

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
U.F.R de MEDECINE
Ecole Doctorale Environnements - Santé - STIC

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Mention : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 15 novembre 2013

par

Pierre-Simon BELLAYE

**Rôle de la petite protéine de choc thermique
 α B-crystallin dans la fibrogenèse pulmonaire et son
implication dans la voie de signalisation du
Transforming Growth Factor- β 1.**

Membres du jury :

Pr. Nelly FROSSARD	Rapporteur
Pr. Carole PLANES	Rapporteur
Pr. Dominique ISRAEL-BIET	Examineur
Dr. Carmen GARRIDO	Examineur
Pr. Jean-Michel PETIT	Examineur
Pr. Philippe CAMUS	Invité
Pr. Philippe BONNIAUD	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs obligations professionnelles :

Je remercie le **Professeur Nelly Frossard** et le **Professeur Carole Planes** d'avoir accepté d'être rapporteur pour ce travail et le **Professeur Jean-Michel Petit** ainsi que le **Professeur Dominique Israel-Biet** pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Je remercie le **Professeur Philippe Camus** pour avoir accepté l'invitation à venir examiner ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier le **Professeur Philippe Bonniaud** de m'avoir encadré durant ces années. Merci pour tout ce que tu m'a appris sur le plan scientifique. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la fibrose pulmonaire qui me passionne tant aujourd'hui. Merci pour la confiance que tu m'accordée en me laissant libre dans ma façon de travailler et de conduire mes projets. Merci aussi pour ta grande disponibilité et ton écoute. Merci de m'avoir permis de présenter mes travaux à des congrès internationaux et français. Et surtout merci pour ta sympathie, il est toujours très agréable de travailler avec toi, même avec ton « pessimisme-optimiste ».

Je remercie également le **Docteur Carmen Garrido** pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci d'avoir suivi mon travail, de m'avoir aