.05,
795 ***p<0.001. G/ Graph represents the mean lung density quantified on CT images of NaCl- and
796 BLM-receiving mice at D7, D14 and D21. Results are presented as median ± interquartile range,
797 NaCl n=15, BLM J7 n=3, BLM J14 n=3, BLMJ21 n=12. Difference between groups were
798 compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. **p<0.01, ***p<0.001. H/ Correlation
799 between mean lung densities (HU) measured on CT images and ⁶⁸Ga-collagelin lung uptake
800 (%ID/g) of corresponding lungs measured on PET/CT.

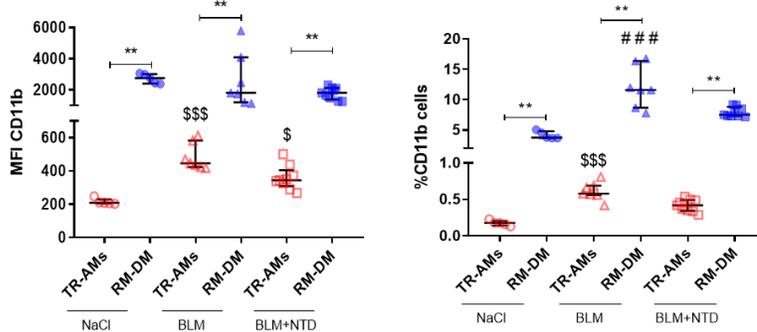
801

Fig 4

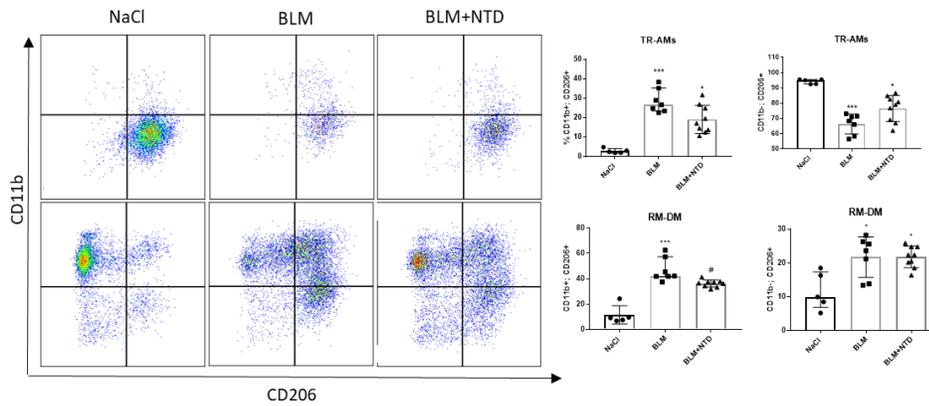
A



B



C



802

803 **Fig. 4. Nintedanib inhibits macrophagic CD206 expression**

804 CD206 (A) and CD11b (B) expression were quantified using Median Fluorescence Intensity (MFI)

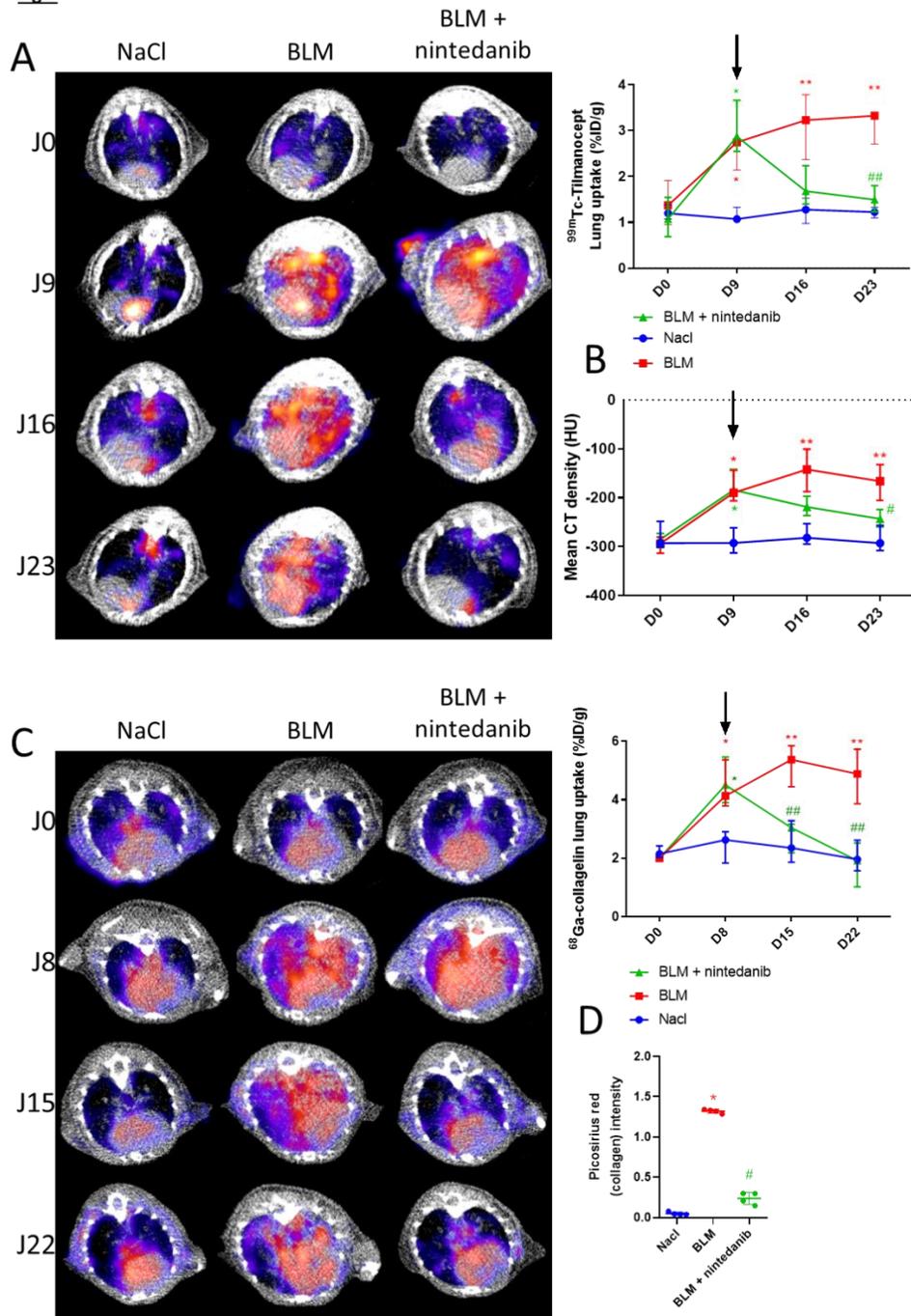
805 or expressed in percentage of cells expressing CD206 or CD11b in TR-AMs and RM-DMs cells.

806 Results are presented as median \pm interquartile range, NaCl n=5, BLM n=7, BLM+NTD n=9. Stars

807 (*) are representative of comparison of RM-DMs with TR-AMs analyzed by t-test Mann-Whitney.

808 Dollars (\$) are representative of statistical comparison of each TR-AMs group with TR-AMs
809 NaCl, hashes (#) are representative of statistical comparison of each RM-DMs group with RM-DMs
810 NaCl and delta (Δ) are representative of statistical comparison of each RM-DMs group with RM-
811 DMs BLM. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric
812 ANOVA. *(\$/#/ Δ) $p < 0.05$, **(\$\$) $p < 0.01$, ***(\$\$/###) $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (C) Supervisal flow
813 cytometry with bi-parametric analysis of CD11b and CD206 markers on RM-DMs and TR-AMs
814 populations. Results are presented as median \pm interquartile range, NaCl n=5, BLM n=7,
815 BLM+NTD n=9. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl and hash (#)
816 are representative of statistical comparison of each group with BLM. Difference between groups
817 were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. *(#) $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
818 *** $p < 0.001$.

Fig 5



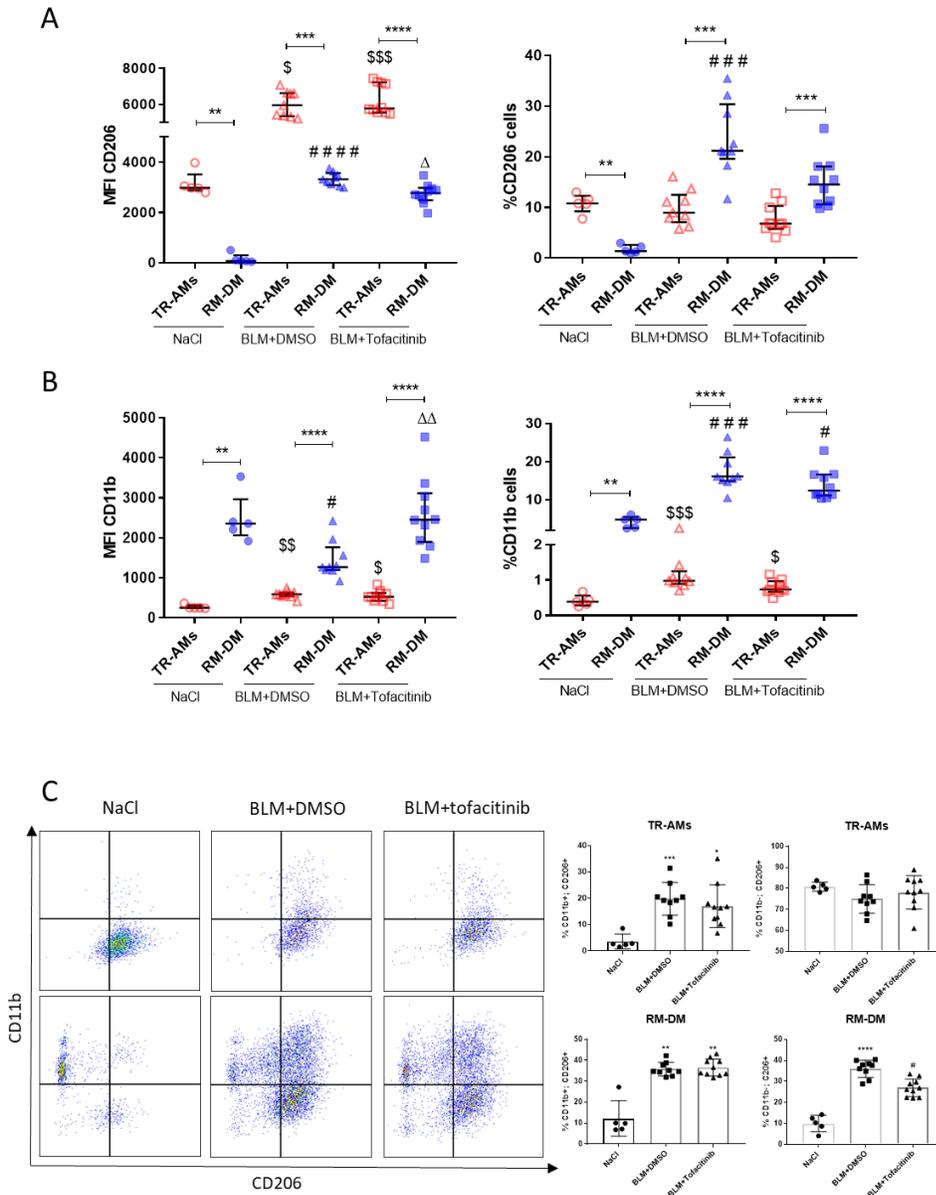
819

820 **Fig. 5 Nintedanib reduces lung fibrosis and CD206 in fibrotic lungs**

821 A/ Representative ^{99m}Tc -tilmanocept SPECT/CT images of NaCl- and BLM-receiving mice
 822 treated or not with nintedanib at D0, D9, D16 and D23. Graph represents evolution of ^{99m}Tc -
 823 tilmanocept lung uptake (%ID/g) at all time points. Results are presented as median \pm interquartile

824 range, n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of statistical comparison between time
825 points for each groups and hashes (#) are representative of statistical comparison between the
826 groups at each time points. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-
827 parametric ANOVA. *p<0.05, **(^{##})p<0.01. Black arrow represents the start of treatments. B/
828 Graph represents evolution of mean lung densities (Mean CT density) of NaCl- and BLM-
829 receiving mice treated or not with nintedanib at D0, D9, D16 and D23. Results are presented as
830 median ± interquartile range, n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of statistical
831 comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical
832 comparison between the groups at each time point. Difference between groups were compared
833 using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. *([#])p<0.05, **p<0.01. Black arrow represents the
834 start of treatments. C/ Representative ⁶⁸Ga-collagelin PET/CT images of NaCl- and BLM-
835 receiving mice treated or not with nintedanib at D0, D8, D15 and D22. Graph represents evolution
836 of ⁶⁸Ga-collagelin lung uptake (%ID/g) at all time points. Results are presented as median ±
837 interquartile range, n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of statistical comparison
838 between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison
839 between the groups at each time point. Difference between groups were compared using Kruskal-
840 Wallis non-parametric ANOVA. *p<0.05, **(^{##})p<0.01. Black arrow represents the start of
841 treatments. D/ Graph represents the intensity of picosirius red staining on lung section from of
842 NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib at D23. Results are presented as
843 median ± interquartile range, n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of comparison of
844 each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of BLM and
845 BLM + nintedanib groups, Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-
846 parametric ANOVA. *([#])p<0.05.

Fig 6



847

848 **Fig. 6 Tofacitinib reduces CD206 expression in BLM-induced fibrosis model**

849 CD206 (A) and CD11b (B) expression were quantified using Median Fluorescence Intensity (MFI)

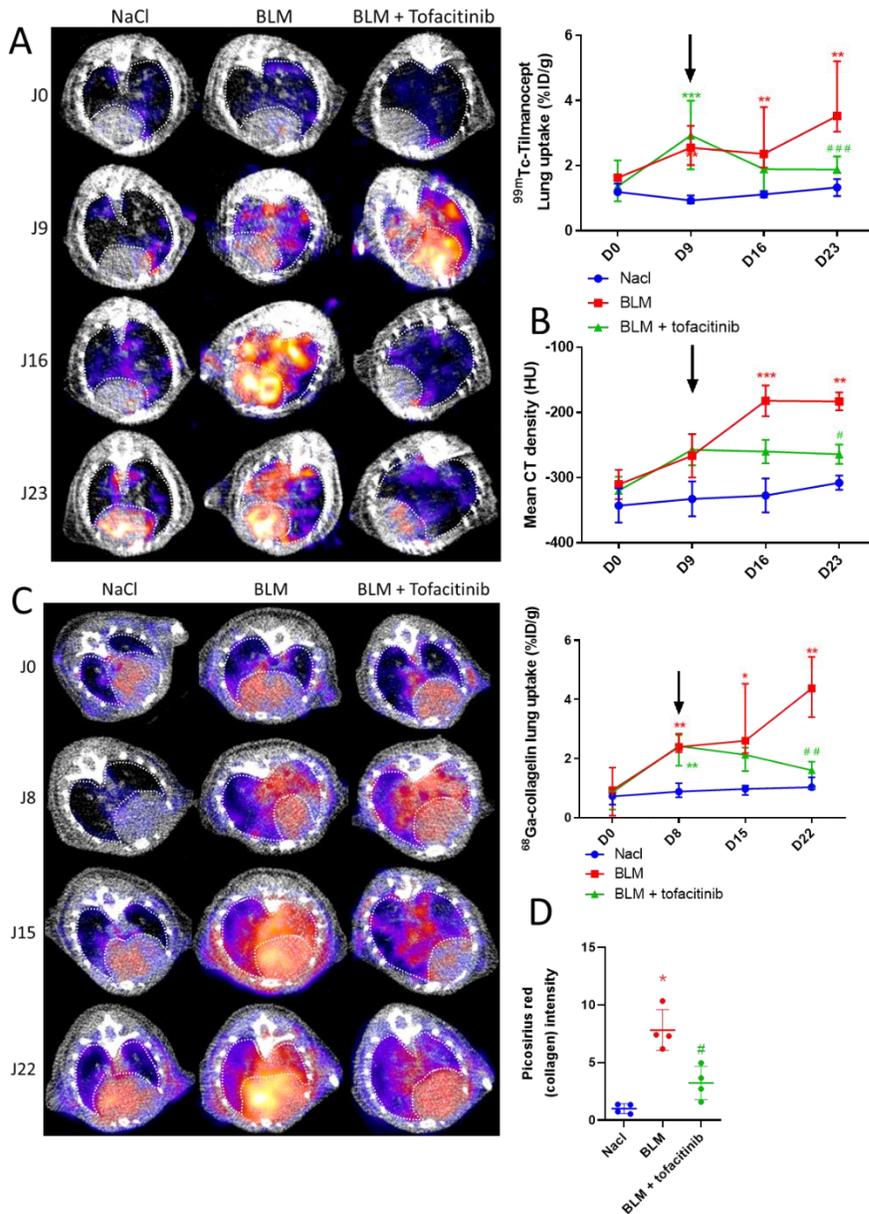
850 or expressed in percentage of cells expressing CD206 or CD11b in TR-AMs and RM-DMs cells.

851 Results are presented as median \pm interquartile range, NaCl n=5, BLM+DMSO n=9,

852 BLM+tofacitinib n=10. Stars (*) are representative of comparison of RM-DMs with TR-AMs

853 analyzed by t-test Mann-Whitney. Dollars (\$) are representative of statistical comparison of each
854 TR-AMs group with TR-AMs NaCl, hashes (#) are representative of statistical comparison of each
855 RM-DMs group with RM-DMs NaCl and delta (Δ) are representative of statistical comparison of
856 each RM-DMs group with RM-DMs BLM+DMSO. Difference between groups were compared
857 using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. *(\$/#/ Δ) $p < 0.05$, **(\$\$/ $\Delta\Delta$) $p < 0.01$, ***(\$\$/###) $p < 0.001$,
858 ****(####) $p < 0.0001$. (C) Supervisal flow cytometry with bi-parametric analysis of CD11b and
859 CD206 markers on RM-DMs and TR-AMs populations. Results are presented as median \pm
860 interquartile range, NaCl n=5, BLM n=9, BLM+NTD n=10. Stars (*) are representative of
861 comparison of each group with NaCl and hash (#) are representative of statistical comparison of
862 each group with BLM+DMSO. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis
863 non-parametric ANOVA. *(#) $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Fig 7



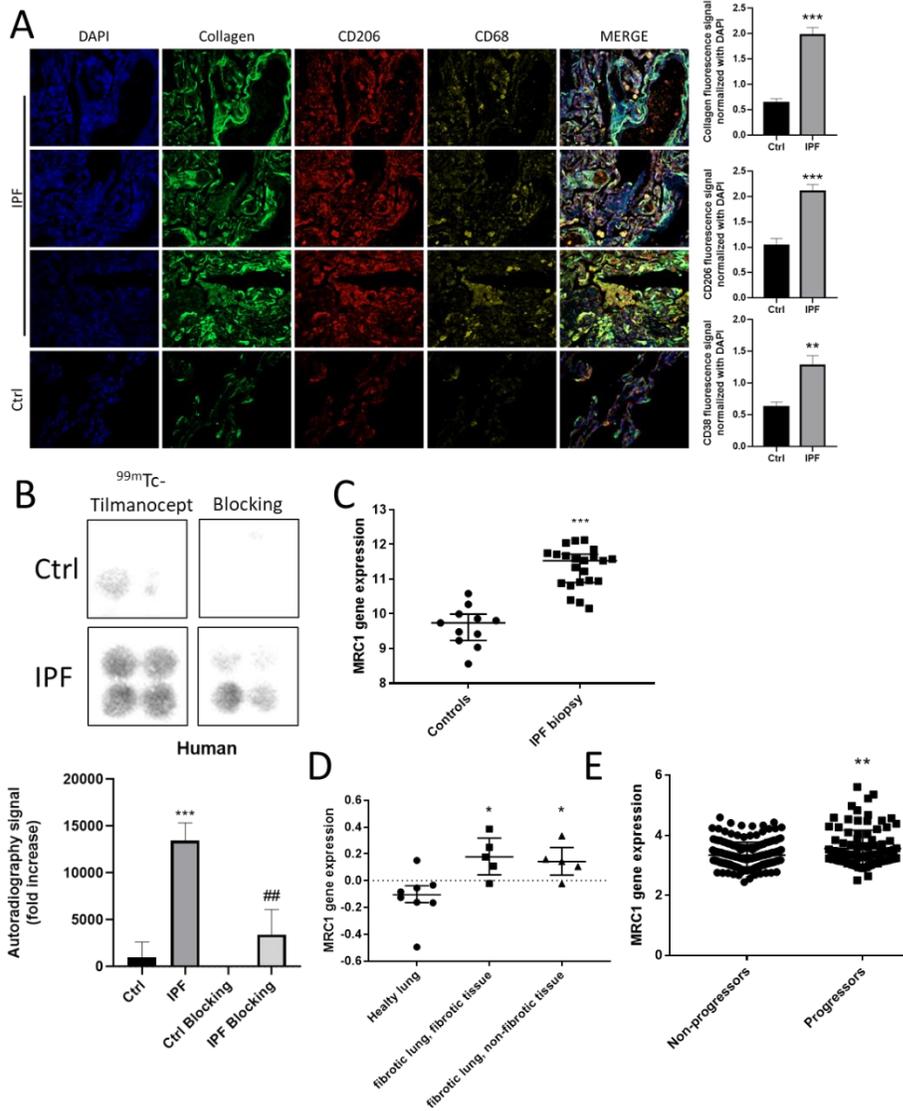
864

865 **Fig. 7 Tofacitinib reduces lung fibrosis and CD206 in fibrotic lungs**

866 A/ Representative ^{99m}Tc -tilmanocept SPECT/CT images of NaCl- and BLM-receiving mice
 867 treated or not with tofacitinib at D0, D9, D16 and D23. Graph represents evolution of ^{99m}Tc -
 868 tilmanocept lung uptake (%ID/g) at all time points. Results are presented as median \pm interquartile
 869 range, n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of statistical comparison between time
 870 points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups

871 at each time points. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-
872 parametric ANOVA. **p<0.01, ***(###)p<0.001. Black arrow represents the start of treatments. B/
873 Graph represents evolution of mean lung densities of NaCl- and BLM-receiving mice treated or
874 not with tofacitinib at D0, D9, D16 and D23. Results are presented as median ± interquartile range,
875 n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of statistical comparison between time points for
876 each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each
877 time point. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric
878 ANOVA. #p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Black arrow represents the start of treatments. C/
879 Representative ⁶⁸Ga-collagelin PET/CT images of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not
880 with tofacitinib at D0, D8, D15 and D22. Graph represents evolution of ⁶⁸Ga-collagelin lung
881 uptake (%ID/g) at all time points. Results are presented as median ± interquartile range, n = 4 for
882 all groups. Stars (*) are representative of statistical comparison between time points for each
883 groups and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time
884 points. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA.
885 *p<0.05, **(##)p<0.01. Black arrow represents the start of treatments. D/ Graph represents the
886 intensity of picosirius red staining on lung section from of NaCl- and BLM-receiving mice treated
887 or not with tofacitinib at D23. Results are presented as median ± interquartile range, n = 4 for all
888 groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#)
889 are representative of statistical comparison of BLM and BLM + tofacitinib groups, Difference
890 between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. *(#)p<0.05.

Fig 8



891

892 **Fig. 8 CD206 is a relevant target in human IPF**

893 A/ Representative IHC staining and quantification of Collagen (green), CD206 (red) and CD68

894 (yellow) on human lung biopsies from control and IPF patients. Results are presented as median ±

895 interquartile range, n = 4 for all groups. Difference between groups were compared using Mann-

896 Whitney non-parametric t-test. **p<0.01, ***p<0.001. B/ Autoradiography images and

897 quantification of ^{99m}Tc-tilmanocept on human lung biopsies from controls and IPF patients.

898 Results are presented as median ± interquartile range, n = 4 for all groups. Stars (*) are

899 representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of
900 statistical comparison of blocking group with IPF group. Difference between groups were
901 compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. ##p<0.01, ***p<0.001. C/ Analysis of
902 publicly available microarray data (accession number GSE110147) from lung samples from 22
903 IPF patients undergoing lung transplantation and 11 normal lung tissues flanking lung cancer
904 resections. Results are presented as median \pm interquartile range. Difference between groups were
905 compared using Mann-Whitney non-parametric t-test. ***p<0.001. D/ Analysis of publicly
906 available microarray data (accession number GSE68239). Lung tissues were collected from
907 patients with IPF undergoing lung transplantation. Non-transplanted donor lung tissue showing no
908 evidence of interstitial lung disease served as healthy controls. From each of the IPF patients,
909 samples were collected once from “healthy looking” (non-fibrotic) regions and from fibrotic loci.
910 Results are presented as median \pm interquartile range, n = 5 for controls and n = 5 for non-fibrotic
911 and fibrotic IPF tissue. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-
912 parametric ANOVA. *p<0.05. E/ Analysis of publicly available microarray data (accession
913 number GSE132607) from PBMC from IPF patients who underwent pulmonary function tests over
914 at least two time points. Patients experiencing a $\geq 10\%$ relative reduction in % of predicted DLCO
915 over 12 months were considered as progressors. Results are presented as mean \pm SEM, n= 181 for
916 non-progressors and n = 95 for progressors, **p<0.01, unpaired t-test.

Title: CD206⁺ alveolar macrophages are theranostic targets in experimental lung fibrosis

Authors: Lenny Pommerolle^{1,2}, Hugo Sikner³, Olivier Burgy^{1,2}, Julie Tanguy^{1,2}, Lucile Dondaine^{1,2}, Nicolas Pernet^{1,4}, Victor Goncalves⁵, Alexanne Bouchard³, Marie Monerrat³, Anaïs-Rachel Garnier³, Kjetil Ask⁶, Carmen Garrido¹, Bertrand Collin^{3,5}, Philippe Bonniaud^{1,2*}, Françoise Goirand^{1,2†}, Pierre-Simon Bellay^{2,3†}.

Affiliations:

¹*INSERM U1231, Equipe HSP-pathies, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France.*

²*Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adultes de Dijon, réseau OrphaLung, Filère RespiFil, Centre Hospitalier Universitaire de Bourgogne, Dijon, France.*

³*Centre George-François Leclerc, Service de médecine nucléaire, Plateforme d'imagerie et de radiothérapie précliniques, 1 rue du professeur Marion, Dijon, France.*

⁴*Plateforme de Cytométrie, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc 21000 Dijon, France.*

⁵*Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR CNRS 6302, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France.*

⁶*Department of Medicine, Firestone Institute for Respiratory Health, McMaster University, Hamilton, ON, Canada.*

*Corresponding author. Email: philippe.bonniaud@chu-dijon.fr.

† These authors contributed equally to this work

One Sentence Summary: CD206⁺ macrophage inhibition reduces lung fibrosis (LF) in mice and CD206 *in vivo* imaging to guide targeted therapy is a promising tool towards personalized medicine in LF.

Supplemental material

Supplemental method

Radiolabelling

Tilmanocept (Lymphoseek™, Navidea Biopharmaceuticals Europe Ltd, 62.5 µg) was reconstituted with 200 µl of 0.9% NaCl and added to a solution of ^{99m}Tc in a Lobind microtube (eppendorff) in order to obtain 2350ng of tilmanocept for 150MBq per 1mL. The microtube is then placed under agitation at 1000 rpm for 15 min at 25 ° C. The radiochemical purity was checked by radio-ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) using a γ radiochromatograph (AR-2000 Radio-TLC & Imaging Scanner (Bioscan)). The stationary chromatography phase was a cellulose chromatographic paper (Whatman Grade 1, 3MM, 31ET Chr) where 1 µl of solution was

deposited. The eluent used was acetone, it makes it possible to separate the free ^{99m}Tc from the ^{99m}Tc linked to tilmanocept. In this system, the ^{99m}Tc -tilmanocept remains at the deposition point while the radionuclide migrates to the solvent front. The radiochromatograph obtained gives the radiolabelling yield and the radiochemical purity by integration of the different peaks present. Results have been obtained using the software WinScan software.

Collagelin was synthesized in 0.1 mmol scale on a Liberty Blue™ automated microwave peptide synthesizer (CEM, USA). The synthesis was performed by using predefined Fmoc/tBu chemistry protocols on Rink amide aminomethyl-polystyrene resin (loading: 0.48 mmol/g), with DIC and OxymaPure in DMF as coupling agents, and a solution of 20% piperidine in DMF for Fmoc-deprotection steps. At the end of the elongation, the resin was treated with a cleavage solution formed of TFA/TIS/DODT/H₂O, 92.5/2.5/2.5/2.5 (v/v) (5 mL) for 2.5 h. The resin was removed by filtration and the filtrate was concentrated under a flow of nitrogen. The crude, reduced peptide was precipitated in diethyl ether and recovered by centrifugation at 4000 rpm for 10 minutes.

The peptide was then dissolved in TFA (10 mL) and DMSO (1 mL) was added. The solution was stirred at room temperature and the oxidation of collagelin was monitored by LC-MS analyses. After 3 h, TFA was evaporated and the residue was purified by semi-preparative HPLC on a BetaBasic-18 column (Thermo Scientific) (5 μm , 150 Å, 150 \times 30 mm) at 20 mL/minute, with HPLC grade eluents (A: H₂O 0.1% TFA, B: MeCN 0.1% TFA) and the following gradient program: 2% of B for 15 min and then from 2% to 50% of B in 50 min. The appropriate fractions were lyophilized to afford the target peptide, collagelin, as a white powder (with 4 TFA as counterions, as determined by ionic chromatography).

To a solution of collagelin (15 mg, 6.40 μmol , 1 equiv) in dry DMF (700 μL) were added DIPEA (15.7 μL , 89.6 μmol , 14 equiv) and (R)-NODAGA-NHS (7.0 mg, 9.60 μmol , 1.5 equiv). The

mixture was stirred at 35°C until completion of the reaction (2 h) and directly purified by semi-preparative HPLC (gradient program: 5% of B for 10 min and then from 5% to 60% of B in 50 min). NODAGA-collagelin was isolated as white fluffy powder (10.8 mg, with 5 TFA as counterions, as determined by ionic chromatography). Purity (HPLC-MS) > 96%, tR = 3.05 min. HRMS (ESI) m/z calculated for calculated for C₉₂H₁₄₃N₂₉O₃₁S₃ [M + 4H]⁴⁺ 562,49895, found 562.49990. For ⁶⁸Ga-collagelin, a gallium generator was eluted and the activity was recovered in a recovery vial. In a LoBind microtube 23mM of radiolabeling buffer (AcONa 1M), 1 mg.mL⁻¹ of collagelin (2817 g.mol⁻¹), 5.4 MBq.nmol⁻¹ were added. Then, ethanol was added to a corresponding volume of 1/10th of the radiolabeling solution. The pH of the radiolabeling solution had to be between 3.5 and 4. The microtube was placed under agitation at 1000 rpm for 5 min at 80°C. The radiochemical purity was checked by ITLC using a γ radiochromatograph. The stationary chromatography phase was SG (silica gel) where 1 μ L of solution was deposited. The eluent used was sodium citrate 0.1M pH = 5. In this system, the complexed ⁶⁸Ga remained at the deposition point while the free ⁶⁸Ga migrated to the solvent front. Results have been obtained using the software WinScan software. To validate the radiolabeling, the radiochemical purity had to be higher than 90%. The radiolabeling solution was then dissolved with Phosphate-Buffered Saline (PBS) to inject 1.5nmol of collagelin, 5MBq and 100 μ L per mouse.

Lung tissue dissociation

Briefly, mice were anesthetized with a mix of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and euthanized by abdominal aortic bleeding. Cardiac lavage was performed with NaCl 0.9% before to harvest lung. Lung was cut and digest into collagenase (1.5 mg/ml, C0130, Sigma-Aldrich) and DNase I (0.1 mg/ml, 10104159001, Roche) solution in DMEM solution for 45min at 37°C under

agitation. Medium was collected and tissue were pounded in 70 μ M filter to collect interstitial cells. The remaining red blood cells were lysed using homemade hemolytic solution (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM). The resultant cells were counted by using trypan blue and 1 million cells were used for flow cytometry staining.

Fig S1

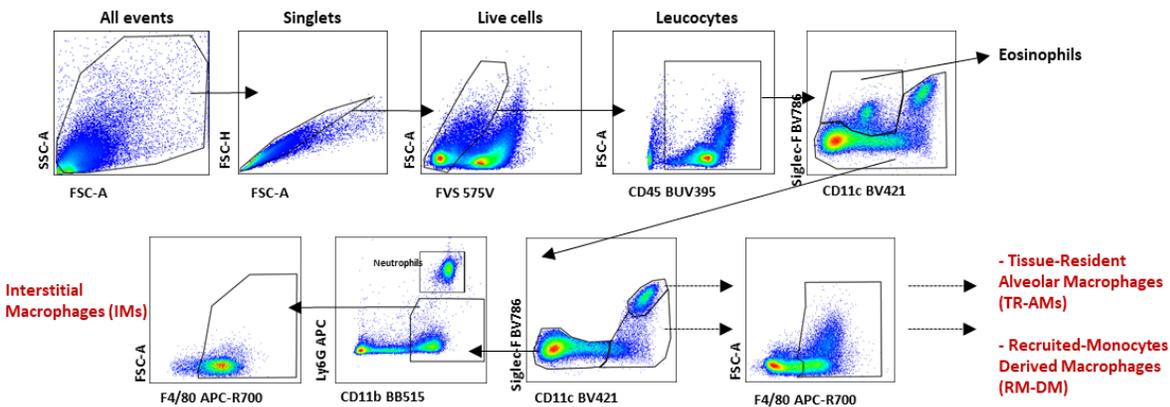


Fig. S1 Gating strategy

Gating strategy for Tissue-Resident Alveolar Macrophages (TR-AMs), Recruited-Monocytes Derived Macrophages (RM-DMs) and Interstitial Macrophages (IMs) in flow cytometry. First gates was realized to eliminate debris (SSC-A/FSC-A), doublet cells (FSC-H/FSC-A). Live cells were gated by the absence of FVS staining and leucocytes were selected by CD45 staining. Then, eosinophils were excluded from CD45 cells (CD11c^{dim}, SiglecF⁺) to avoid their PE autofluorescence. The remainder of cells were used to determine all the other gates. SiglecF⁺, CD11c⁺ cells allowed us to get TR-AMs and SiglecF^{dim}, CD11c^{dim/+} to get RM-DMs. Double negative were then gated on Ly6-g to exclude neutrophils and Ly6g⁻, Cd11b⁺ allowed us to get IMs. TR-AMs, RM-DMs and IMs were checked with F4/80 staining before MFI and percentage analysis.

Fig S2

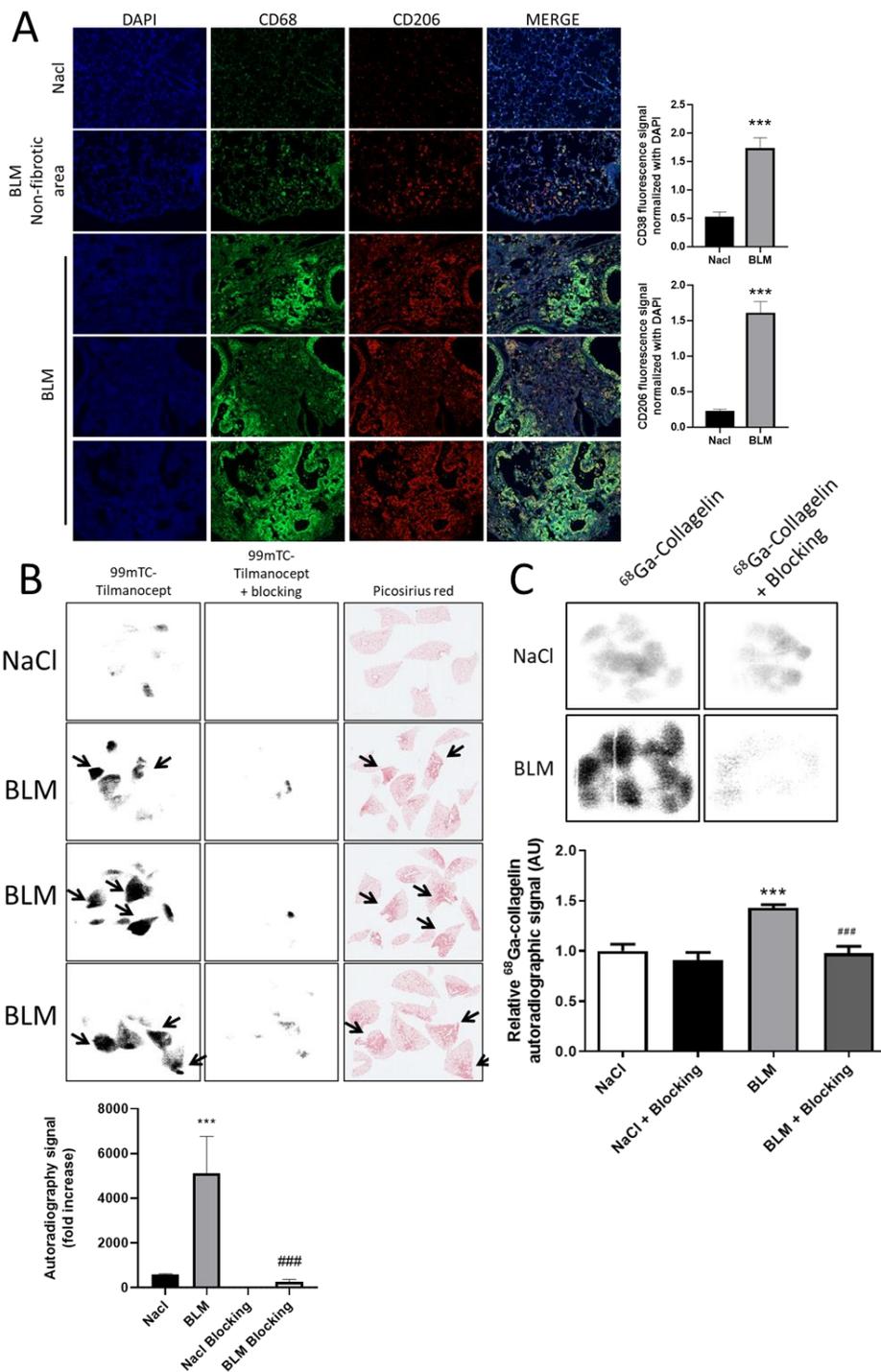


Fig. S2 CD206 is relevant target in lung fibrosis

A/ Representative IHC staining and quantification of CD206 (red) and CD68 (green) on lung sections from mice receiving NaCl or BLM (D21). Results are presented as median \pm interquartile

range, n = 5 for all groups, Difference between groups were compared using Mann-Whitney non-parametric t-test. ***p<0.001. B/ ^{99m}Tc-tilmanocept autoradiography images, PSR images and quantification on lung sections from mice receiving NaCl or BLM (D21). Results are presented as median ± interquartile range, n = 5 for all groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of blocking group with BLM group. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. ***(###)p<0.001. C/ ⁶⁸Ga-collagelin autoradiography images, and quantification on lung sections from mice receiving NaCl or BLM (D21). Results are presented as median ± interquartile range, n = 5 for all groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of blocking group with BLM group. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. ***(###)p<0.001.

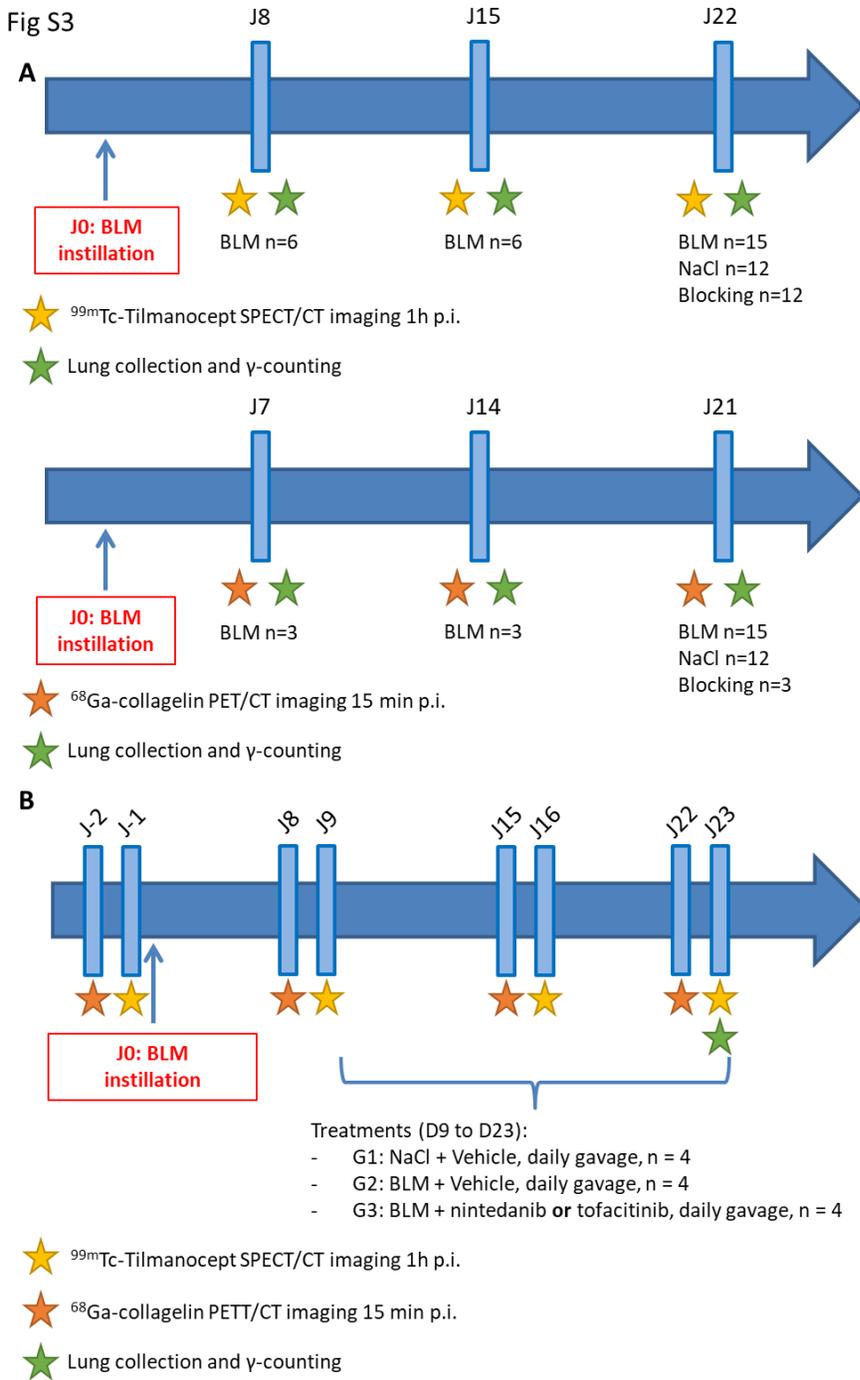


Fig. S3 In vivo experiment protocols

A/ Schematic representation of the design of the study of ^{99m}Tc-tilmanocept and ⁶⁸Ga-collagelin imaging in NaCl and BLM-receiving mice at several stage of experimental fibrosis. B/ Schematic

representation of the design of the longitudinal study of ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagelin imaging with nintedanib or tofacitinib treatments.

Fig S4

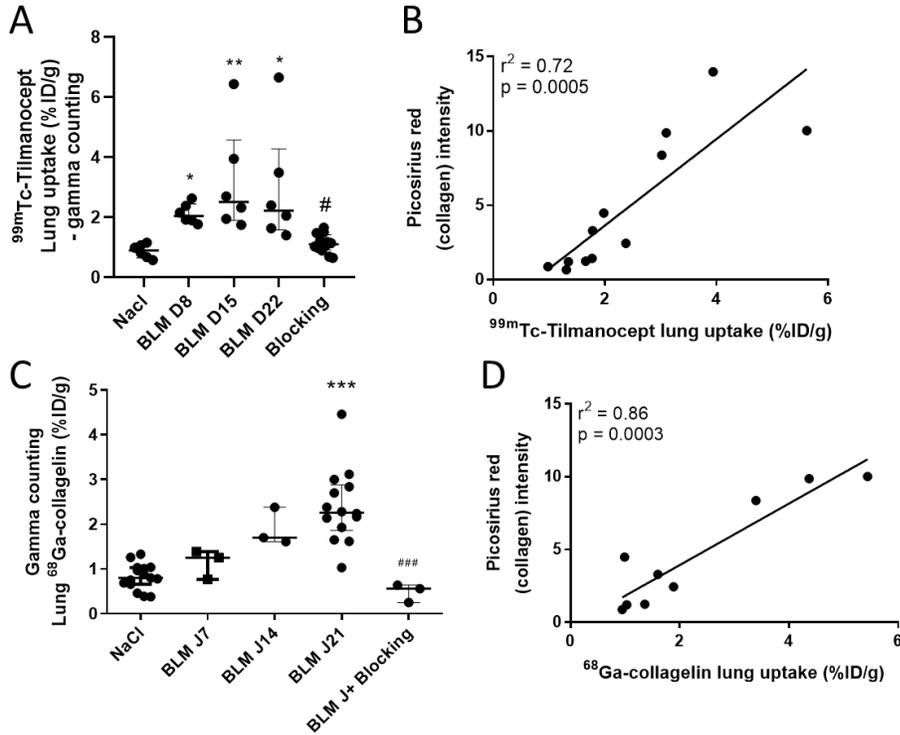


Fig. S4 ^{99m}Tc -tilmanocept and ^{68}Ga -collagelin are able to detect advanced BLM-induced lung fibrosis.

A/ Graph represents the ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake in %ID/g measured by gamma counting of NaCl- and BLM-receiving mice at D8, D15 and D22. Results are presented as median \pm interquartile range, n = 6 for all groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of blocking group with BLM D22 group. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. B/ Correlation between PSR measured on lung slides and ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake (%ID/g) of corresponding lungs measured by gamma counting. C/ Graph represents the ^{68}Ga -collagelin lung uptake in %ID/g measured by gamma counting of NaCl- and

BLM-receiving mice at D7, D14 and D21. Results are presented as median \pm interquartile range, NaCl n=15, BLM J7 n=3, BLM J14 n=3, BLMJ21 n=12. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of blocking group with BLM D21 group. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. $^{*(\#)}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$. D/ Correlation between PSR measured on lung slides and ^{68}Ga -collagenin lung uptake (%ID/g) of corresponding lungs measured by gamma counting.

Fig S5

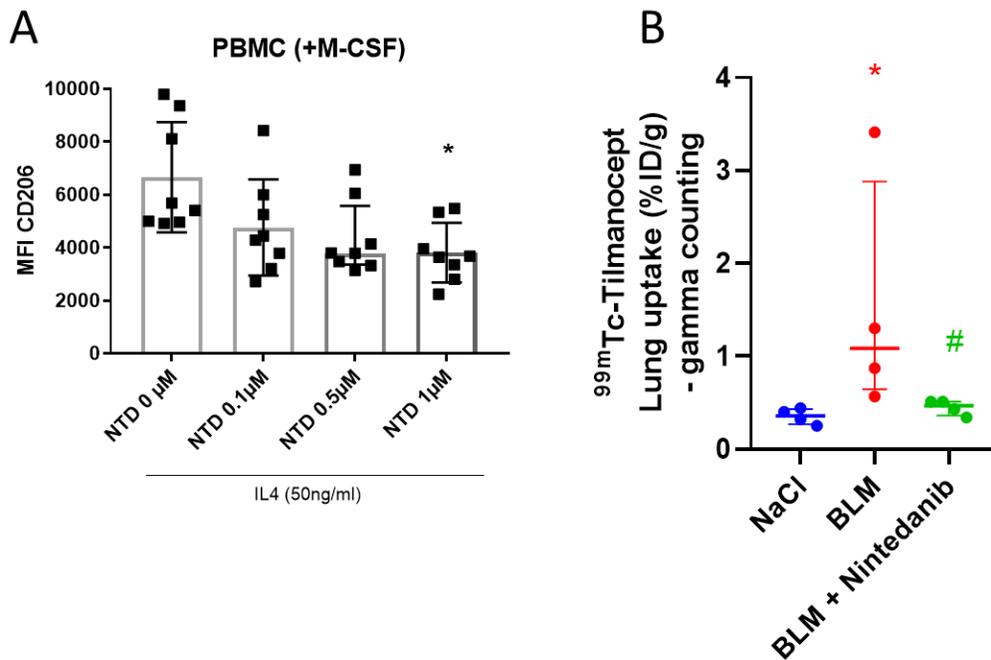


Fig. S5 Nintedanib reduces lung fibrosis and CD206 in fibrotic lungs

A/ Macrophages isolated from healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were treated for 7 days with M-CSF (100ng/ml) and then incubated 48h with IL4 (50ng/ml) with or without NTD (0 μM , 0.1 μM , 0.5 μM and 1 μM). Results are presented as median \pm interquartile range from 8 independent experiments. Stars (*) are representative of comparison of each group with NTD 0 μM . Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric

ANOVA.. * $p < 0.05$. B/ ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake (%ID/g) at D23 by gamma counting of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib. Results are presented as median \pm interquartile range, $n = 4$ for all groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of BLM and BLM + nintedanib groups. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. * $(\#)$ $p < 0.05$.

Fig S6

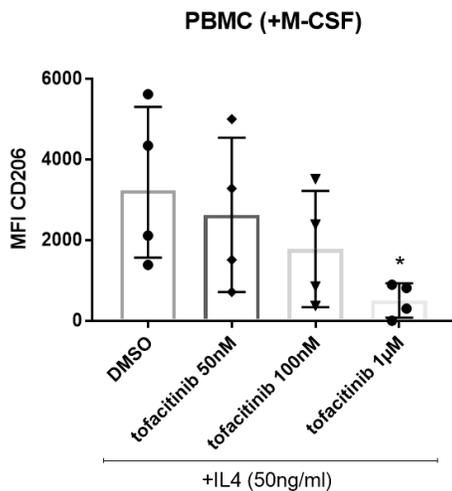


Fig. S6 Tofacitinib inhibits CD206 expression induced by IL4

Macrophages isolated from healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were treated for 7 days with M-CSF (100ng/ml), and then incubated 48h with IL-4 with tofacitinib (50nM, 100nM, 1µM) or DMSO. Results are presented as median \pm interquartile range from 4 independent experiments. Stars (*) are representative of comparison of each group with DMSO. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA.. * $p < 0.05$.

Fig S7

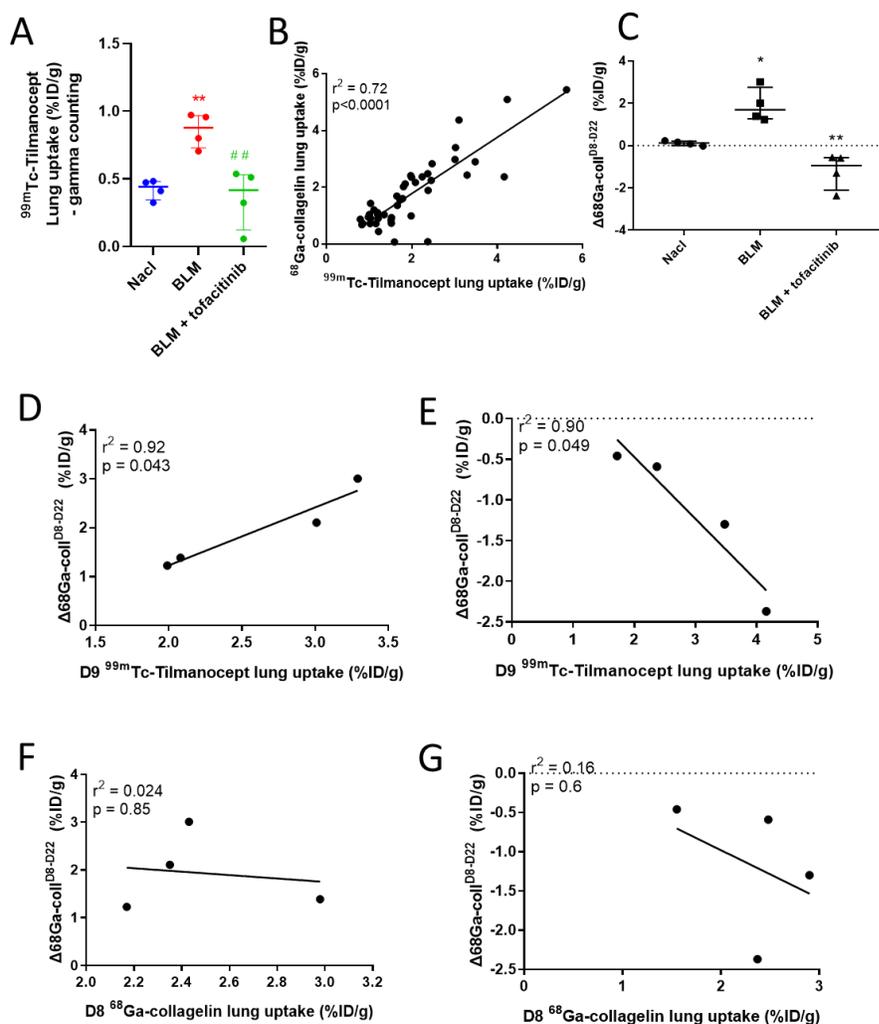


Fig. S7 Predictive value of ^{99m}Tc -tilmanocept on lung fibrosis progression

A/ ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake (%ID/g) at D23 by gamma counting of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with tofacitinib. Results are presented as median \pm interquartile range, $n = 4$ for all groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of BLM and BLM + tofacitinib groups. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. $**(\#\#)p < 0.01$. B/ Correlation between ^{68}Ga -collagen and ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake (%ID/g) in mice measured by SPECT/CT. C/ Variation of ^{68}Ga -collagen lung uptake between D8 and D22

in mice receiving NaCl, BLM or BLM + Tofacitinib. Results are presented as median \pm interquartile range, n = 4 for all groups. Stars (*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of BLM and BLM + tofacitinib groups. Difference between groups were compared using Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. *p<0.05, ##p<0.005 D/ Correlation of ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake at D9 and variation of ^{68}Ga -collagelin lung uptake between D8 and D22 in BLM treated mice. E/ Correlation of ^{99m}Tc -tilmanocept lung uptake at D9 and variation of ^{68}Ga -collagelin lung uptake between D8 and D22 in BLM + tofacitinib treated mice. F/ Correlation of ^{68}Ga -collagelin lung uptake at D8 and variation of ^{68}Ga -collagelin lung uptake between D8 and D22 in BLM treated mice. G/ Correlation and ^{68}Ga -collagelin lung uptake at D8 and variation of ^{68}Ga -collagelin lung uptake between D8 and D22 in BLM + tofacitinib treated mice.

Second projet : Etude des effets de la petite protéine de choc thermique HSP27 présente dans le compartiment extracellulaire sur le développement de la fibrose pulmonaire

La petite protéine de choc thermique HSP27 est fortement surexprimée dans le poumon de patients atteints de FPI. Notre équipe a montré au préalable, que la forme intracellulaire de cette protéine a un rôle clé dans la fibrogenèse, et son inhibition par l'oligonucléotide anti-sens OGX-427 bloque son développement¹²⁹. Des données de l'équipe, préliminaires à ma thèse, ont montré une surexpression d'HSP27 dans les LBA et liquides pleuraux des animaux rendus malades dans nos modèles de fibrose pulmonaire. Parallèlement, dans le domaine cardiovasculaire et en cancérologie, plusieurs travaux décrivent une augmentation d'HSP27 sérique chez les patients malades et dans les modèles animaux, et l'idée de l'existence de rôles distincts de cette petite HSP, selon sa localisation intra- ou extracellulaire a fait son chemin. Dans le domaine extracellulaire encore, certains décrivaient qu'HSP27 puisse interagir avec des récepteurs membranaires et se comporter comme un médiateur intercellulaire. Les principaux récepteurs cibles identifiés étaient les toll-like récepteurs (TLR), et leur activation associée à la libération de médiateurs pro- ou anti-inflammatoires. Dans les situations d'ischémie cardiaque, l'augmentation d'HSP27 était associée à une augmentation de la libération des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et ICAM-1. Dans les cellules endothéliales microvasculaires humaines, HSP27 extracellulaire aurait des effets pro-migratoires et pro-angiogéniques³⁰¹. L'augmentation des taux circulants d'HSP27 a été corrélée à la résistance au traitement de différents cancers (sein, prostate, foie, carcinome gastrique)³³⁴ et sa mesure proposée comme facteur pronostic. Dans le contexte des maladies fibrosantes, le rôle différentiel des HSP extracellulaires a surtout été étudié pour HSP70 et HSP90. Concernant HSP27, son rôle fonctionnel dans ce compartiment reste à déterminer. Dans cette partie, nous avons :

- Testé les effets d'HSP27 comme médiateur intercellulaire sur les cellules pulmonaires soumises à des conditions pro-fibrosantes
- Identifié les récepteurs avec lesquels HSP27 interagit

- Testé l'influence d'une augmentation de ses concentrations extracellulaires sur les voies de la transformation mésenchymateuse des cellules pulmonaires (*in vitro et in vivo*)
- Étudié les effets d'HSP27 sur les macrophages, leur phénotype M2 et l'activité sécrétoire associée

I. HSP27 est surexprimée en condition pro-fibrosantes

Dans le but d'explorer le rôle d'HSP27 dans le compartiment extracellulaire et de comprendre son implication dans la fibrogenèse pulmonaire, nous nous sommes premièrement intéressés à sa sécrétion chez des patients atteints de FPI, puis *in vivo* dans des modèles de fibrose pulmonaire induite chez des rongeurs, et *in vitro* dans des lignées cellulaires pulmonaires (Figure 46). Chez des patients atteints de FPI, nous avons pu observer une augmentation significative des niveaux circulants d'HSP27 en comparaison à des donneurs sains. Cependant, cette augmentation n'était pas corrélée avec une dégradation de la capacité vitale forcée (FVC) (Figure 46A). Dans les modèles murins, nous avons pu évaluer par western-blot l'expression d'HSP27 dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA) de souris 21 jours après injection de bléomycine (IV), et nos résultats montrent une augmentation de cette expression comparativement aux souris contrôles. Des résultats similaires ont été observés dans des liquides de lavages pleuraux (LLP) de rats 10 jours après l'administration d'un adénovirus codant pour le TGF- β 1 (Ad-TGF β 1). Dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine chez la souris, nous avons réalisé par western-blot, une cinétique d'évolution des concentrations d'HSP27 dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire à J5, J10 et J14 post-injection de bléomycine. Nos résultats tendent à montrer une sécrétion d'HSP27 accrue 10 et 14 jours après administration de bléomycine, soit au cours du développement de la fibrose (Figure 46B). Enfin, la sécrétion d'HSP27 dans le compartiment extracellulaire des cellules pulmonaires dans des conditions pro-fibrosantes a également été constatée sur des cellules pulmonaires épithéliales, fibroblastiques et mésothéliales en culture et traitées 48h par TGF- β 1 recombinant (Figure 46C).

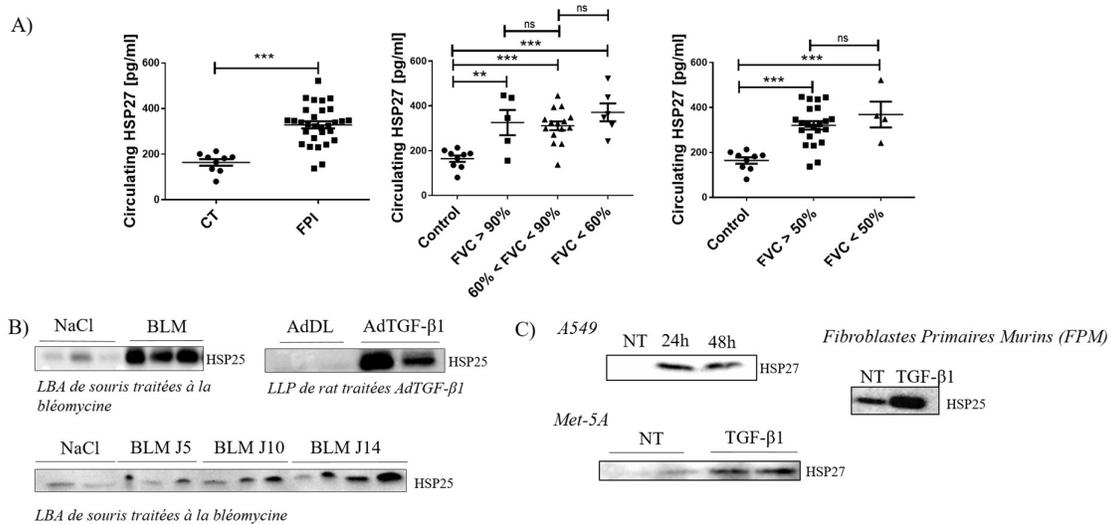


Figure 46 : Augmentation d'HSP27 extracellulaire dans des conditions de fibrose pulmonaire : A) Mesure des concentrations circulantes d'HSP27 (en pg/ml) chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) comparativement à des sujets sains (n=30 vs n=10, respectivement ***P<0,001, Mann et Withney) (à gauche), ou classés en fonction de leur capacité respiratoire (capacité vitale forcée CVF) (au milieu et à droite) (**P<0,01, et ***P<0,001 Mann et Withney). B) Analyse de l'expression protéique par western-blot d'HSP25 dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA) de souris traitées par bléomycine, 21 jours (en haut à gauche) et 5J, 10J et 14J post-injection (en bas). Analyse de l'expression protéique par western-blot d'HSP25 dans des liquides de lavages pleuraux (LLP) de rats traités avec un adénovirus TGF-β1 (AdTGF-β1) à J10 post-injection. C) Analyse protéique par western-blot d'HSP27 dans le milieu de culture de cellules épithéliales A549, mésothéliales Met-5A (n=2) et fibroblastiques primaires murines (FPM) (n=1) traitées 24 ou 48h par TGF-β1 (10 ng/mL) (n=3).

Ces résultats nous ont motivé à étudier les conséquences de cette sécrétion d'HSP27 en conditions pro-fibrosantes.

II. HSP27 potentialise la signalisation pro-fibrosante

a) L'HSP27 potentialise la transformation myofibroblastique induite par le TGF-β1 *in vitro*

Afin d'évaluer les effets de l'augmentation de la concentration d'HSP27 extracellulaire sur la transformation des cellules pulmonaires en conditions pro-fibrosantes, nous avons traité des cellules A549 et Met5A avec du TGF-β1 recombinant (rTGF-β1), de l'HSP27 humaine recombinante (rhHSP27) ou les 2 associés (Figure 47). Sur l'ensemble de ces tests, le TGF-β1 induit, comme attendu, une augmentation significative de l'expression génique de PAI-I, de TGF-β1 et de Snail. Cette augmentation des paramètres de la transformation mésenchymateuse est également corrélée avec l'augmentation de l'expression protéique de P-Erk, vimentine et PAI-I. Lorsqu'on associe TGF-β1 et HSP27, on observe une potentialisation de l'ensemble des effets du TGF-β1 précédemment cités. En revanche HSP27 seule ne modifie aucun des

paramètres évalués. On retrouve cette potentialisation des effets du TGF- β 1 par l'HSP27 sur son effet pro-migratoire, évalué par suivi microscopique du recouvrement d'une blessure effectuée dans un tapis cellulaire de cellules A549.

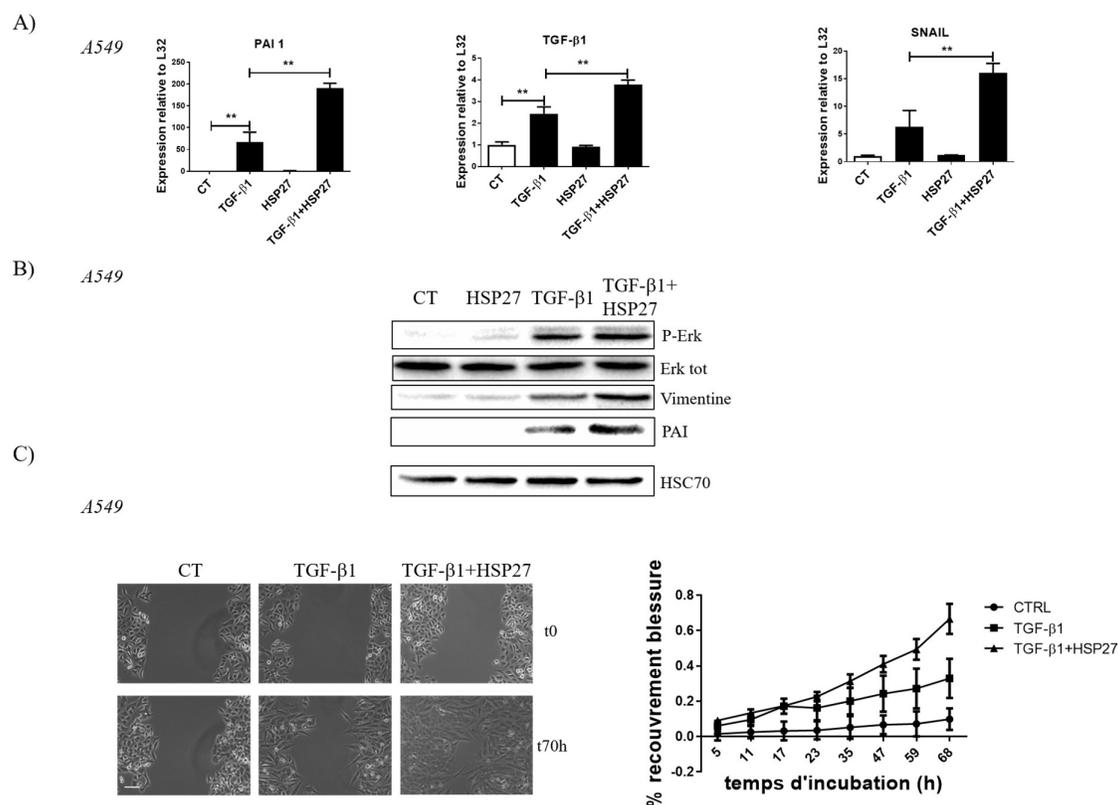


Figure 47 : HSP27 extracellulaire potentialise les effets profibrosants du TGF- β 1 : A) Analyse par RT-qPCR de l'expression de PAI-1, TGF- β 1 et Snail sur des A549 (n=3) après une stimulation 48h par rTGF- β 1 (10ng/ml), rhHSP27 (10 μ g/ml) ou les deux. (**P<0,01, Mann et Withney). B) Analyse protéique par western-blot de l'effet d'un traitement rTGF- β 1 (10ng/ml) associé à de l'rhHSP27 (10 μ g/ml) sur A549 (n=3). C) Test de cicatrisation réalisé sur tapis de cellules A549. A gauche, images (bar = 100 μ m) représentatives du tapis de cellules A549 non traitées (NT), ou traitées par TGF- β 1 (10ng/ml), ou TGF- β 1 (10ng/mL) + rhHSP27 (10 μ g/mL). A droite : analyse du recouvrement de la surface de la blessure en fonction du temps post-blessure (en heures) (n=2).

b) HSP27 extracellulaire contribue à la transformation mésenchymateuse induite par le rTGF- β 1 *in vitro*

Nous avons voulu ensuite tester l'hypothèse que, suite à la sécrétion d'HSP27 par les cellules pulmonaires, cette petite protéine chaperonne peut interagir avec les cellules environnantes et favoriser ainsi une signalisation pro-fibrosante. Pour ce faire, nous avons mis au point une expérience dite « d'échange de milieu » qui consiste à traiter une première série de cellules avec du rTGF- β 1 et de collecter le milieu de culture après 24h d'incubation. Ce milieu est ensuite mis en contact de billes couplées avec des anticorps anti-HSP27 (Ac-HSP27)

ou des Ig, dans le but d'immunodépléter ou non le milieu de culture en HSP27 (milieu conditionné). Ce milieu conditionné est ensuite mis en contact avec une seconde série de cellules pendant 48h et son effet sur les cellules est évalué par western-blot. Pour valider notre expérience, nous avons vérifié l'immunodéplétion d'HSP27 en éluant les billes et en s'assurant de la présence d'HSP27 par western-blot dans les éluats des « billes Ac-HSP27 » et son absence dans les « billes Ig ».

Nos résultats montrent les effets du rTGF- β 1 sur la première série de cellules A549, notamment sur les marqueurs de la transformation mésenchymateuse (Figure 48). Nous pouvons observer une augmentation du signal de la N-cadhérine, de PAI-I, de la vimentine et d'HSP27 ainsi qu'une diminution du signal de l'E-cadhérine. Sur la deuxième série de cellules A549, nous pouvons voir qu'un milieu conditionné avec des billes Ig induit de la même façon l'expression des marqueurs de la transformation mésenchymateuse. En revanche, un milieu déplété en HSP27 (Ac-HSP27) n'a plus ces effets. Nous observons une augmentation moins prononcée de N-cadhérine, PAI-I, vimentine et HSP27 et une légère augmentation du signal de l'E-cadhérine. Des effets similaires ont été observés sur des cellules Met-5A (Figure 48).

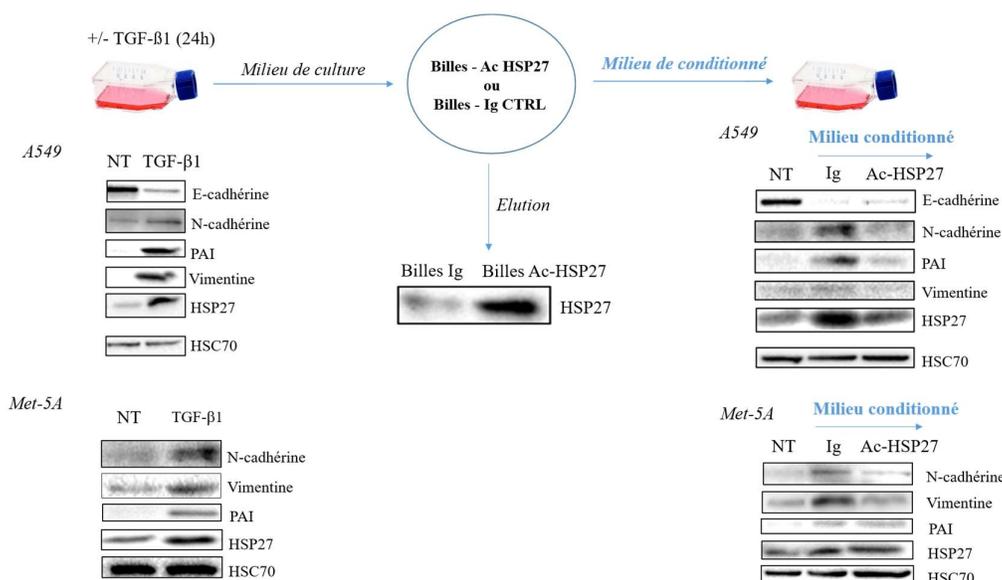


Figure 48 : Effets paracrines d'HSP27 libérée suite à une stimulation par rTGF- β 1 : Analyse par western-blot de l'expression protéique des marqueurs de la transformation mésenchymateuse de cellules A549 ou Met-5A traitées 24h avec du TGF- β 1 (10 ng/ml) (western blot de gauche). Analyse western-blot de l'expression protéique de marqueurs de la transformation mésenchymateuse de cellules A549 ou Met-5A traitées 48h avec des milieux conditionnés immunodéplétés en HSP27 (Ac-HSP27) ou non (Ig) (western-blot de droite). Ig : Immunoglobuline, Ac-HSP27 (anticorps anti-HSP27) n=2.

c) L'administration de rHSP27 semble augmenter l'intensité de la fibrose pulmonaire *in vivo*

Pour vérifier cet effet aggravant d'HSP27 sur la transformation mésenchymateuse des cellules pulmonaires, nous avons testé *in vivo* les effets de l'administration d'HSP27 dans un modèle de fibrose induite par injection intra-veineuse (IV) de bléomycine chez la souris (Figure 49). La protéine recombinante a été administrée à J10 et J18 par voie intra-trachéale et les animaux sacrifiés à J21. Nos résultats montrent que l'administration IT d'rHSP27 induit une augmentation des quantités de collagène accumulées dans le tissu pulmonaire et évaluées par coloration au rouge Sirius. Par marquage H&E, on observe une tendance à l'augmentation du score d'Ashcroft des poumons des animaux traités par bléomycine et HSP25 par rapport à ceux traités uniquement par bléomycine.

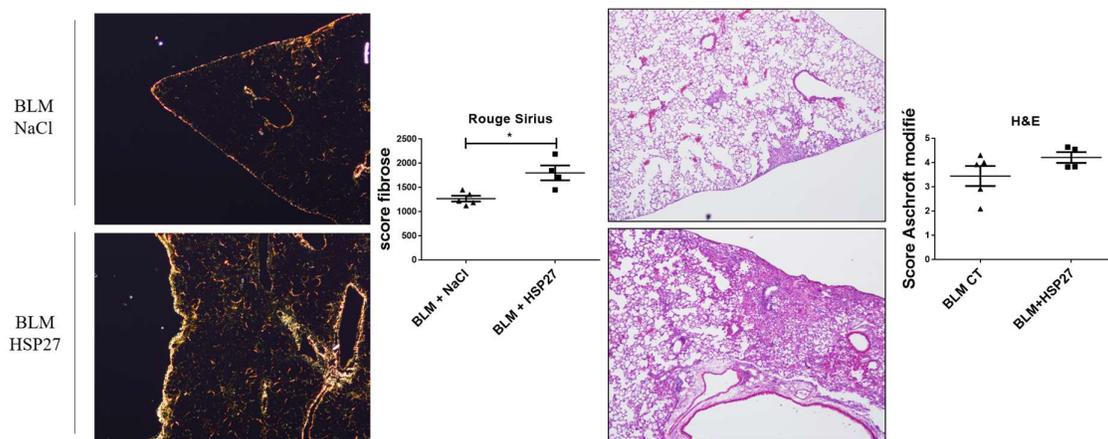


Figure 49 : Le traitement par HSP25 recombinante induit une aggravation de la fibrose pulmonaire chez la souris : (Gauche) Marquage au rouge sirius de coupes histologiques de poumons de souris ayant reçu de la bléomycine et des injections intratrachéale (IT) de NaCl (groupe BLM + NaCl) ou d'rHSP27 (BLM + HSP27, 600 µg/kg préparé dans 60µl). Un score de fibrose a ensuite été mesuré pour chaque souris (un point correspond à une souris). (Droite) Coupe histologique de poumons marqués à l'hématoxyline & éosine (H&E) des mêmes groupes. Un score de fibrose a ensuite été déterminé selon la méthode d'Ashcroft modifié (un point correspond à une souris). BLM NaCl n=5, BLM HSP27 n=4. *p<0,05 (Mann et Withney).

Suite à ces résultats encourageants, nous avons réitéré plusieurs expériences *in vivo* ayant pour but de contrôler ces effets potentialisateurs d'HSP27 recombinante sur la gravité de la fibrose induite par la bléomycine. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à retrouver des résultats similaires.

III. Signalisation induite par HSP27 extracellulaire

Nous avons ensuite essayé de comprendre comment HSP27 potentialise la transformation mésenchymateuse induite par le TGF-β1. HSP27 a été décrit dans la littérature comme pouvant interagir avec les TLRs et ainsi induire la voie de signalisation NF-κB, et donc la

phosphorylation d'I κ B^{300,301}. Nous avons pu mettre en évidence, par immunofluorescence, sur cellules A549 que de l'rhHSP27 taguée histidine (HSP27-His) colocalise avec les récepteurs de surface TLR4 (Figure 50A) et TLR2 (résultats non montrés). De plus, ce traitement induit également une translocation de p65 (une sous-unité du complexe NF- κ B) ce qui traduit d'une activation de cette signalisation (Figure 50B). Pour aller plus loin, nous avons recherché par western-blot les voies de signalisation induites en réponse à une stimulation courte d'rhHSP27 sur le même type cellulaire (A549). Nous avons pu observer qu'une stimulation de 30 min et 1h entraîne l'augmentation de la phosphorylation d'Akt, p65, Erk et I κ B. De plus, la phosphorylation d'I κ B est accompagnée d'une diminution du signal d'I κ B total, ce qui suggère sa dégradation (Figure 50C). Pour affirmer que cette signalisation est dépendante de l'interaction d'HSP27 avec les TLR4 ou 2, nous avons traité à nouveau des cellules A549 avec de l'rhHSP27 pendant 1h, mais cette fois-ci en présence d'anticorps bloquant TLR4 (Ab TLR4) ou TLR2 (Ab TLR2) (respectivement figure 50D ; 50E). Ces résultats, encore préliminaires, laissent apparaître une signalisation dépendante de ces deux récepteurs et de I κ B (figure 50D). Lorsque l'on traite des cellules A549 par de l'rhHSP27 en présence ou non d'anticorps dirigés contre les TLR, on observe que l'Ab anti-TLR4 réduit la phosphorylation de I κ B, et ce quelle que soit la dose d'anticorps utilisée (Figure 50D). En revanche, l'utilisation de concentrations similaires d'Ab TLR2 semble réduire d'avantage la phosphorylation de I κ B (Figure 50E). Dans ces deux expériences, une stimulation avec du LPS a été utilisé comme contrôle positif d'activation d'I κ B.

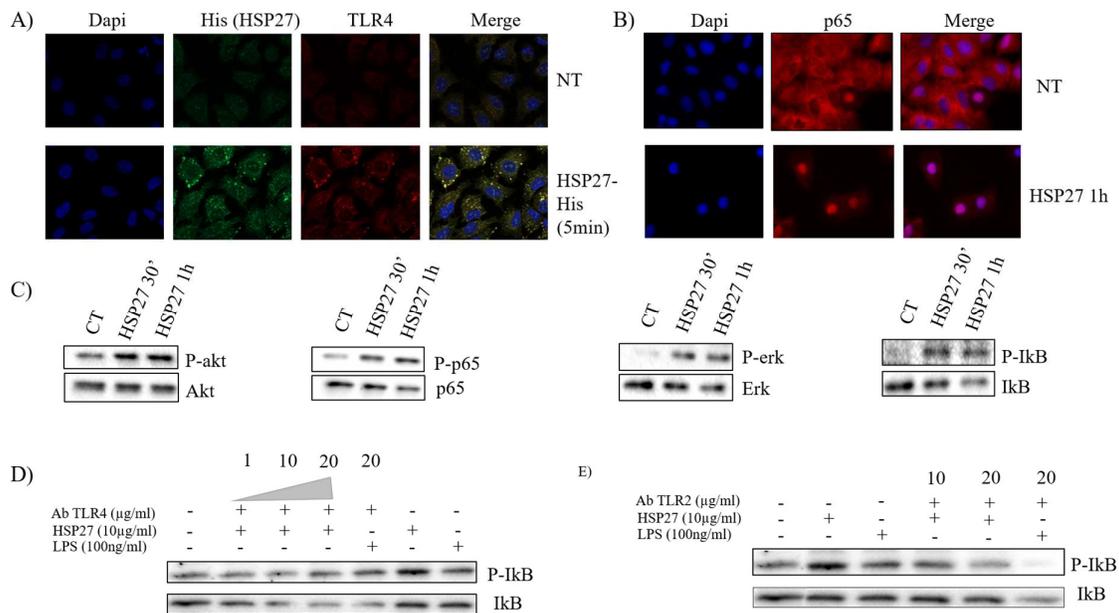


Figure 50 : Un traitement rHSP27 active des voies de signalisation non-canoniques du TGF- β 1 de manière TLR4/2 dépendante : A) Immunofluorescence réalisée sur A549 après 5 min de traitement par rhHSP27-His (10 μ g/ml). Bleu : coloration nucléaire DAPI, Rouge : TLR4, Vert : His tag. B) Immunofluorescence réalisée sur A549 à la suite d'un traitement d'1h par rhHSP27 (10 μ g/ml). Bleu : coloration nucléaire DAPI, Rouge : NF- κ B. C) Analyse protéique par western-blot de cellules A549 traitées 30min ou 1h avec de l'rHSP27 à 10 μ g/ml (n=3). D) Des cellules A549 ont été pré-incubées 1h avec des anticorps bloquants TLR4 (Ab TLR4) avant stimulation 1h avec de l'HSP27 recombinante humaine (rhHSP27) à raison de 10 μ g/ml ou de LPS (100ng/ml) n=1. E) Des cellules A549 ont été pré-incubées 1h avec des anticorps bloquants TLR2 (Ab TLR2) avant stimulation 1h avec de l'HSP27 recombinante humaine (rhHSP27) à raison de 10 μ g/ml ou de LPS (100ng/ml). n=1.

IV. Effets d'HSP27 extracellulaire sur les macrophages : stimulation de la libération de cytokines pro-fibrosantes ?

Les macrophages sont connus pour répondre à une stimulation HSP27 extracellulaire^{302,304,305}, et ils expriment à leur surface une diversité de récepteurs TLR. Par ailleurs, ces cellules sont impliquées dans le développement de la fibrose pulmonaire. C'est pourquoi nous avons décidé d'explorer les effets de la stimulation des macrophages par HSP27, en utilisant deux modèles de cellules primaires : un modèle murin de macrophages dérivés de la moelle-osseuse (*Bone Marrow-Derived Macrophages* ou BMDM), et un modèle humain de macrophages issus de donneurs sains (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* ou PBMC).

a) Effets d'HSP27 sur les cellules BMDM

Le traitement des BMDM par de l'rHSP27 (HSP25) a induit une augmentation significative de l'expression génique d'IL-10, d'IL-1 β et de CXCL10 à la concentration testée la plus importante (30 μ g/ml) (Figure 51A). Après collecte des milieux de culture issus de cette

expérience, des fibroblastes primaires murins (FPM) ont été incubés 48h avec ces milieux conditionnés. Nos résultats montrent que le traitement par un milieu conditionné de cellules BMDM traitées par HSP25 (30 µg/mL) induit une augmentation de l'expression protéique d'α-SMA plus importante que le milieu conditionné contrôle (CT) (Figure 51B).

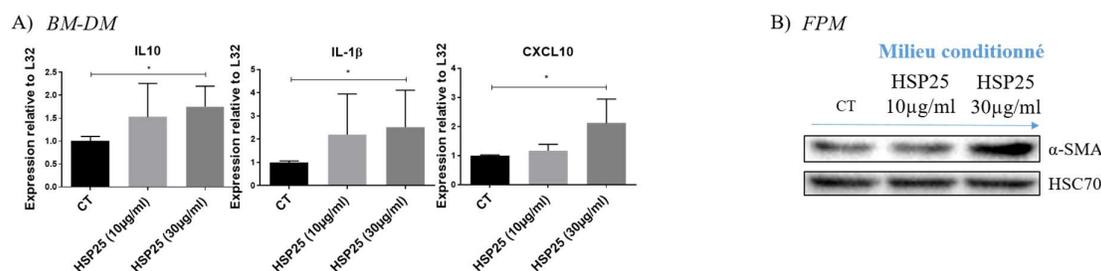


Figure 51 : rHSP25 stimule la sécrétion de cytokines par les BMDM, capables d'induire la synthèse de facteurs favorisant la transition myofibroblastique des fibroblastes primaires murins : A) Analyse de l'expression génique par RT-qPCR d'IL-10, IL-1β et CXCL10 après 24h de traitement des BMDM rHSP27 (HSP25) (10µg/ml, 30µg/ml) (n=3, *p<0.05 Mann et Withney). B) Analyse protéique par western-blot de fibroblastes primaires murins (FPM) traités 48h par les milieux conditionnés issus du traitement des BMDM par rmHSP27 (10 et 30 µg/mL), n=2.

b) Effets d'HSP27 sur les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear cells)

Nous avons aussi traité des macrophages dérivés de PBMC humains et pré-incubés 7 jours avec du M-CSF, par de l'HSP27 recombinante (Figure 52). Une augmentation significative de l'expression d'IL-1β, PPAR-γ et de TGF-β1 est observée dans les cellules traitées par rHSP27 à 30µg/ml. Nous n'observons qu'une tendance à l'augmentation de MRC1 et TNF-α à la même concentration, ce qui peut s'expliquer par le faible nombre de répétitions de cette expérimentation (n=2). (Figure 52A). Par ailleurs, une analyse phénotypique par cytométrie en flux a permis de tester les effets d'rHSP27 sur l'expression membranaire de CD206, CD80 et HLA-DR (CMH-II), utilisés comme marqueurs phénotypiques des cellules macrophagiques (Figure 52A). De manière intéressante, rHSP27 induit une augmentation significative du marquage de CD206 et de CD80, caractéristique du phénotype M2, et ce à la concentration de 30µg/ml. En revanche, l'expression de HLA-DR semble être réduite par ce traitement (Figure 52B). La stimulation des cellules macrophagiques par l'IL-4 constitue le contrôle positif d'induction du phénotype M2 des macrophages, matérialisé par l'augmentation de l'expression du CD206. (Figure 52B)

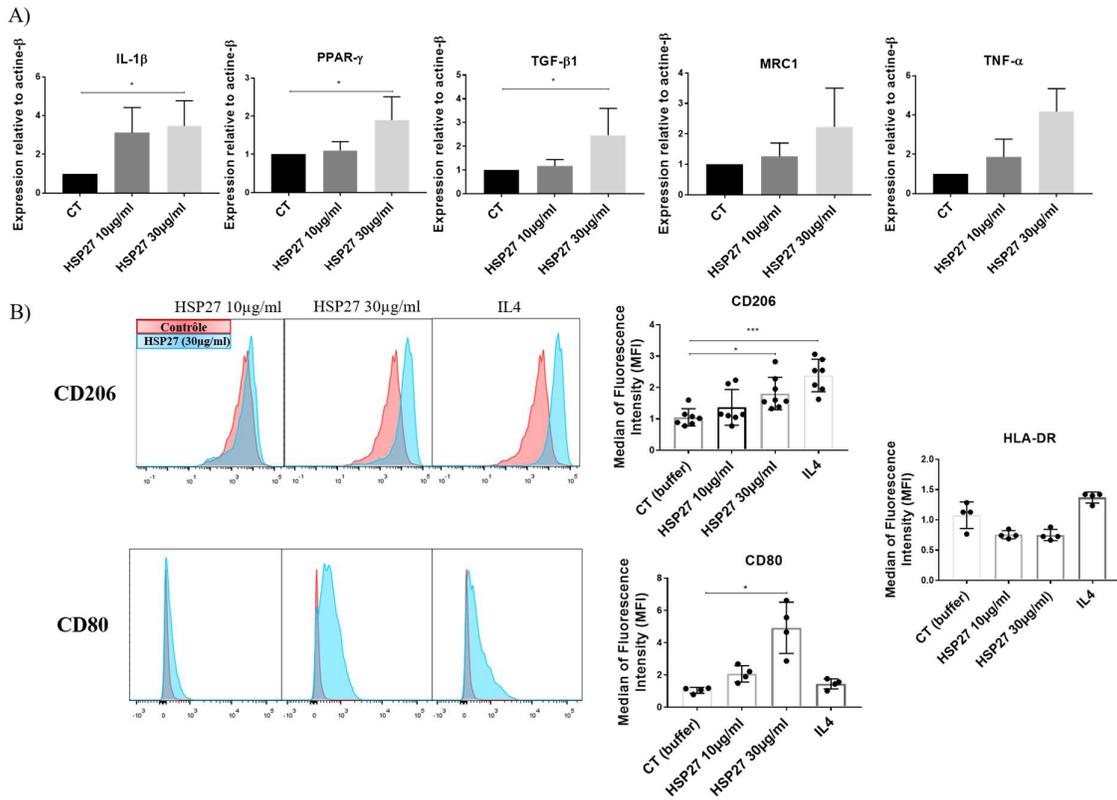


Figure 52 : HSP27 stimule l'expression du phénotype M2 des macrophages primaires humains : Après une incubation de 7 jours avec du M-CSF, les macrophages alors dit M2-like ont été stimulés 48h avec de l'rhHSP27 (10µg/ml et 30µg/ml) ou de l'IL4. A) Analyse de l'expression génique d'IL-1β, PPAR-γ, TGF-β1, MRC5 et TNF-α par RT-qPCR après 48h de traitement par rhHSP27 à 10µg/ml ou 30µg/ml (n=3 pour IL-1β, PPAR-γ et TGF-β1 et n=2 pour l'évaluation de MRC5 et TNF-α. *p<0,05). B) Analyse phénotypique de l'expression membranaire de CD206, CD80 et HLA-DR après 48h de traitement par rhHSP27 à 10µg/ml ou 30µg/ml. Le traitement par IL-4 a été réalisée à 50ng/ml. CD206 n=7, CD80 et HLA-DR n=4. *p<0,05, *** p<0,001.

Troisième projet : Test des effets d'un oligonucléotide anti-sens (LASO) dirigé contre HSPB5 sur le développement de la fibrose pulmonaire

Un des axes de ma thèse a été d'étudier les effets d'un oligonucléotide, le LASO-22 sur les mécanismes de la transition myofibroblastique *in cellulo* et le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine *in vivo* chez la souris.

Ce travail s'intègre dans un projet majeur de l'équipe, qui consiste à sélectionner et caractériser des composés inhibiteurs d' α B-crystallin et efficaces pour limiter le développement de la fibrose pulmonaire. Ce projet a été financé par l'ANR SHOT-IPF obtenue en 2016. Dans ce cadre, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr Palma Rocci (UMR-Inserm 1068) qui a synthétisé des oligonucléotides dirigés contre α B-crystallin. Le travail d'un autre étudiant de l'équipe Pierre-Marie Boutanquoi, a permis d'identifier un oligonucléotide efficace dans nos modèles, l'ASO-22 (séquence 5'CCATTCACAGTGAGGACCCC). Mon travail fait suite au sien, et a eu pour objectif d'étudier un ASO de seconde génération, le LASO-22 correspondant à l'ASO-22 modifié, par conjugaison à des radicaux lipidiques. Cette conjugaison à des radicaux lipidiques a pour but d'améliorer la bio-distribution du composé.

Brièvement, et pour repositionner mon travail, l'ASO-22 avait montré ses capacités à inhiber α B-crystallin et à bloquer l'induction de l'expression de protéines profibrosantes (collagène A1, α -SMA, PAI, E-cadherine) à la fois sur des modèles de cellules pulmonaires épithéliales et fibroblastiques humaines et murines, traitées par TGF- β 1 (10 ng/mL) pendant 48h. Sur le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, l'administration IV chronique de l'ASO-22 testé à 3 doses (6, 12 et 18 mg/kg), à partir de J9 post-bléomycine, avait permis de réduire considérablement l'accumulation de collagène dans le tissu pulmonaire et ainsi de prévenir le développement de la fibrose. La dose de 12 mg/kg semblait être la plus efficace. Ce traitement diminuait aussi les effets inducteurs du traitement par bléomycine, sur l'expression génique d' α B-crystallin (HSPB5) dans le tissu pulmonaire total, ainsi que celle du collagène (*colla1*), et d' α -SMA (*acta2*). Ces précédents travaux nous avaient permis de valider un modèle de coupes pulmonaires de poumons de souris, mis en culture à l'issue du traitement par bléomycine, 21 jours après l'administration IT, pour tester des molécules actives pour leur capacité à faire régresser la fibrose. L'étude du LASO-22 a débuté sur ce modèle. Notre étude a donc consisté à :

- Comparer *ex vivo* les effets de l'ASO-22 et du LASO-22 sur coupes de tissus pulmonaires de souris traitées par bléomycine
- Comparer *in vivo* les traitements chroniques par LASO-22 vs ASO-22 (3-6-12 mg/kg) au cours du développement de la fibrose, sur le modèle de fibrose induite par la bléomycine chez la souris
- Tester les effets du LASO-22 sur l'expression des protéines caractéristiques de la transition myofibroblastique de cellules épithéliales et fibroblastiques humaines traitées par TGF- β 1 *in vitro*.

Ex vivo sur coupes de poumons d'animaux traités par bléomycine 21 jours, nous avons montré que le traitement par LASO-22 (100 nM) induisait une diminution de l'expression du collagène, avec la même intensité que le traitement par ASO-22 testé à la même dose (Figure 53).

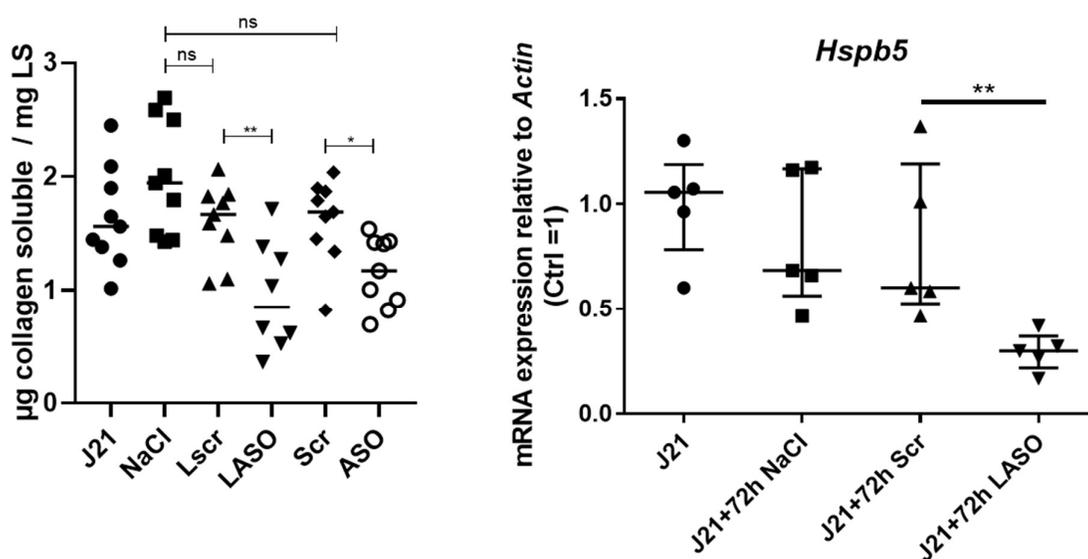


Figure 53 : L'inhibition d'HSPB5 par le LASO 22 limite la production de collagène *ex vivo* sur des PCLS : A) Influence du traitement par ASO22, LASO22 ou leur scramble (scr et Lscr) à 100 nM (pendant 3 jours) sur le contenu en collagène de coupes de poumons de souris précédemment traitées 21 jours par NaCl ou bléomycine. n=9/groupe. Test de Mann et Withney, * P< 0,05 ; **P<0,01 ; ns : non significatif. B) Influence d'un traitement de 3 jours par LASO22 (LASO) ou de son scramble (Scr) à 100 nM sur l'expression génique d'HSPB5 de coupes de poumons de souris précédemment traitées 21 jours par bléomycine. Test de Mann et Withney, **P<0,01.

Ces résultats encourageants nous ont motivé à comparer les effets d'une gamme de concentrations des LASO-22 et ASO-22 (3-6-12 mg/kg) dans le modèle de fibrose à la bléomycine, l'hypothèse étant que le LASO-22 induise des effets anti-fibrosants à des doses moindres que l'ASO-22. Nos résultats ont confirmé que l'ASO-22 est efficace à 12 mg/kg, et nous n'avons pas observé d'effets des doses inférieures sur l'accumulation de collagène dans le tissu pulmonaire, évaluée par la technique de sircol (Figure 54). Chez les souris traitées par le LASO-22 à la dose de 6 mg/kg, nous avons observé une accumulation de collagène légèrement inférieure à celle mesurée dans le groupe de souris traitées par bléomycine seule, et ses effets ne sont plus significatifs aux doses extrêmes testées de 3 et 12 mg/kg. Les quantités de collagène mesurées n'étaient pas différentes entre les traitements LASO-22 (6 mg/kg) et ASO-22 (12 mg/kg) (Figure 54).

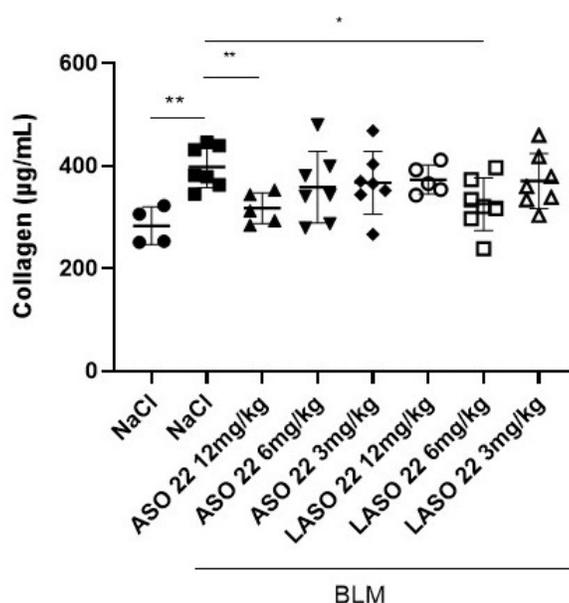


Figure 54 : Effet dose ASO 22/LASO 22 *in vivo* sur un modèle de fibrose pulmonaire murine : Quantification du collagène par la technique du SIRCOL dans les poumons de souris traitées par administration intra-trachéale de NaCl ou bléomycine à J0 (BLM) et par l'ASO-22 ou le LASO-22 (3, 6 ou 12 mg/kg 3 fois par semaine de J9 à J21) (n=4 à 7). Test de Mann et Withney, *P< 0,05 ; **P<0,01.

In vitro, les tests du LASO-22 ont été très décevants puisque nous n'avons pas observé d'effets du LASO-22 (25 à 100 nM) sur l'expression des marqueurs de la transition mésenchymateuse induite par le TGF-β1 (10 ng/mL), ni sur cellules épithéliales humaines (A549) (données non montrées) ni sur cellules fibroblastiques humaines CCL-210 (Figure 55).

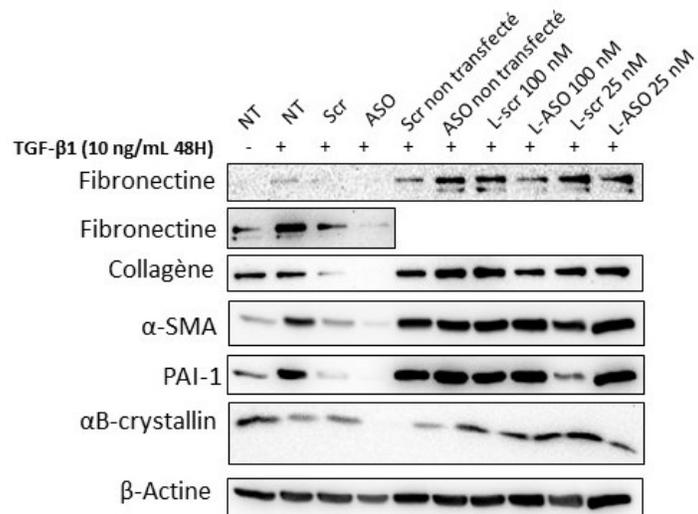


Figure 55 : Effet du LASO 22 comparativement à l'ASO 22 en condition pro-fibrosante *in vitro* : Analyse protéique par western blot de cellules fibroblastiques humaines CCL210 traitées 48h par TGF-β1 (10 ng/mL) (n=3).

DISCUSSION & PERSPECTIVES

La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie dévastatrice à laquelle n'est associée aucun traitement curatif et sa physiopathologie demeure encore mal comprise. Aussi une meilleure compréhension du mécanisme de fibrogenèse permettrait l'élaboration de nouvelles cibles potentielles pour le diagnostic, le traitement et le suivi de patients atteints de FPI. La place de l'inflammation dans cette pathologie reste incertaine. L'étude clinique PANTHER-IPF a largement contribué à cela puisqu'elle a conduit au retrait de l'utilisation de molécules anti-inflammatoires pour la prise en charge des patients. En revanche, il est tout de même admis que les phases inflammatoires, en conséquence d'une destruction du tissu pulmonaire, sont primordiales dans l'initiation de la fibrogenèse.

Mon travail de thèse a contribué à l'identification d'une population de macrophages alvéolaires CD206+ se révélant particulièrement intéressante pour le suivi de la progression de la fibrose, et qui pourrait constituer une cible de nouvelles molécules actives anti-fibrosantes. Mes travaux ont permis ensuite d'apporter une connaissance plus précise sur le rôle d'HSP27 extracellulaire dans un contexte de fibrose pulmonaire. Enfin dans une dernière partie, j'ai caractérisé les effets d'un inhibiteur d' α B-crystallin, un oligonucléotide anti-sens (ASO) lipidique, sur la fibrose pulmonaire induite chez le rongeur.

I. Les macrophages alvéolaires CD206+ : une population qui reflète la progression de la FPI

Les macrophages sont une population de cellules immunitaires très plastiques qui s'adaptent à leur environnement. Leur phénotype, et donc leur fonction, oscille entre un caractère pro-inflammatoire (M1) et anti-inflammatoire (M2). Dans la FPI, il est largement admis que les macrophages possèdent plutôt un phénotype M2 responsable de la production de médiateurs pro-fibrosants tels que le TGF- β 1³³⁵. De plus, les RM-DM ont été identifiés comme une population en faveur de développement de la fibrose pulmonaire à l'inverse de macrophages résidents qui ne semblent avoir aucun impact¹⁹⁴.

Dans cette étude, nous avons montré que les macrophages surexprimant CD206 sont exprimés dans le tissu pulmonaire dès les phases précoces du développement de la maladie dans des modèles de fibrose murins, mais que cette expression reste aussi élevée en phases tardives de son développement. Deux techniques sont combinées dans ce travail à savoir, la cytométrie en flux et la radio-imagerie (SPECT), afin d'identifier la population responsable de l'expression de CD206 dans le poumon en condition native et fibrosante. La caractérisation par cytométrie en flux et l'étude cinétique des macrophages pulmonaires issus du modèle bléomycine nous a

permis de montrer que les macrophages alvéolaires sont la population responsable de l'expression de CD206 aussi bien en condition native qu'en condition fibrosante. Or, l'ontogénie des macrophages responsables de l'expression de CD206 n'est pas la même en condition native ou en cas de fibrose pulmonaire. En effet l'analyse t-SNE (*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) permet de mettre en évidence une nouvelle population de macrophages qui exprime fortement le CD206. Cette population de macrophages recrutés (RM-DM) a précédemment été décrite par les travaux de Misharin *et coll*, discriminant cette population par l'expression plus faible de SiglecF et la double positivité pour le CD11b et le CD11c^{194,204}. De manière intéressante, notre étude permet de mettre en avant la cinétique de recrutement et le phénotype des RM-DM. Nous avons pu observer que l'expression de CD11b et de CD206 sont corrélées dans les périodes précoces du modèle de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine (J8) et que l'expression de CD11b (J15 et J22) diminue ensuite fortement, contrairement à l'expression stable du CD206. La période inflammatoire de ce modèle se caractérise donc par des RM-DM CD11b+ CD206+ et dans la période de résolution/fibrose, les RM-DM ont un phénotype CD11b- CD206+. La bléomycine induit également une mort cellulaire des TR-AMs qui semblent être remplacés progressivement par des RM-DM qui acquièrent un phénotype de plus en plus 'résident' (notamment marqué par la perte de CD11b). Tout ceci constitue des arguments supplémentaires pour affirmer que les TR-AMs sont remplacés par les RM-DM dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. De plus, nous rajoutons à cela que cette population de RM-DM est responsable de l'expression et de la persistance de CD206 dans ce modèle. Les RM-DM sont donc des cellules associées au développement et à la gravité de la fibrose pulmonaire¹⁹⁴ et qui expriment fortement le CD206. C'est pour ces raisons que CD206 apparaît comme un biomarqueur intéressant pour le suivi de la FPI chez les patients. C'est pourquoi nous avons testé l'utilisation de CD206 comme un biomarqueur non invasif de progression de la fibrose pulmonaire. Il a récemment été montré qu'une étude longitudinale par tomographie par émission de positons (TEP ou PET scan) permet de suivre la sévérité de la fibrose pulmonaire avec une grande fiabilité^{336,337}. Dans notre étude, nous avons couplé l'analyse longitudinal CT-scan avec une tomographie par émission de positons (TEP ou PET scan) en utilisant un radionucléide ciblant le collagène de type I et III, couplé à du Gallium-68 (⁶⁸Ga-collagelin). Nos résultats ont permis de montrer que la sonde ⁶⁸Ga-collagelin détecte la fibrose pulmonaire de manière corrélée à une analyse CT-scan comme cela avait déjà été décrit dans la littérature avec une autre sonde qui détecte le collagène (⁶⁸Ga-CBP8)¹⁸⁴. De manière similaire à la sonde ⁶⁸Ga-collagelin, nous avons également montré

que l'imagerie du CD206, par utilisation d'un radionucléide spécifique de ce récepteur, le ^{99m}Tc -tilmanocept, permet la mise en évidence de la fibrose pulmonaire. Une augmentation progressive et persistante du CD206 est observée tout au long de ce modèle, suivant la même trajectoire que l'expression du CD206 par les RM-DM. La cytométrie en flux ainsi que les données d'imagerie suggèrent fortement que le CD206 est surexprimé dans un modèle de fibrose pulmonaire à la bléomycine, assez précocement et principalement dû à l'infiltration des RM-DM dans le poumon. Ces données décrivent le CD206 comme un biomarqueur prometteur pour un suivi non-invasif de la fibrose pulmonaire. L'intérêt de l'utilisation de ce marqueur a été renforcé par l'étude de données humaines recueillies via l'analyse de bases de données, et qui a permis de montrer que l'expression génique de CD206 (gène *MRC1*) est capable de différencier chez les patients atteints de FPI une fibrose progressive d'une fibrose non progressive.

L'absence de marqueurs d'efficacité des traitements de la FPI est un des écueils, responsable des difficultés que connaissent les thérapeutes pour adapter le traitement anti-fibrosant, à temps, et pour un patient donné, en tenant compte de sa réponse propre au traitement. Nous avons testé dans ce contexte l'utilité du suivi de l'expression du CD206 comme marqueur d'efficacité du nintédanib. Nos résultats confirment ceux de Bellamri *et al.*, (2019), qui montrent que le nintédanib inhibe l'expression du phénotype M2 et l'expression de CD206 de macrophages primaires humains (dérivés de PBMC de donneur sains)²³⁹. L'analyse par cytométrie en flux des cellules immunitaires pulmonaires issues du modèle de fibrose murine à la bléomycine a permis de montrer que le nintédanib (NTD) induit une réduction significative de l'expression de CD206 et que cette réduction touche principalement les RM-DM. L'analyse bi-paramétrique qui implique l'expression de CD11b et CD206 nous indique que les cellules CD11b+ CD206+ (qu'elles soient TR-AMs ou RM-DM) sont impactées par le nintédanib. En effet leur proportion est réduite significativement avec ce traitement anti-fibrosant. En revanche, la proportion de RM-DM CD11b- CD206+ n'est pas altérée et on observe une moindre diminution des TR-AMs CD11b- CD206+ en cas de traitement par NTD. Ces effets protecteurs du NTD sur les TR-AMs CD11b- CD206+ est très intéressante puisque le profil des macrophages (phénotypes et ontogénie) tend davantage vers celui d'une souris saine en présence de NTD. De plus, cette inhibition de CD206 spécifique des macrophages CD11b+ suggère que le NTD a une action inhibitrice sur la phase d'infiltration macrophagique dans le poumon. En parallèle, nous avons confirmé cette diminution du CD206 en réponse au traitement par NTD, par l'imagerie moléculaire via l'utilisation de la sonde ^{99m}Tc -tilmanocept. Cette technique a permis d'effectuer un suivi longitudinal de l'expression de CD206. Nous

avons validé ce résultat par sa corrélation à la diminution des dépôts de collagène dans le poumon évalué par analyse des CT-scan.

Pour finir, nous avons montré l'intérêt de l'utilisation du tofacitinib, un inhibiteur des JAK kinase (JAK1 et JAK3) inhibant l'expression du CD206^{242,338}, pour traiter la fibrose pulmonaire induite expérimentalement sur notre modèle à la bléomycine. Nos résultats sont en accord avec une étude récente qui a montré que l'utilisation d'un peptide bloquant spécifiquement le CD206 est efficace pour réduire la fibrose pulmonaire dans le même modèle, en diminuant à la fois l'expression de CD206, de TGF- β 1 et de α -SMA²⁴⁰. Nous avons déterminé que l'utilisation du tofacitinib *in vivo* réduisait l'expression de CD206 spécifiquement sur les RM-DM. En revanche, à l'inverse du nintédanib, cette inhibition se focalise sur la population de RM-DM CD11b- CD206+ ce qui suggère une inhibition plus tardive que celle induite par le nintédanib, dans le processus d'infiltration macrophagique. En parallèle, l'imagerie du CD206 montre une diminution attendue du signal lié au ^{99m}Tc-tilmanocept, du signal MLD (*Mean Lung Density*), ainsi que de l'absorption pulmonaire de la sonde ⁶⁸Ga-collagelin qui est réduite significativement. Cette expérience est d'autant plus intéressante qu'elle suggère qu'un médicament approuvé dans l'utilisation de la sclérodémie et de l'arthrite rhumatoïde²⁴¹ est efficace à réduire la fibrose pulmonaire. Enfin, grâce à cette étude longitudinale de radio-imagerie, nous démontrons que l'imagerie du CD206 par le ^{99m}Tc-tilmanocept est corrélée à la progression de la fibrose pulmonaire.

Limites et perspectives

Dans cette étude, nous avons démontré l'efficacité de l'utilisation d'un radio traceur du CD206 (^{99m}Tc-tilmanocept) pour la prise en charge et le suivi des patients. Ce traceur pourrait aider à ajuster le choix du traitement, en contrôlant le niveau de CD206 chez les patients FPI et apporter un élément de décision pour un switch vers la pirfénidone, en cas de manque d'efficacité du traitement par Nintedanib. Nous pourrions également voir un intérêt inverse qui consisterait à privilégier un traitement par nintédanib chez les patients avec un fort niveau d'expression du CD206 et proposer la pirfénidone à ceux qui ont un taux plus faible de CD206. Ceci nécessite donc l'élaboration d'un seuil. Comme l'importance des dépôts de collagène reflète une fibrose déjà installée, nous aurions pu penser que le suivi du CD206 pourrait être utilisé dans les phases précoces de la maladie. Or, nous montrons que l'apparition du collagène est corrélée à celle de CD206, ce qui va à l'encontre de ce potentiel intérêt du suivi du CD206.

Une autre limite de notre travail est inhérente au modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. La fibrose pulmonaire s'installe en moins de 10 jours et est précédée d'une phase inflammatoire très différente de la réalité clinique de la FPI. Pour s'affranchir de cette phase d'inflammation importante qui perturbe sans doute l'expression de CD206 dans les phases précoces du modèle, nous pourrions envisager de répéter cette étude sur un autre modèle de fibrose pulmonaire, par exemple celui induite par surexpression du TGF- β 1 dans le tissu pulmonaire par transfert du gène TGF- β 1 (AdTGF- β 1).

Sur l'analyse cytométrique, de manière intéressante, nous pouvons voir que la cinétique d'apparition et de disparition des RM-DM et des TR-AMs se suit parfaitement ce qui suggère une proximité entre ces deux populations. En revanche, la cytométrie en flux est une méthode expérimentale qui ne permet pas de valider cette hypothèse. Bien que l'évolution phénotypique de ces deux populations soit proche, nous ne pouvons pas conclure que les RM-DM perdent progressivement l'expression de CD11b pour coloniser les alvéoles pulmonaires et constituer ainsi le nouveau pool de macrophages résidants. Pour cela, il aurait fallu effectuer une étude de suivi cellulaire en marquant spécifiquement les RM-DM, ce qui aurait permis d'étudier leur devenir. En revanche, sur la représentation t-SNE, nous pouvons voir que le profil des TR-AMs, J21 post-injection de bléomycine, est différent de celui d'une souris saine, ce qui suggère tout de même l'apparition d'une population différente de celle du départ.

Le tofacitinib apparaît comme une molécule prometteuse dans le traitement de la FPI. En effet une analyse *post-hoc* de 21 essais cliniques a montré une plus faible incidence de fibrose pulmonaire chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde traités par le tofacitinib en comparaison à ceux traité par un placebo³³⁹. D'autres études ont également montré un effet bénéfique du tofacitinib sur une fibrose pulmonaire progressive existante chez des patients atteint d'arthrite rhumatoïde³⁴⁰. A ma connaissance, notre étude est la première qui suggère l'efficacité du tofacitinib à réduire la fibrose pulmonaire dans un modèle murin induit par injection de bléomycine. Le tofacitinib présente une efficacité anti-fibrosante similaire au nintédanib *in vivo* sur un modèle de fibrose pulmonaire murin ce qui en fait un bon candidat à tester dans un essai clinique incluant des patients atteints de FPI.

Le nintédanib est un inhibiteur des tyrosines kinases, mais son action anti-fibrosante est encore mal comprise. Cette étude permet d'associer son action anti-fibrosante avec l'inhibition du CD206 au niveau des macrophages alvéolaires, suggérant ainsi un mécanisme d'action nouveau. En revanche, notre expérience montre que la diminution de CD206 médiée par le nintédanib impacte spécifiquement les RM-DM CD11b⁺ CD206⁺. Ainsi des études

approfondies pourraient être envisagées afin de savoir si l'inhibition du CD206 par le nintédanib est la conséquence d'une diminution de l'infiltration macrophagique (inhibition indirecte de CD206) ou une inhibition directe de l'expression du CD206 par les macrophages. Enfin, dans le but d'améliorer les thérapies anti-fibrosantes, il pourrait être intéressant de développer une thérapie qui cible spécifiquement les RM-DM CD206+. Les travaux réalisés sur le sujet et nos résultats montrent que ces cellules sont responsables, du moins en partie, de la mise en place et de la gravité de la fibrose. Il serait donc intéressant d'identifier des thérapies inhibant spécifiquement les RM-DM. A nouveau, Misharin *et al.* ont démontré que les thérapies anti-inflammatoires, préalablement testées sur patients, n'affectent pas les macrophages infiltrants pulmonaires¹⁹⁴ suggérant ainsi une thérapie ciblée.

^{99m}Tc-tilmanocept apparaît comme un biomarqueur non invasif prometteur de la fibrose pulmonaire. La question de la sensibilité de ce marqueur peut se poser, puisqu'il ne permet la détection du CD206 que chez les animaux malades (qui l'expriment fortement) et pas chez les animaux contrôles (qui l'expriment faiblement). Néanmoins, sur un poumon humain, on peut s'attendre à une proportion plus importante de TR-AMs exprimant le CD206 et donc à un bruit de fond plus important. Il serait donc intéressant de tester le ^{99m}Tc-tilmanocept chez des patients atteints de FPI vs des patients qui ne présentent pas de fibrose pulmonaire, pour tester ses performances de marqueur diagnostique. Nos données sur des échantillons humains montrent que le CD206 est surexprimé sur des biopsies de patients atteints de FPI et que le ^{99m}Tc-tilmanocept est capable de détecter cette surexpression *ex-vivo*. Cette première étape de validation de ce radio-traceur, accompagnée de ces résultats prometteurs menés sur modèles murins, nous ont permis de prévoir une étude clinique afin d'évaluer la pertinence d'utiliser cette sonde chez des patients souffrant de FPI.

II. HSP27 est un médiateur intercellulaire pro-fibrosant

Le rôle d'HSP27 extracellulaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique est actuellement méconnu. Mon travail de thèse se base sur la mise en évidence d'une augmentation des concentrations d'HSP27 dans le sérum de patients atteints de FPI, ou dans les liquides pleuraux ou broncho-alvéolaires des souris fibreuses étudiées au laboratoire. Il faut rappeler que cette augmentation est associée dans des conditions pro-fibrosantes à une augmentation de l'expression intracellulaire de cette protéine, comme montré par Wettstein *et al.*, (2013)¹²⁹. L'hypothèse mécanistique est que l'externalisation d'HSP27 est la conséquence de sa surexpression dans le milieu intracellulaire, et donc la conséquence de sa sécrétion. Cette

hypothèse a déjà été décrite sur des cellules ovariennes cancéreuses où les auteurs montrent que la surexpression d'HSP27 a pour conséquence sa sécrétion³³⁴.

Pour explorer les effets de cette sécrétion, nous avons testé les conséquences du traitement de cellules pulmonaires par de la protéine recombinante HSP27 (rHSP27) seule ou associée au TGF- β 1, utilisé comme cytokine de référence inductrice de la transition mésoenchymateuse. De manière intéressante, nous avons observé que l'augmentation des concentrations extracellulaires d'HSP27 induisait une potentialisation des effets du TGF- β 1. Nos résultats montrent que ces effets passeraient par une stimulation des voies de signalisation non canoniques du TGF- β 1 (phosphorylation de ERK, p65, Akt et d'I κ B). Notre hypothèse était que HSP27 se comporte comme un médiateur agissant de façon paracrine. Pour vérifier cette idée, nous avons stimulé des cellules pulmonaires avec du milieu de cellules stimulées par rTGF- β 1, et donc a priori enrichi en HSP27, et plus ou moins traitées par des anticorps neutralisant cette protéine. Nos résultats suggèrent bien le rôle d'HSP27 dans la stimulation des protéines de la transformation mésoenchymateuse. HSP27 pourrait donc se comporter comme un médiateur impliqué dans la transmission du signal pro-fibrosant.

Pour approfondir la compréhension des effets d'HSP27 extracellulaire, nous avons vérifié une donnée précédemment décrite, qui est l'activation par protéine des récepteurs TLR. Il est connu qu'HSP27 extracellulaire est capable d'interagir avec des récepteurs membranaires de types TLR et notamment TLR-2, TLR-3 et TLR-4^{300,301}, selon les types cellulaires. De plus, ces récepteurs possèdent une signalisation complexe qui peuvent impliquer la voie des MAPK^{341,342} et NF- κ B³⁴³, qui sont pour rappel des voies non canoniques du TGF- β 1. Nos résultats d'immunofluorescence suggèrent une interaction entre HSP27 recombinante et les récepteurs TLR-2 et TLR-4 de cellules épithéliales pulmonaires A549. Des expériences testant l'influence du blocage de ces récepteurs dans l'activation par HSP27 de la signalisation I κ B confortent le rôle des TLR2. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour vérifier le rôle des TLR4 dans les effets d'HSP27.

Une des difficultés majeures de ce travail a été de tester *in vivo* les conséquences d'une augmentation des concentrations extracellulaires d'HSP27 sur le développement de la fibrose dans nos modèles. En l'absence d'anticorps bloquants utilisables pour inhiber spécifiquement HSP27 dans le milieu extracellulaire, nous avons choisi de tester les effets d'HSP27 recombinante apportée par voie intra-trachéale sur la fibrose induite par administration IV de bléomycine. Malgré le faible nombre de souris, nous avons pu observer une augmentation

significative du dépôt de collagène (coloration rouge sirius) dans le groupe de souris ayant reçu de l'HSP27, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de l'infiltration et de la prolifération cellulaire, évaluée par coloration Hématoxyline & Eosine (H&E). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus *in vitro*, et qui semblent suggérer que l'augmentation d'HSP27 extracellulaire participe à aggraver la fibrose pulmonaire.

Dans la continuité de la première partie de mon travail de thèse, il semblait absolument nécessaire de tester les effets d'HSP27 sur le phénotype des macrophages pulmonaires, d'autant plus qu'il est connu que les macrophages expriment à leur surface les TLR, activables comme nous venons de le voir par HSP27. De plus, des données de la littérature suggèrent des effets d'HSP27 sur le phénotype M1 ou M2 des macrophages, certains montrant la capacité à stimuler le phénotype M2^{302,304}, d'autres une réponse plutôt pro-inflammatoire et le phénotype M1³⁰³. Nos résultats montrent qu'une concentration élevée d'rHSP27 (30µg/ml) induit une augmentation d'IL-10, d'IL-1β et de CXCL-10. La mise en culture de fibroblaste avec le milieu ces cellules immunitaires stimulées par HSP27, tend à montrer que les macrophages dans ces conditions, sécrètent des médiateurs stimulant la transition mésenchymateuse, puisque les fibroblastes traités dans ces conditions surexpriment α-SMA. Ces résultats suggèrent qu'HSP27 est bien capable d'induire une activation macrophagique à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-fibrosantes.

Ces données ont été confirmées lorsque nous avons testés les effets d'rHSP27 sur macrophages primaires de donneurs sains dérivés de PBMC. Nous avons pu mettre en évidence la stimulation par HSP27 de l'expression d'IL-1β et de TGF-β1 ainsi que de l'expression de PPAR-γ (récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes), un récepteur nucléaire caractéristique d'une polarisation M2³⁴⁴. Ce changement du profil d'expression génique s'accompagne également d'une augmentation significative de l'expression CD206, et ce résultat suggère encore qu'HSP27 favorise un phénotype M2 profibrosant. En revanche, l'augmentation de CD206 est également associée à celle du CD80 mais pas de HLA-DR (CMH-II). De plus, une expérience avec des milieux conditionnés (identique à celle effectuée avec les BM-DM) a été réalisée sur des CCL-210 (lignée cellulaire de fibroblastes pulmonaires humains) mais ces derniers n'ont pas montré d'activation myofibroblastique accrue après cette stimulation. Ces résultats suggèrent à nouveau que le paradigme M1-M2 est bien plus complexe que 5 sous-phénotypes. Ici les macrophages issus de donneurs sains, stimulés avec de l'rHSP27, présente un phénotype M1 (CD80) qui ne s'accompagne pas d'une expression augmentée d'HLA-DR (remettant ainsi en question l'utilité d'exprimer CD80 pour la cellule). De plus, ils

présentent également un phénotype M2 (CD206) avec l'expression génique à la fois de molécules pro-et anti-inflammatoires. Ces phénotypes très hétérogènes suggèrent d'une fonction complexe qui reste à être approfondie à l'avenir.

Ces résultats m'ont permis de poser une hypothèse mécanistique sur la place et les effets d'HSP27 dans les mécanismes pro-fibrosants (Figure 57). Brièvement, des lésions au niveau de l'épithélium pulmonaire conduiraient à la production de médiateurs pro-inflammatoires qui permettraient d'attirer les cellules de l'immunité au niveau de la zone lésée. Ces cellules, notamment activées par HSP27, produiraient des cytokines pro-fibrosantes dont le TGF- β 1, l'IL-1 β et l'IL-10, qui participeraient à activer la transformation myofibroblastique des cellules pulmonaires environnantes (épithéliales et fibroblastes notamment). Mais cette stimulation induirait aussi la sécrétion par les cellules pulmonaires d'HSP27 dans le milieu extracellulaire, qui pourrait contribuer à maintenir une boucle d'auto-régulation positive du processus de fibrogenèse. Ainsi, HSP27 aurait des effets autocrines et paracrines et participerait à la progression de la fibrose dans le tissu pulmonaire.

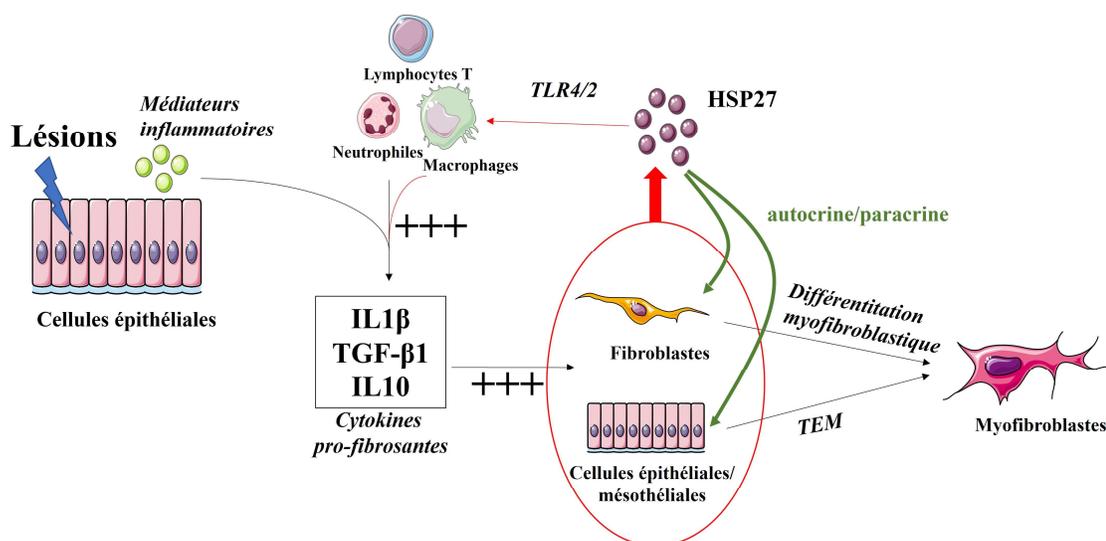


Figure 57 : Hypothèse mécanistique de l'action d'HSP27 extracellulaire lors de la fibrogenèse : L'infiltration des cellules immunitaires est à l'origine de la production des cytokines pro-fibrosantes. Dans un processus classique de cicatrisation, les fibroblastes et les cellules épithéliales pulmonaires constituent une source importante de myofibroblastes en réponse aux stimuli pro-fibrosants. HSP27 pourrait être à l'origine de la cicatrisation massive, qui induit la fibrose pulmonaire, en interagissant avec les macrophages et ainsi entretenir la production de cytokines pro et anti inflammatoires. Elle pourrait également avoir une action autocrine/paracrine qui potentialiserait la différenciation myofibroblastique.

Limites et perspectives

Un des écueils de mon travail est l'absence de résultats robustes montrant les effets de l'augmentation des concentrations d'HSP27 extracellulaire sur l'évolution de la fibrose induite dans notre modèle *in vivo* chez la souris. Tout au long de ma thèse, nous avons cherché à optimiser une méthodologie capable de mimer au mieux la sécrétion d'HSP27 dans l'arbre respiratoire alvéolaire, ou au contraire de tester son inhibition spécifiquement dans cet espace. Notre stratégie expérimentale a consisté à administrer par voie intratrachéale de l'HSP27 recombinante chez nos souris traitées par bléomycine où nous avons testé différentes fréquences et nombres d'injections. La première expérience consistant en 2 administrations d'HSP27 par voie intra-trachéale s'est avéré être la plus encourageante. En dépit du faible nombre d'injections de rHSP27 (J10 et J18), nous avons pu observer une fibrose plus importante chez les animaux traités avec la protéine. En revanche, ce protocole présentait plusieurs défauts méthodologiques (un faible nombre d'animaux traités par HSP27, pas de quantification du collagène dans le tissu pulmonaire total et un manque d'analyses protéiques et géniques sur le tissu pulmonaire). De plus dans ce modèle, nous n'avons pas pu vérifier le devenir de notre protéine recombinante. Enfin, nous avons dû nous limiter dans le nombre d'injections intratrachéales. En effet ce geste nécessite une anesthésie sous isoflurane, et chez la souris malade, la répétition des anesthésies peut être fatale. Nous avons mené deux autres protocoles. Le test *in vivo* des effets d'HSP27 dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine a été répété, avec une administration séquentielle différente des doses d'HSP27 : soit précocément (administration IT à J3, J5 et J7) soit tardivement (administration IT à J11, J13 et J15). Malheureusement, ces expériences n'ont pas montré de différences de gravité de la fibrose en cas d'administration d'HSP27.

Pour montrer l'importance de la sécrétion d'HSP27 dans le développement de la fibrose, nous avons également voulu quantifier HSP27 dans les liquides broncho-alvéolaires par technique ELISA. Malheureusement, il a été impossible de trouver un kit adapté au dosage dans un milieu différent du sérum ou du plasma. Nos résultats n'ont pas montré de différence de concentration d'HSP27 entre les différents temps de notre cinétique, mais nous ne savons pas si ce résultat négatif est associé ou non à l'utilisation d'un test inadapté. Il serait sûrement intéressant de poursuivre l'optimisation de l'administration d'HSP27 par exemple, par la création d'un modèle de surexpression d'HSP27 via l'utilisation d'un lentivirus.

Puisque HSP27 potentialise les effets du TGF- β 1 *in cellulo*, nous pourrions aussi tester l'administration intra-trachéale d'HSP27 dans le modèle de fibrose induite par transfert de gène TGF- β 1 via un adénovirus (AdTGF- β 1).

Un travail important a été réalisé dans ce projet, visant à caractériser les voies de sécrétion d'HSP27. *In cellulo*, nous avons évalué l'influence d'inhibiteurs chimiques des voies principales de sécrétion (voie RE-Golgi et voie des rafts lipidiques) sur la quantité d'HSP27 libérée dans le milieu de culture de différentes cellules A549 et Met5A. Malheureusement, nos résultats n'étaient pas reproductibles et la mise en évidence par western-blot d'HSP27 dans le milieu de culture concentré difficile. Un des axes de recherche de l'équipe est d'explorer le rôle des vésicules extracellulaires dans le développement de la maladie. Nous avons donc initié un travail visant à comprendre dans nos modèles animaux, si HSP27 était présente dans ces vésicules extracellulaires de façon plus importante en cas de fibrose. Encore une fois, malgré des résultats isolés encourageants, nous n'ont pas réussi à mettre en évidence l'expression d'HSP27 dans ces petites vésicules, principalement du fait de difficultés méthodologiques d'étude des protéines présentes dans ces vésicules.

Concernant la démonstration des effets potentialisateurs d'HSP27 sur les effets pro-fibrosants du TGF- β 1, nous sommes conscients qu'il manque deux marqueurs majeurs de la transformation myofibroblastique, α -SMA et le collagène. Nous n'avons malheureusement pas observé de façon reproductible de modification de leur expression en cas de stimulation TGF- β 1+HSP27. Ce point reste en cours d'exploration.

Nous avons également montré que la déplétion en HSP27 dans le milieu extracellulaire contribue à limiter les effets pro-fibrosants induit par le TGF- β 1. Ceci fait ressortir le fait qu'HSP27 est un médiateur intercellulaire indispensable pour la transmission du signal pro-fibrosant. Par ailleurs, la confirmation mécanistique du rôle potentialisateur d'HSP27 reste à être déterminée. Notre hypothèse majeure est qu'HSP27 induit des voies de signalisation non-canoniques du TGF- β 1 qui participeraient à augmenter le signal pro-fibrosant. Jusqu'à présent, nous avons essayé de bloquer les récepteurs qui semblent impliquer dans cette signalisation, mais il serait intéressant d'inhiber indépendamment chacune des voies de signalisation induite par HSP27 afin de déterminer la voie majeure qu'elle active. Une autre hypothèse fait suite à la capacité d'internalisation rapide de cette protéine dans les cellules. En effet, en moins d'une heure, la quasi-totalité de l'rHSP27 apportée dans le milieu de culture n'est plus présente (donnée non montrée). Ceci suggère donc une métabolisation rapide de cette protéine, hypothèse qui

assoie le fait qu'HSP27 interagisse avec un récepteur et soit ensuite internalisée puis dégradée dans la cellule. En revanche cette internalisation rapide suggère également qu'HSP27 peut exercer son rôle chaperon dans la cellule cible, et ainsi potentialiser la voie de la TEM induite par TGF- β 1 en protégeant Snail de sa dégradation¹²⁹.

Enfin, des effets d'HSP27 sur le phénotype des macrophages nous a particulièrement intéressé. Nos résultats montrant les effets stimulant d'HSP27 sur la sécrétion macrophagique doivent être complétés. Nous avons principalement étudié les effets d'HSP27 sur l'expression génique de protéines macrophagiques. Nous devons maintenant vérifier ces données en y associant le dosage des médiateurs dans le milieu de culture des cellules stimulées. Nous voulons aussi approfondir l'étude des effets des cytokines libérées par les macrophages sur les cellules pulmonaires fibroblastiques et épithéliales. Pour ce faire, nous voulons réutiliser notre protocole de stimulation des cellules épithéliales et fibroblastiques par le milieu de culture de cellules macrophagiques précédemment stimulées (milieu conditionné). Afin de poursuivre l'expérience des milieux conditionnés avec les BM-DM et les FPM, il serait intéressant de mettre ces milieux de culture en présence ou absence d'inhibiteurs ALK5 afin de cibler spécifiquement une cytokine responsable de la transition myofibroblastique et donc dans ce cas, le TGF- β 1. L'analyse phénotypique des BM-DM suite à une stimulation HSP27 doit être effectué. Afin de compléter ces études sur les macrophages, nous avons initié la mise au point de culture de macrophages alvéolaires de souris sur laquelle nous voulons réitérer l'étude des effets d'HSP27. Par cette technique, nous voulons évaluer la différence de réponse à l'HSP27 entre les macrophages résidents pulmonaires et les macrophages infiltrants le poumon (modélisé par les BM-DM). Enfin, nous voulons tester les effets de l'administration intratrachéale d'HSP27 dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine, sur le profil phénotypique des cellules macrophagiques, mis au point au cours de ce travail, par cytométrie en flux.

III. LASO 22 : une version améliorée de l'ASO 22 ?

Mon travail sur le LASO-22 a fait suite à de précédents travaux de notre équipe, montrant l'efficacité de l'ASO-22 à réduire la progression de la fibrose pulmonaire dans des modèles murins ainsi que ses effets inhibiteurs sur la transition myofibroblastique. Une des contraintes majeures de l'utilisation de l'oligonucléotide non lipidique, était la nécessité de recourir à l'utilisation d'un vecteur viral de transfection cellulaire. Une des stratégies actuelles

d'amélioration de ces composés est leur modification, notamment par leur conjugaison à des radicaux lipidiques permettant d'améliorer leur bio-distribution et donc ne plus recourir à ces transfections pour tester leurs effets cellulaires. Contrairement à ce qu'on pouvait attendre, les résultats des tests du LASO *in vitro* ont été très décevants, et *in vivo*, même si le composé montre des effets inhibiteurs sur le développement de la fibrose à une concentration moindre que l'ASO-22, ces effets sont peu importants, et donc peu convaincants. Les soucis techniques que nous avons rencontrés pour mettre en solution le composé peuvent avoir altérés le principe actif. Nous avons dû notamment avoir recours au chauffage à 40°C. De plus, nous n'avions que peu d'informations sur les conditions de conservation. Une meilleure connaissance de ces conditions de préparation, de conservation, de la stabilité du composé en solution permettra sûrement d'améliorer les tests dans le futur.

En conclusion, mon travail ne montre pas d'intérêt à utiliser un dérivé lipidique de l'ASO-22 pour améliorer son efficacité.

IV. Synthèse générale

Mes travaux de thèse portaient sur 3 axes de recherche dans le domaine de la physiopathologie de la fibrose pulmonaire. En logique et dans la continuité des travaux de l'équipe de Philippe Bonniaud, je me suis consacré à poursuivre le travail exploratoire sur le rôle des petites protéines de choc thermique dans le développement de la fibrose pulmonaire, à la fois HSP27 et α B-crystallin. Concernant HSP27, mon intérêt s'est porté sur la forme extracellulaire de la protéine, ce qui constitue une nouveauté au sein de l'équipe. Bien que ce travail ne soit pas complètement abouti, mes travaux ont permis d'accumuler un grand nombre de résultats permettant d'entrevoir le rôle de cette forme d'HSP27 dans les mécanismes d'entretien du processus de fibrogenèse pulmonaire. La sécrétion d'HSP27 semble associée à un mauvais pronostic et pourrait constituer une cible thérapeutique ou un biomarqueur intéressant. Concernant α B-crystallin, mon travail s'est intégré dans un projet global d'équipe, visant à identifier des principes actifs efficaces dans l'inhibition des effets pro-fibrosants des petites protéines de choc thermique. Mes travaux ont permis de caractériser les effets du LASO-22 *in vitro*, et *in vitro* sur les mécanismes de la fibrogenèse. Mes résultats ne montrent pas pour l'instant, l'intérêt de continuer dans le contexte de notre thématique scientifique, son développement. Enfin, et du fait des effets observés d'HSP27 sur les macrophages pulmonaires, j'ai décidé de m'intéresser à la place des macrophages dans le développement de la fibrose

pulmonaire. Cette partie de mon travail a été très riche, tant au niveau scientifique qu'au niveau technique. J'ai pu caractériser la cinétique de recrutement des macrophages dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, et confirmer des hypothèses retrouvées dans la littérature sur l'ontogénie et la fonction des macrophages dans ce même modèle. Nous avons pu mettre en évidence l'intérêt d'un nouveau biomarqueur macrophagique, le CD206 et j'ai voulu caractériser son intérêt dans le diagnostic et le traitement de la fibrose pulmonaire. Ainsi, mes travaux ont montré l'intérêt d'une sonde radioactive dirigée contre le CD206, le ^{99m}Tilmanocept, dans le suivi de la fibrose pulmonaire chez le petit animal. Mes résultats permettent d'envisager l'écriture d'un protocole de recherche clinique pour le test de ce composé chez l'homme. Ils ont également montré l'efficacité de ce composé, qui s'est avérée comparable à celle du nintédanib à inhiber le développement de la fibrose induite par la bléomycine chez la souris.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wijsenbeek, M. & Cottin, V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N Engl J Med* **383**, 958–968 (2020).
2. Shaw, M., Collins, B. F., Ho, L. A. & Raghu, G. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur Respir Rev* **24**, 1–16 (2015).
3. Gulati, M. & Redlich, C. A. Asbestosis and environmental causes of usual interstitial pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* **21**, 193–200 (2015).
4. Tanni, S. E. *et al.* Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Review of Respiratory Medicine* **15**, 791–803 (2021).
5. Cottin, V. *et al.* Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns. *Eur Respir Rev* **28**, 180100 (2019).
6. Lederer, D. J. & Martinez, F. J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* **378**, 1811–1823 (2018).
7. Martinez, F. J. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17074 (2017).
8. Maher, T. M. *et al.* Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* **22**, 197 (2021).
9. Raghu, G., Chen, S.-Y., Hou, Q., Yeh, W.-S. & Collard, H. R. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18–64 years old. *Eur Respir J* **48**, 179–186 (2016).
10. Raghu, G. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11. *Lancet Respir Med* **2**, 566–572 (2014).
11. Zaman, T. & Lee, J. S. Risk Factors for the Development of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: a Review. *Curr Pulmonol Rep* **7**, 118–125 (2018).
12. Michalski, J. E. & Schwartz, D. A. Genetic Risk Factors for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Insights into Immunopathogenesis. *J Inflamm Res* **13**, 1305–1318 (2021).
13. Redente, E. F. *et al.* Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **301**, L510–L518 (2011).
14. Ekström, M. *et al.* Effects of smoking, gender and occupational exposure on the risk of severe pulmonary fibrosis: a population-based case-control study. *BMJ Open* **4**, e004018 (2014).
15. Ntoliou, P. *et al.* The Role of Microbiome and Virome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Biomedicines* **9**, 442 (2021).
16. Dutta, P. *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled pilot trial of omeprazole in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **74**, 346–353 (2019).
17. Pereira, N. *et al.* Predictive factors of obstructive sleep apnoea in patients with fibrotic lung diseases. *Sleep Medicine* **56**, 123–127 (2019).
18. Bai, L. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis and diabetes mellitus: a meta-analysis and systematic review. *Respir Res* **22**, 175 (2021).
19. Bellou, V., Belbasis, L. & Evangelou, E. Tobacco Smoking and Risk for Pulmonary Fibrosis: A Prospective Cohort Study from the UK Biobank. *Chest* S0012-3692(21)00760–1 (2021) doi:10.1016/j.chest.2021.04.035.

20. Harari, S. *et al.* Fibrotic interstitial lung diseases and air pollution: a systematic literature review. *Eur Respir Rev* **29**, 200093 (2020).
21. Trethewey, S. P. & Walters, G. I. The Role of Occupational and Environmental Exposures in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Narrative Literature Review. *Medicina (Kaunas)* **54**, 108 (2018).
22. King, T. E., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* **378**, 1949–1961 (2011).
23. Kolb, M. *et al.* Acute exacerbations of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev* **27**, 180071 (2018).
24. Ryerson, C. J., Cottin, V., Brown, K. K. & Collard, H. R. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: shifting the paradigm. *Eur Respir J* **46**, 512–520 (2015).
25. Collard, H. R. *et al.* Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. *Am J Respir Crit Care Med* **194**, 265–275 (2016).
26. Raghu, G. *et al.* Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* **198**, e44–e68 (2018).
27. Martin, M. D., Chung, J. H. & Kanne, J. P. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Thorac Imaging* **31**, 127–139 (2016).
28. Adams, T. N. *et al.* Utility of Bronchoalveolar Lavage and Transbronchial Biopsy in Patients with Interstitial Lung Disease. *Lung* **198**, 803–810 (2020).
29. Cottin, V. *et al.* [French practical guidelines for the diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis. 2017 update. Full-length update]. *Rev Mal Respir* S0761-8425(17)30209-7 (2017) doi:10.1016/j.rmr.2017.07.018.
30. Abe, M. *et al.* Risk factors for acute exacerbation following bronchoalveolar lavage in patients with suspected idiopathic pulmonary fibrosis: A retrospective cohort study. *Advances in Respiratory Medicine* **89**, 101–109 (2021).
31. Inoue, Y. *et al.* Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Chronic Fibrosing Interstitial Lung Diseases With a Progressive Phenotype. *Chest* **158**, 646–659 (2020).
32. Raghu, G. & Richeldi, L. Current approaches to the management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* **129**, 24–30 (2017).
33. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network *et al.* Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **366**, 1968–1977 (2012).
34. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network *et al.* Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2093–2101 (2014).
35. Raghu, G. *et al.* An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, e3–e19 (2015).
36. Potts, J. & Yogarathnam, D. Pirfenidone: a novel agent for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Pharmacother* **47**, 361–367 (2013).

37. Ying, H. *et al.* Pirfenidone modulates macrophage polarization and ameliorates radiation-induced lung fibrosis by inhibiting the TGF- β 1/Smad3 pathway. *J Cell Mol Med* (2021) doi:10.1111/jcmm.16821.
38. Jin, J. *et al.* Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- β 1. *Respir Res* **20**, 119 (2019).
39. Conte, E. *et al.* Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur J Pharm Sci* **58**, 13–19 (2014).
40. Huang, X. *et al.* Molecular characterization of a precision-cut rat lung slice model for the evaluation of antifibrotic drugs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **316**, L348–L357 (2019).
41. Kakugawa, T. *et al.* Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* **24**, 57–65 (2004).
42. Inomata, M. *et al.* Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Respir Res* **15**, 16 (2014).
43. Noble, P. W. *et al.* Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *The Lancet* **377**, 1760–1769 (2011).
44. King, T. E. *et al.* A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2083–2092 (2014).
45. McCormack, P. L. Nintedanib: first global approval. *Drugs* **75**, 129–139 (2015).
46. Reck, M. *et al.* Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* **15**, 143–155 (2014).
47. Hilberg, F. *et al.* BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy. *Cancer Res* **68**, 4774–4782 (2008).
48. Richeldi, L. *et al.* Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **365**, 1079–1087 (2011).
49. Richeldi, L. *et al.* Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2071–2082 (2014).
50. Crestani, B. *et al.* Long-term safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results from the open-label extension study, INPULSIS-ON. *Lancet Respir Med* **7**, 60–68 (2019).
51. Chambers, D. C. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation Report-2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* **38**, 1042–1055 (2019).
52. Kapnadak, S. G. & Raghu, G. Lung transplantation for interstitial lung disease. *European Respiratory Review* **30**, (2021).
53. Satish, L. & Kathju, S. Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing. *Dermatology Research and Practice* **2010**, 1–11 (2010).

54. Bartram, U. & Speer, C. P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest* **125**, 754–765 (2004).
55. Noskovičová, N., Petřek, M., Eickelberg, O. & Heinzemann, K. Platelet-Derived Growth Factor Signaling in the Lung. From Lung Development and Disease to Clinical Studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* **52**, 263–284 (2015).
56. Mahalanobish, S., Saha, S., Dutta, S. & Sil, P. C. Matrix metalloproteinase: An upcoming therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis. *Pharmacol Res* **152**, 104591 (2020).
57. Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 524–529 (2007).
58. Alameddine, H. S. & Morgan, J. E. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. *J Neuromuscul Dis* **3**, 455–473 (2016).
59. Wynn, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**, 199–210 (2008).
60. Vannella, K. M. & Wynn, T. A. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 593–617 (2017).
61. Bonniaud, P. *et al.* TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* **175**, 5390–5395 (2005).
62. Gaudie, J., Bonniaud, P., Sime, P., Ask, K. & Kolb, M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* **35**, 661–664 (2007).
63. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
64. Morikawa, M., Derynck, R. & Miyazono, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a021873 (2016).
65. Moses, H. L., Roberts, A. B. & Derynck, R. The Discovery and Early Days of TGF- β : A Historical Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a021865 (2016).
66. Clark, D. A. & Coker, R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 293–298 (1998).
67. Derynck, R. *et al.* Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**, 701–705 (1985).
68. Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C. & Sporn, M. B. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* **263**, 7646–7654 (1988).
69. Munger, J. S. *et al.* Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* **51**, 1376–1382 (1997).
70. Jenkins, G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1068–1078 (2008).
71. Murphy-Ullrich, J. E. & Suto, M. J. Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: A therapeutic target for fibrotic disease. *Matrix Biol* **68–69**, 28–43 (2018).

72. Ghahary, A., Tredget, E. E., Mi, L. & Yang, L. Cellular response to latent TGF-beta1 is facilitated by insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptors on MS-9 cells. *Exp Cell Res* **251**, 111–120 (1999).
73. Nishimura, S. L. Integrin-Mediated Transforming Growth Factor- β Activation, a Potential Therapeutic Target in Fibrogenic Disorders. *Am J Pathol* **175**, 1362–1370 (2009).
74. Frangogiannis, N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med* **217**, e20190103 (2020).
75. McCarty, J. H. $\alpha\text{v}\beta 8$ integrin adhesion and signaling pathways in development, physiology and disease. *J Cell Sci* **133**, jcs239434 (2020).
76. Koivisto, L., Bi, J., Häkkinen, L. & Larjava, H. Integrin $\alpha\text{v}\beta 6$: Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **99**, 186–196 (2018).
77. Mu, D. *et al.* The integrin $\alpha\text{v}\beta 8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol* **157**, 493–507 (2002).
78. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
79. Terashima, H. *et al.* Attenuation of pulmonary fibrosis in type I collagen-targeted reporter mice with ALK-5 inhibitors. *Pulm Pharmacol Ther* **54**, 31–38 (2019).
80. Smoktunowicz, N. *et al.* The anti-fibrotic effect of inhibition of TGF β -ALK5 signalling in experimental pulmonary fibrosis in mice is attenuated in the presence of concurrent γ -herpesvirus infection. *Dis Model Mech* **8**, 1129–1139 (2015).
81. Muñoz-Félix, J. M., González-Núñez, M. & López-Novoa, J. M. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev* **24**, 523–537 (2013).
82. Wang, Y., Sima, X., Ying, Y. & Huang, Y. Exogenous BMP9 promotes lung fibroblast HFL-1 cell activation via ALK1/Smad1/5 signaling in vitro. *Exp Ther Med* **22**, 728 (2021).
83. Vander Ark, A., Cao, J. & Li, X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell Signal* **52**, 112–120 (2018).
84. Aashaq, S. *et al.* TGF- β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *J Cell Physiol* (2021) doi:10.1002/jcp.30529.
85. Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. & Gelbart, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1347–1358 (1995).
86. Finnsen, K. W., Almadani, Y. & Philip, A. Non-canonical (non-SMAD2/3) TGF- β signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Semin Cell Dev Biol* **101**, 115–122 (2020).
87. de Caestecker, M. P. *et al.* The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem* **275**, 2115–2122 (2000).
88. Wrana, J. L. & Attisano, L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 5–13 (2000).
89. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
90. Hata, A. & Chen, Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a022061 (2016).

91. Massagué, J. & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* **19**, 1745–1754 (2000).
92. Hill, C. S. Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a022079 (2016).
93. Hayes, S., Chawla, A. & Corvera, S. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol* **158**, 1239–1249 (2002).
94. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. & Wrana, J. L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* **5**, 410–421 (2003).
95. Yan, X. & Chen, Y.-G. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *Biochem J* **434**, 1–10 (2011).
96. Dupont, S. *et al.* FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**, 123–135 (2009).
97. Bellaye, P.-S. *et al.* The small heat-shock protein α B-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. *J Pathol* **232**, 458–472 (2014).
98. Boutanquoi, P.-M. *et al.* TRIM33 prevents pulmonary fibrosis by impairing TGF- β 1 signalling. *Eur Respir J* **55**, 1901346 (2020).
99. Morrison, D. K. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a011254 (2012).
100. Tzavlaki, K. & Moustakas, A. TGF- β Signaling. *Biomolecules* **10**, E487 (2020).
101. Pannu, J., Nakerakanti, S., Smith, E., ten Dijke, P. & Trojanowska, M. Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways. *J Biol Chem* **282**, 10405–10413 (2007).
102. Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**, 804–816 (1999).
103. Yu, L., Hébert, M. C. & Zhang, Y. E. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* **21**, 3749–3759 (2002).
104. Hou, T.-Y., Wu, S.-B., Kau, H.-C. & Tsai, C.-C. JNK and p38 Inhibitors Prevent Transforming Growth Factor- β 1-Induced Myofibroblast Transdifferentiation in Human Graves' Orbital Fibroblasts. *Int J Mol Sci* **22**, 2952 (2021).
105. Xylourgidis, N. *et al.* Role of dual-specificity protein phosphatase DUSP10/MKP-5 in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **317**, L678–L689 (2019).
106. Alcorn, J. F. *et al.* c-Jun N-terminal kinase 1 is required for the development of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**, 422–432 (2009).
107. Xi, Y. *et al.* Inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by methacycline. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**, 51–60 (2014).
108. Xia, L. *et al.* Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* **11**, 2063–2073 (2018).
109. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* **2**, 1–9 (2017).

110. Wright, J. G. & Christman, J. W. The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am J Respir Med* **2**, 211–219 (2003).
111. Hamidi, A. *et al.* Polyubiquitination of transforming growth factor β (TGF β)-associated kinase 1 mediates nuclear factor- κ B activation in response to different inflammatory stimuli. *J Biol Chem* **287**, 123–133 (2012).
112. Sun, X., Chen, E., Dong, R., Chen, W. & Hu, Y. Nuclear factor (NF)- κ B p65 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF- β . *Life Sci* **122**, 8–14 (2015).
113. Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W. & Leal, J. F. M. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 187–198 (2008).
114. Zhang, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a022129 (2017).
115. Yi, J. Y., Shin, I. & Arteaga, C. L. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **280**, 10870–10876 (2005).
116. Zhang, X.-L., Xing, R.-G., Chen, L., Liu, C.-R. & Miao, Z.-G. PI3K/Akt signaling is involved in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep* **14**, 5699–5706 (2016).
117. Harrison, D. A. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, a011205–a011205 (2012).
118. Spinelli, F. R., Meylan, F., O’Shea, J. J. & Gadina, M. JAK inhibitors: Ten years after. *Eur J Immunol* **51**, 1615–1627 (2021).
119. Villarino, A. V., Kanno, Y. & O’Shea, J. J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol* **18**, 374–384 (2017).
120. Montero, P., Milara, J., Roger, I. & Cortijo, J. Role of JAK/STAT in Interstitial Lung Diseases; Molecular and Cellular Mechanisms. *Int J Mol Sci* **22**, 6211 (2021).
121. Pedroza, M. *et al.* STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation. *FASEB J* **30**, 129–140 (2016).
122. Akhmetshina, A. *et al.* Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **58**, 2553–2564 (2008).
123. Hinz, B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med* **64**, 171–177 (2016).
124. Hinz, B. & Lagares, D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **16**, 11–31 (2020).
125. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* **200**, 500–503 (2003).
126. Hung, C. Origin of Myofibroblasts in Lung Fibrosis. *Curr. Tissue Microenviron. Rep.* **1**, 155–162 (2020).
127. Decolonne, N. *et al.* TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* **179**, 6043–6051 (2007).

128. Decologne, N. *et al.* Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* **35**, 176–185 (2010).
129. Wettstein, G. *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *The FASEB Journal* **27**, 1549–1560 (2013).
130. Thuan, D. T. B. *et al.* A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. *Front Immunol* **9**, 1985 (2018).
131. Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C. & ten Dijke, P. TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci* **18**, 2157 (2017).
132. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 349–363 (2002).
133. Vallée, A. & Lecarpentier, Y. TGF- β in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts. *Cell & Bioscience* **9**, 98 (2019).
134. Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M. & Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* **1**, 71–81 (1994).
135. Herzog, E. L. & Bucala, R. Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol* **38**, 548–556 (2010).
136. Andersson-Sjöland, A. *et al.* Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2129–2140 (2008).
137. Chong, S. G., Sato, S., Kolb, M. & Gauldie, J. Fibrocytes and fibroblasts-Where are we now. *Int J Biochem Cell Biol* **116**, 105595 (2019).
138. Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R. & Metz, C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* **166**, 7556–7562 (2001).
139. Phillips, R. J. *et al.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **114**, 438–446 (2004).
140. Mehrad, B. *et al.* Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun* **353**, 104–108 (2007).
141. Kato, K. *et al.* Pulmonary pericytes regulate lung morphogenesis. *Nat Commun* **9**, 2448 (2018).
142. Epling, G. P. Electron microscopic observations of pericytes of small blood vessels in the lungs and hearts of normal cattle and swine. *The Anatomical Record* **155**, 513–529 (1966).
143. Shammout, B. & Johnson, J. R. Pericytes in Chronic Lung Disease. *Adv Exp Med Biol* **1147**, 299–317 (2019).
144. Sava, P. *et al.* Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight* **2**, 96352 (2017).
145. Hung, C. F., Wilson, C. L. & Schnapp, L. M. Pericytes in the Lung. *Adv Exp Med Biol* **1122**, 41–58 (2019).
146. Barron, L., Gharib, S. A. & Duffield, J. S. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts: Busy Multitaskers. *Am J Pathol* **186**, 2519–2531 (2016).

147. Yamaguchi, M. *et al.* Pericyte-myofibroblast transition in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun* **528**, 269–275 (2020).
148. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028–1040 (2012).
149. Selman, M. & Pardo, A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 364–372 (2006).
150. Jolly, M. K. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Dev Dyn* **247**, 346–358 (2018).
151. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–1428 (2009).
152. Bartis, D., Mise, N., Mahida, R. Y., Eickelberg, O. & Thickett, D. R. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax* **69**, 760–765 (2014).
153. Alidadiani, N., Ghaderi, S., Dilaver, N., Bakhshamin, S. & Bayat, M. Epithelial mesenchymal transition Transcription Factor (TF): The structure, function and microRNA feedback loop. *Gene* **674**, 115–120 (2018).
154. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* **119**, 1429–1437 (2009).
155. Kalluri, R. & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1776–1784 (2003).
156. Tanjore, H. *et al.* Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 657–665 (2009).
157. Rock, J. R. *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1475–E1483 (2011).
158. Yao, L. *et al.* Paracrine signalling during ZEB1-mediated epithelial-mesenchymal transition augments local myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *Cell Death Differ* **26**, 943–957 (2019).
159. Degryse, A. L. *et al.* Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**, L442–L452 (2010).
160. Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* **119**, 1417–1419 (2009).
161. Salton, F., Volpe, M. C. & Confalonieri, M. Epithelial-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)* **55**, E83 (2019).
162. Yalcin, N. G., Choong, C. K. C. & Eizenberg, N. Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thorac Surg Clin* **23**, 1–10, v (2013).
163. Simsir, A., Fetsch, P., Mehta, D., Zakowski, M. & Abati, A. E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: the good, the bad, the worthless. *Diagn Cytopathol* **20**, 125–130 (1999).
164. Karki, S. *et al.* Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J* **28**, 1122–1131 (2014).
165. Mubarak, K. K. *et al.* Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **39**, 133–140 (2012).

166. Souza, C. A., Müller, N. L., Flint, J., Wright, J. L. & Churg, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: spectrum of high-resolution CT findings. *AJR Am J Roentgenol* **185**, 1531–1539 (2005).
167. Jagirdar, J. *et al.* Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 5**, 1197–1203 (1997).
168. Harvey, W. & Amlot, P. L. Collagen production by human mesothelial cells in vitro. *J Pathol* **139**, 337–347 (1983).
169. Light, R. W. *et al.* A single intrapleural injection of transforming growth factor-beta(2) produces an excellent pleurodesis in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 98–104 (2000).
170. Jimenez, S. A. & Piera-Velazquez, S. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of Systemic Sclerosis-associated pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension. Myth or reality? *Matrix Biol* **51**, 26–36 (2016).
171. Piera-Velazquez, S., Mendoza, F. A. & Jimenez, S. A. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J Clin Med* **5**, E45 (2016).
172. El Agha, E. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell* **21**, 166–177 (2017).
173. Liu, G. *et al.* Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis. *Pharmacol Ther* **225**, 107839 (2021).
174. Hynes, R. O. & Naba, A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a004903 (2012).
175. Gill, S., Wight, T. N. & Frevert, C. W. Proteoglycans: key regulators of pulmonary inflammation and the innate immune response to lung infection. *Anat Rec (Hoboken)* **293**, 968–981 (2010).
176. Beachley, V. Z. *et al.* Tissue matrix arrays for high-throughput screening and systems analysis of cell function. *Nat Methods* **12**, 1197–1204 (2015).
177. Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1531–1546 (2003).
178. Bella, J., Liu, J., Kramer, R., Brodsky, B. & Berman, H. M. Conformational effects of Gly-X-Gly interruptions in the collagen triple helix. *J Mol Biol* **362**, 298–311 (2006).
179. Karsdal, M. A. *et al.* The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews* **121**, 43–56 (2017).
180. Takiya, C., Peyrol, S., Cordier, J. F. & Grimaud, J. A. Connective matrix organization in human pulmonary fibrosis. Collagen polymorphism analysis in fibrotic deposits by immunohistological methods. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **44**, 223–240 (1983).
181. Leeming, D. J. *et al.* Serological investigation of the collagen degradation profile of patients with chronic obstructive pulmonary disease or idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomark Insights* **7**, 119–126 (2012).
182. Jenkins, R. G. *et al.* Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre PROFILE study. *Lancet Respir Med* **3**, 462–472 (2015).

183. Herrera, J. *et al.* Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **4**, 125185 (2019).
184. Désogère, P. *et al.* Type I collagen-targeted PET probe for pulmonary fibrosis detection and staging in preclinical models. *Sci Transl Med* **9**, eaaf4696 (2017).
185. Williams, L., Layton, T., Yang, N., Feldmann, M. & Nanchahal, J. Collagen VI as a driver and disease biomarker in human fibrosis. *FEBS J* (2021) doi:10.1111/febs.16039.
186. De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B. & Goriely, S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol* **5**, 423 (2014).
187. Lee, J. *et al.* The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS One* **12**, e0183594 (2017).
188. Wacleche, V. S., Tremblay, C. L., Routy, J.-P. & Ancuta, P. The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses* **10**, E65 (2018).
189. Mentkowski, K. I., Euscher, L. M., Patel, A., Alevriadou, B. R. & Lang, J. K. Monocyte recruitment and fate specification after myocardial infarction. *Am J Physiol Cell Physiol* **319**, C797–C806 (2020).
190. Kapellos, T. S. *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* **10**, 2035 (2019).
191. Zawada, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**, e50-61 (2011).
192. Menezes, S. *et al.* The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS⁺ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 1205–1218 (2016).
193. Skrzeczyńska-Moncznik, J. *et al.* Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* **67**, 152–159 (2008).
194. Misharin, A. V. *et al.* Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* **214**, 2387–2404 (2017).
195. Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V. & Budinger, G. R. S. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest* **129**, 2619–2628.
196. Bain, C. C. & Mowat, A. M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev* **260**, 102–117 (2014).
197. Yu, Y.-R. A. *et al.* Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* **54**, 13–24 (2016).
198. Shi, T., Denney, L., An, H., Ho, L. & Zheng, Y. Alveolar and lung interstitial macrophages: Definitions, functions, and roles in lung fibrosis. *J Leukoc Biol* JLB.3RU0720-418R (2020) doi:10.1002/JLB.3RU0720-418R.
199. Guilliams, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* **210**, 1977–1992 (2013).
200. Suzuki, T. *et al.* Pulmonary macrophage transplantation therapy. *Nature* **514**, 450–454 (2014).
201. Joshi, N., Walter, J. M. & Misharin, A. V. Alveolar Macrophages. *Cellular Immunology* **330**, 86–90 (2018).

202. Mould, K. J. *et al.* Cell Origin Dictates Programming of Resident versus Recruited Macrophages during Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **57**, 294–306 (2017).
203. Machiels, B. *et al.* Author Correction: A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat Immunol* **19**, 1035 (2018).
204. Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S. & Perlman, H. Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 503–510 (2013).
205. Loyher, P.-L. *et al.* Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J Exp Med* **215**, 2536–2553 (2018).
206. Schyns, J., Bureau, F. & Marichal, T. Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *Journal of Immunology Research* **2018**, 1–10 (2018).
207. Tan, S. Y. S. & Krasnow, M. A. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development* dev.129122 (2016) doi:10.1242/dev.129122.
208. Dethloff, L. A. & Lehnert, B. E. Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes. *J Leukoc Biol* **43**, 80–90 (1988).
209. Gibbings, S. L. *et al.* Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am J Respir Cell Mol Biol* **57**, 66–76 (2017).
210. Liegeois, M., Legrand, C., Desmet, C. J., Marichal, T. & Bureau, F. The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol* **330**, 91–96 (2018).
211. Schyns, J. *et al.* Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nat Commun* **10**, 3964 (2019).
212. Spellberg, B. & Edwards, J. E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* **32**, 76–102 (2001).
213. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677–686 (2004).
214. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* **164**, 6166–6173 (2000).
215. Chambers, M. *et al.* Macrophage Plasticity in Reproduction and Environmental Influences on Their Function. *Front Immunol* **11**, 607328 (2020).
216. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**, Unit 14.12 (2007).
217. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* **177**, 7303–7311 (2006).
218. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13 (2014).

219. Trus, E., Basta, S. & Gee, K. Who's in charge here? Macrophage colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor: Competing factors in macrophage polarization. *Cytokine* **127**, 154939 (2020).
220. Ross, E. A., Devitt, A. & Johnson, J. R. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front Immunol* **12**, 708186 (2021).
221. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13**, 453–461 (2008).
222. Sironi, M. *et al.* Differential regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J Leukoc Biol* **80**, 342–349 (2006).
223. Wang, L.-X., Zhang, S.-X., Wu, H.-J., Rong, X.-L. & Guo, J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* **106**, 345–358 (2019).
224. Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* **2015**, 816460 (2015).
225. Laskin, D. L., Malaviya, R. & Laskin, J. D. Role of Macrophages in Acute Lung Injury and Chronic Fibrosis Induced by Pulmonary Toxicants. *Toxicol Sci* **168**, 287–301 (2019).
226. Cheng, P., Li, S. & Chen, H. Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. *Cells* **10**, (2021).
227. Moore, B. B. *et al.* Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol* **167**, 4368–4377 (2001).
228. Joshi, N. *et al.* A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. *Eur Respir J* **55**, 1900646 (2020).
229. Mould, K. J., Jackson, N. D., Henson, P. M., Seibold, M. & Janssen, W. J. Single cell RNA sequencing identifies unique inflammatory airspace macrophage subsets. *JCI Insight* **4**, 126556 (2019).
230. Prasse, A. *et al.* A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 781–792 (2006).
231. Kodelja, V. *et al.* Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol* **160**, 1411–1418 (1998).
232. Khalil, N., Berezney, O., Sporn, M. & Greenberg, A. H. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* **170**, 727–737 (1989).
233. Khalil, N. *et al.* Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **5**, 155–162 (1991).
234. Murray, L. A. *et al.* Serum amyloid P therapeutically attenuates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis via its effects on macrophages. *PLoS One* **5**, e9683 (2010).
235. Murray, L. A. *et al.* TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 154–162 (2011).

236. She, Y. X., Yu, Q. Y. & Tang, X. X. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Cell Death Discov* **7**, 52 (2021).
237. Ayaub, E. A. *et al.* Overexpression of OSM and IL-6 impacts the polarization of pro-fibrotic macrophages and the development of bleomycin-induced lung fibrosis. *Sci Rep* **7**, 13281 (2017).
238. Sun, L. *et al.* New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**, L341-353 (2011).
239. Bellamri, N. *et al.* Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. *International Immunopharmacology* **72**, 112–123 (2019).
240. Ghebremedhin, A. *et al.* A Novel CD206 Targeting Peptide Inhibits Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *bioRxiv* 2020.07.27.218115 (2020) doi:10.1101/2020.07.27.218115.
241. Dhillon, S. Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **77**, 1987–2001 (2017).
242. Lescoat, A. *et al.* Combined anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of JAK-inhibitors on macrophages in vitro and in vivo: Perspectives for scleroderma-associated interstitial lung disease. *Biochemical Pharmacology* **178**, 114103 (2020).
243. Zhang, L. *et al.* Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Res* **19**, 170 (2018).
244. Sabatel, C. *et al.* Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* **46**, 457–473 (2017).
245. Bepperling, A. *et al.* Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20407–20412 (2012).
246. Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P. & Garrido, C. Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage. *The Scientific World JOURNAL* **10**, 1543–1552 (2010).
247. Arrigo, A.-P. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* **21**, 619–625 (2005).
248. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* **82**, 323–355 (2013).
249. Graner, M. W., Cumming, R. I. & Bigner, D. D. The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences. *J Neurosci* **27**, 11214–11227 (2007).
250. Gobbo, J. *et al.* Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer. *J Natl Cancer Inst* **108**, (2016).
251. Tanguy, J. *et al.* Extracellular Heat Shock Proteins as Therapeutic Targets and Biomarkers in Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Int J Mol Sci* **22**, 9316 (2021).
252. Tsaytler, P. A., Krijgsveld, J., Goerdayal, S. S., Rüdiger, S. & Egmond, M. R. Novel Hsp90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell Stress Chaperones* **14**, 629–638 (2009).
253. Sreedhar, A. S., Kalmár, E., Csermely, P. & Shen, Y.-F. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* **562**, 11–15 (2004).
254. Pearl, L. H. & Prodromou, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* **75**, 271–294 (2006).

255. Jago, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters* **332**, 275–285 (2013).
256. Sontake, V. *et al.* Hsp90 regulation of fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **2**, (2017).
257. Li, X. *et al.* Myricetin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting TGF- β signaling via targeting HSP90 β . *Biochemical Pharmacology* **178**, 114097 (2020).
258. Bellaye, P.-S., Burgy, O., Causse, S., Garrido, C. & Bonniaud, P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil? *Pharmacology & Therapeutics* **143**, 119–132 (2014).
259. Li, W., Sahu, D. & Tsen, F. Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 730–741 (2012).
260. Cheng, C.-F. *et al.* Transforming growth factor alpha (TGF α)-stimulated secretion of HSP90 α : using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGF β -rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* **28**, 3344–3358 (2008).
261. Dong, H. *et al.* Blockade of extracellular heat shock protein 90 α by 1G6-D7 attenuates pulmonary fibrosis through inhibiting ERK signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **313**, L1006–L1015 (2017).
262. Bellaye, P.-S. *et al.* Synergistic role of HSP90 α and HSP90 β to promote myofibroblast persistence in lung fibrosis. *Eur Respir J* **51**, 1700386 (2018).
263. Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I. & Sapozhnikov, A. M. HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells* **9**, E587 (2020).
264. Kumar, S. *et al.* Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett* **374**, 156–166 (2016).
265. Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P. & Bukau, B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 665–680 (2019).
266. Alderson, T. R., Kim, J. H. & Markley, J. L. Dynamical Structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 Complexes. *Structure* **24**, 1014–1030 (2016).
267. Sellares, J. *et al.* Intracellular Heat Shock Protein 70 Deficiency in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **60**, 629–636 (2019).
268. Fujibayashi, T. *et al.* Protective effect of geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock protein 70, against drug-induced lung injury/fibrosis in an animal model. *BMC Pulm Med* **9**, 45 (2009).
269. Yun, C.-H. *et al.* Geldanamycin inhibits TGF- β signaling through induction of Hsp70. *Arch Biochem Biophys* **495**, 8–13 (2010).
270. Li, Y., Kang, X. & Wang, Q. HSP70 decreases receptor-dependent phosphorylation of Smad2 and blocks TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *J Genet Genomics* **38**, 111–116 (2011).
271. Zhou, Y. *et al.* HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **21**, 598–609 (2010).
272. Kahloon, R. A. *et al.* Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *Am J Respir Crit Care Med* **187**, 768–775 (2013).

273. Mills, R. *et al.* Intrapulmonary Autoantibodies to HSP72 Are Associated with Improved Outcomes in IPF. *Journal of Immunology Research* **2019**, 1–11 (2019).
274. González-Ramos, M. *et al.* HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- β 1 up-regulation. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 232–242 (2013).
275. Taguchi, T. & Razzaque, M. S. The collagen-specific molecular chaperone HSP47: is there a role in fibrosis? *Trends Mol Med* **13**, 45–53 (2007).
276. Mala, J. G. S. & Rose, C. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci* **87**, 579–586 (2010).
277. Bellaye, P.-S., Burgy, O., Bonniaud, P. & Kolb, M. HSP47: a potential target for fibrotic diseases and implications for therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **25**, 49–62 (2021).
278. Sasaki, H. *et al.* Induction of heat shock protein 47 synthesis by TGF-beta and IL-1 beta via enhancement of the heat shock element binding activity of heat shock transcription factor 1. *J Immunol* **168**, 5178–5183 (2002).
279. Kakugawa, T. *et al.* Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch* **456**, 309–315 (2010).
280. Iwashita, T. *et al.* Involvement of collagen-binding heat shock protein 47 and procollagen type I synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis: contribution of type II pneumocytes to fibrosis. *Hum Pathol* **31**, 1498–1505 (2000).
281. Kakugawa, T. *et al.* Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress and Chaperones* **18**, 581–590 (2013).
282. Kakugawa, T. *et al.* High serum concentrations of autoantibodies to HSP47 in nonspecific interstitial pneumonia compared with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med* **8**, 23 (2008).
283. Arrigo, A.-P. *et al.* Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* **581**, 3665–3674 (2007).
284. Van Montfort, R., Slingsby, C. & Vierling, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59**, 105–156 (2001).
285. Mymrikov, E. V., Daake, M., Richter, B., Haslbeck, M. & Buchner, J. The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. *J Biol Chem* **292**, 672–684 (2017).
286. Haslbeck, M., Weinkauff, S. & Buchner, J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem* **294**, 2121–2132 (2019).
287. Sheng, B. *et al.* Increased HSP27 correlates with malignant biological behavior of non-small cell lung cancer and predicts patient's survival. *Sci Rep* **7**, 13807 (2017).
288. Parcellier, A. *et al.* HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* **23**, 5790–5802 (2003).
289. Shiota, M. *et al.* Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res* **73**, 3109–3119 (2013).
290. Choi, S.-K., Kam, H., Kim, K.-Y., Park, S. I. & Lee, Y.-S. Targeting Heat Shock Protein 27 in Cancer: A Druggable Target for Cancer Treatment? *Cancers (Basel)* **11**, E1195 (2019).
291. Heinrich, J. C. *et al.* New HSP27 inhibitors efficiently suppress drug resistance development in cancer cells. *Oncotarget* **7**, 68156–68169 (2016).

292. Heinrich, J.-C., Tuukkanen, A., Schroeder, M., Fahrig, T. & Fahrig, R. RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 1349–1361 (2011).
293. Kim, J. H. *et al.* Overcoming HSP27-mediated resistance by altered dimerization of HSP27 using small molecules. *Oncotarget* **7**, 53178–53190 (2016).
294. Choi, B. *et al.* Sensitization of lung cancer cells by altered dimerization of HSP27. *Oncotarget* **8**, 105372–105382 (2017).
295. Gibert, B. *et al.* Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers. *Oncogene* **30**, 3672–3681 (2011).
296. Korfei, M. *et al.* Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *J Proteome Res* **10**, 2185–2205 (2011).
297. Wang, G., Jiao, H., Zheng, J.-N. & Sun, X. HSP27 regulates TGF- β mediated lung fibroblast differentiation through the Smad3 and ERK pathways. *Int J Mol Med* **39**, 183–190 (2017).
298. Kim, J.-Y. *et al.* The Hsp27-Mediated I κ B α -NF κ B Signaling Axis Promotes Radiation-Induced Lung Fibrosis. *Clin Cancer Res* **25**, 5364–5375 (2019).
299. Spigel, D. R. *et al.* A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Carboplatin and Pemetrexed with or without Apatorsen (OGX-427) in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Squamous-Non-Small-Cell Lung Cancer: The SPRUCE Trial. *Oncologist* **24**, e1409–e1416 (2019).
300. Jin, C. *et al.* Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med* **20**, 280–289 (2014).
301. Thuringer, D. *et al.* Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB j.* **27**, 4169–4183 (2013).
302. De, A. K., Kodys, K. M., Yeh, B. S. & Miller-Graziano, C. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *J Immunol* **165**, 3951–3958 (2000).
303. Salari, S. *et al.* Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF- κ B in macrophages. *Cell Stress Chaperones* **18**, 53–63 (2013).
304. Banerjee, S. *et al.* Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res* **71**, 318–327 (2011).
305. Shi, C., Ulke-Lemée, A., Deng, J., Batulan, Z. & O'Brien, E. R. Characterization of heat shock protein 27 in extracellular vesicles: a potential anti-inflammatory therapy. *FASEB J* **33**, 1617–1630 (2019).
306. Hayashi, J. & Carver, J. A. The multifaceted nature of α B-crystallin. *Cell Stress Chaperones* **25**, 639–654 (2020).
307. Mao, Y.-W., Liu, J.-P., Xiang, H. & Li, D. W.-C. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **11**, 512–526 (2004).
308. Caporossi, D. *et al.* AlphaB-crystallin and breast cancer: role and possible therapeutic strategies. *Cell Stress Chaperones* **26**, 19–28 (2021).

309. van de Bovenkamp, M., Groothuis, G. M. M., Meijer, D. K. F. & Olinga, P. Liver slices as a model to study fibrogenesis and test the effects of anti-fibrotic drugs on fibrogenic cells in human liver. *Toxicol In Vitro* **22**, 771–778 (2008).
310. Lang, A. *et al.* Expression of small heat shock protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G1333-1342 (2000).
311. Huang, X.-Y. *et al.* α B-crystallin complexes with 14-3-3 ζ to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **57**, 2235–2247 (2013).
312. Chen, Z. *et al.* Discovery of structure-based small molecular inhibitor of α B-crystallin against basal-like/triple-negative breast cancer development in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* **145**, 45–59 (2014).
313. Amano, H., Matsui, Y., Hatanaka, K., Hosono, K. & Ito, Y. VEGFR1-tyrosine kinase signaling in pulmonary fibrosis. *Inflamm Regen* **41**, 16 (2021).
314. Tashiro, J. *et al.* Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)* **4**, 118 (2017).
315. B Moore, B. *et al.* Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 167–179 (2013).
316. Jules-Elysee, K. & White, D. A. Bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Clin Chest Med* **11**, 1–20 (1990).
317. Martin, W. G. *et al.* Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **23**, 7614–7620 (2005).
318. Shippee, B. M., Bates, J. S. & Richards, K. L. The role of screening and monitoring for bleomycin pulmonary toxicity. *J Oncol Pharm Pract* **22**, 308–312 (2016).
319. Rimmer, M. J., Dixon, A. K., Flower, C. D. & Sikora, K. Bleomycin lung: computed tomographic observations. *Br J Radiol* **58**, 1041–1045 (1985).
320. Tounekti, O., Kenani, A., Foray, N., Orłowski, S. & Mir, L. M. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer* **84**, 1272–1279 (2001).
321. Lazo, J. S. & Humphreys, C. J. Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3064–3068 (1983).
322. Burgy, O. *et al.* Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Sci Transl Med* **8**, 326ra20 (2016).
323. Stefanov, A. N., Fox, J., Depault, F. & Haston, C. K. Positional cloning reveals strain-dependent expression of Trim16 to alter susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *PLoS Genet* **9**, e1003203 (2013).
324. Hoyt, D. G. & Lazo, J. S. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor-beta precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **246**, 765–771 (1988).
325. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J. & Kolb, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 362–382 (2008).

326. Tanaka, K.-I. *et al.* Protective and therapeutic effect of felodipine against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Sci Rep* **7**, 3439 (2017).
327. Cross, J. *et al.* AQX-1125, small molecule SHIP1 activator inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol* **174**, 3045–3057 (2017).
328. Chua, F., Gauldie, J. & Laurent, G. J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**, 9–13 (2005).
329. Sime, P. J., Xing, Z., Graham, F. L., Csaky, K. G. & Gauldie, J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* **100**, 768–776 (1997).
330. Bonniaud, P. *et al.* Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 889–898 (2005).
331. Hübner, R.-H. *et al.* Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* **44**, 507–511, 514–517 (2008).
332. Uhl, F. E. *et al.* Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures. *Eur Respir J* **46**, 1150–1166 (2015).
333. Alsafadi, H. N. *et al.* An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **312**, L896–L902 (2017).
334. Stope, M. B. *et al.* Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation. *Dis Markers* **2017**, 1575374 (2017).
335. Byrne, A. J., Maher, T. M. & Lloyd, C. M. Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? *Trends Mol Med* **22**, 303–316 (2016).
336. Rodt, T. *et al.* Micro-computed tomography of pulmonary fibrosis in mice induced by adenoviral gene transfer of biologically active transforming growth factor- β 1. *Respir Res* **11**, 181 (2010).
337. Tanguy, J. *et al.* [18F]FMISO PET/CT imaging of hypoxia as a non-invasive biomarker of disease progression and therapy efficacy in a preclinical model of pulmonary fibrosis: comparison with the [18F]FDG PET/CT approach. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2021) doi:10.1007/s00259-021-05209-2.
338. Aung, W. W. *et al.* Immunomodulating role of the JAKs inhibitor tofacitinib in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *J Dermatol Sci* **101**, 174–184 (2021).
339. Citera, G. *et al.* Incidence Rates of Interstitial Lung Disease Events in Tofacitinib-Treated Rheumatoid Arthritis Patients: Post Hoc Analysis From 21 Clinical Trials. *J Clin Rheumatol* (2020) doi:10.1097/RHU.0000000000001552.
340. Vacchi, C. *et al.* Tofacitinib for the Treatment of Severe Interstitial Lung Disease Related to Rheumatoid Arthritis. *Case Rep Med* **2021**, 6652845 (2021).
341. Xia, S., Menden, H. L., Korfhagen, T. R., Kume, T. & Sampath, V. Endothelial immune activation programmes cell-fate decisions and angiogenesis by inducing angiogenesis regulator DLL4 through TLR4-ERK-FOXC2 signalling. *J Physiol* **596**, 1397–1417 (2018)

342. Chen, W.-L. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Upregulates TNF- α Expression via TLR2/ERK Signaling and Induces MMP-1 and MMP-9 Production in Human Pleural Mesothelial Cells. *PLoS One* **10**, e0137979 (2015).
343. Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460–469 (2007).
344. Yao, Q. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) induces the gene expression of integrin α V β 5 to promote macrophage M2 polarization. *J Biol Chem* **293**, 16572–16582 (2018).

ANNEXES

HSP27 : une nouvelle cible pour traiter la fibrose pulmonaire idiopathique ?

A new target for treating idiopathic pulmonary fibrosis?

L. Pommerolle¹, O. Burgy¹, P. Bonniaud², F. Goirand¹

¹INSERM U1231, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne-Franche Comté, F-21000 Dijon, France.

² Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adulte, Centre Hospitalier Universitaire Dijon-Bourgogne, F-21000 Dijon, France.

Auteur correspondant :

L. Pommerolle

INSERM U1231, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne-Franche Comté, F-21000 Dijon, France

Lenny.Pommerolle@u-bourgogne.fr

Reçu le : 12.01.2020

Accepté le : 12.01.2020

Déclaration de liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.



Review

Extracellular Heat Shock Proteins as Therapeutic Targets and Biomarkers in Fibrosing Interstitial Lung Diseases

Julie Tanguy ^{1,2} , Lenny Pommerolle ^{1,2}, Carmen Garrido ¹, Martin Kolb ³, Philippe Bonniaud ^{1,2,4},
Françoise Goirand ^{1,2,4,†} and Pierre-Simon Bellaye ^{2,5,*}

- ¹ Team HSP-Pathies, INSERM U1231, 21000 Dijon, France; julie_tanguy14380@hotmail.fr (J.T.); lenny.pommerolle@u-bourgogne.fr (L.P.); Carmen.Garrido-Fleury@u-bourgogne.fr (C.G.); philippe.bonniaud@chu-dijon.fr (P.B.); francoise.goirand@u-bourgogne.fr (F.G.)
 - ² Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adultes de Dijon, OrphaLung Network (RespiFil), University Hospital of Burgundy, 21000 Dijon, France
 - ³ Firestone Institute for Respiratory Health, McMaster University, Hamilton, ON L8S 4L8, Canada; kolbm@mcmaster.ca
 - ⁴ University of Burgundy and Franche-Comté, 25000 Besançon, France
 - ⁵ Preclinical Imaging and Radiotherapy Platform, Nuclear Medicine Department, Centre George-François Leclerc, 21000 Dijon, France
- * Correspondence: psbellaye@cgfl.fr
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Tanguy, J.; Pommerolle, L.; Garrido, C.; Kolb, M.; Bonniaud, P.; Goirand, F.; Bellaye, P.-S. Extracellular Heat Shock Proteins as Therapeutic Targets and Biomarkers in Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9316. <https://doi.org/10.3390/ijms22179316>

Academic Editors: Michael Roth and Fang Lei

Received: 30 July 2021

Accepted: 26 August 2021

Published: 27 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Interstitial lung diseases (ILDs) include a large number of diseases and causes with variable outcomes often associated with progressive fibrosis. Although each of the individual fibrosing ILDs are rare, collectively, they affect a considerable number of patients, representing a significant burden of disease. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the typical chronic fibrosing ILD associated with progressive decline in lung. Other fibrosing ILDs are often associated with connective tissues diseases, including rheumatoid arthritis-ILD (RA-ILD) and systemic sclerosis-associated ILD (SSc-ILD), or environmental/drug exposure. Given the vast number of progressive fibrosing ILDs and the disparities in clinical patterns and disease features, the course of these diseases is heterogeneous and cannot accurately be predicted for an individual patient. As a consequence, the discovery of novel biomarkers for these types of diseases is a major clinical challenge. Heat shock proteins (HSPs) are molecular chaperons that have been extensively described to be involved in fibrogenesis. Their extracellular forms (eHSPs) have been recently and successfully used as therapeutic targets or circulating biomarkers in cancer. The current review will describe the role of eHSPs in fibrosing ILDs, highlighting the importance of these particular stress proteins to develop new therapeutic strategies and discover potential biomarkers in these diseases.

Keywords: extracellular HSP; interstitial lung diseases; biomarker; lung fibrosis; IPF; heat shock proteins

1. Introduction

Interstitial lung diseases (ILDs) is a group of respiratory lung diseases affecting the lung interstitium which may lead to progressive lung fibrosis and ultimately, respiratory failure. Recent studies estimate that 13–40% of ILDs evolve to a fibrosing phenotype [1]. In others cases, pathology is spontaneously self-limited. Overall prevalence for progressive fibrosing ILDs is around 2.2–20 per 100,000 in Europe and 28 per 100,000 in the USA [1].

ILDs are typically assigned to many disease categories for classification and management purposes, roughly on the basis of a known underlying disease (e.g., pulmonary fibrosis associated with rheumatoid arthritis), an inciting agent (e.g., pneumoconiosis or drug side effect), or the absence of a known cause (idiopathic ILDs). Idiopathic ILDs include a large panel of diseases including idiopathic forms such as acute interstitial pneumonia (AIP), nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) or idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [2], the most common form of fibrotic ILD [3]. On the other side, several diseases can induce



CrossMark

TRIM33 prevents pulmonary fibrosis by impairing TGF- β 1 signalling

Pierre-Marie Boutanquoi¹, Olivier Burgy^{1,2}, Guillaume Beltramo^{1,3,4}, Pierre-Simon Bellaye⁵, Lucile Dondaine^{1,4}, Guillaume Marcion¹, Lenny Pommerolle¹, Aurélie Vadel⁶, Maximilien Spanjaard^{1,3}, Oleg Demidov¹, Arnaud Mailloux⁶, Bruno Crestani⁶, Martin Kolb⁷, Carmen Garrido¹, Françoise Goirand^{1,8} and Philippe Bonniaud^{1,3,4,8}

Affiliations: ¹INSERM U1231, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France. ²Division of Pulmonary Sciences and Critical Care Medicine, Dept of Medicine, University of Colorado Denver, Aurora, CO, USA. ³Dept of Pulmonary Medicine and Intensive Care Unit, University Hospital, Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France. ⁴Reference Center for Rare Lung Diseases, University Hospital, Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France. ⁵Cancer Center Georges François Leclerc, Dijon, France. ⁶INSERM U1152, Faculty of Medicine, University of Bichat, Paris, France. ⁷McMaster University, Hamilton, ON, Canada. ⁸These authors codirected this work and contributed equally to this work.

Correspondence: Philippe Bonniaud, Dept of Pulmonary Medicine and Intensive Care Unit, University Hospital, 21079 Dijon, France. E-mail: philippe.bonnaud@chu-dijon.fr

 @ERSpublications

TRIM33 has a protective role against fibrogenesis, inhibiting the TGF- β 1 pathway through a direct association with HSPB5. Interactions between TRIM33, SMAD4 and HSPB5 may represent key targets to prevent the progression of pulmonary fibrosis. <http://bit.ly/3aVCuxc>

Cite this article as: Boutanquoi P-M, Burgy O, Beltramo G, *et al.* TRIM33 prevents pulmonary fibrosis by impairing TGF- β 1 signalling. *Eur Respir J* 2020; 55: 1901346 [<https://doi.org/10.1183/13993003.01346-2019>].

ABSTRACT

Background: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease characterised by myofibroblast proliferation and abnormal extracellular matrix accumulation in the lungs. Transforming growth factor (TGF)- β 1 initiates key profibrotic signalling involving the SMAD pathway and the small heat shock protein B5 (HSPB5). Tripartite motif-containing 33 (TRIM33) has been reported to negatively regulate TGF- β /SMAD signalling, but its role in fibrogenesis remains unknown. The objective of this study was to elucidate the role of TRIM33 in IPF.

Methods: TRIM33 expression was assessed in the lungs of IPF patients and rodent fibrosis models. Bone marrow-derived macrophages (BMDM), primary lung fibroblasts and 3D lung tissue slices were isolated from *Trim33*-floxed mice and cultured with TGF- β 1 or bleomycin (BLM). *Trim33* expression was then suppressed by adenovirus Cre recombinase (AdCre). Pulmonary fibrosis was evaluated in haematopoietic-specific *Trim33* knockout mice and in *Trim33*-floxed mice that received AdCre and BLM intratracheally.

Results: TRIM33 was overexpressed in alveolar macrophages and fibroblasts in IPF patients and rodent fibrotic lungs. *Trim33* inhibition in BMDM increased TGF- β 1 secretion upon BLM treatment. Haematopoietic-specific *Trim33* knockout sensitised mice to BLM-induced fibrosis. In primary lung fibroblasts and 3D lung tissue slices, *Trim33* deficiency increased expression of genes downstream of TGF- β 1. In mice, AdCre-*Trim33* inhibition worsened BLM-induced fibrosis. *In vitro*, HSPB5 was able to bind directly to TRIM33, thereby diminishing its protein level and TRIM33/SMAD4 interaction.

Conclusion: Our results demonstrate a key role of TRIM33 as a negative regulator of lung fibrosis. Since TRIM33 directly associates with HSPB5, which impairs its activity, inhibitors of TRIM33/HSPB5 interaction may be of interest in the treatment of IPF.

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: 8 July 2019 | Accepted after revision: 2 March 2020

Copyright ©ERS 2020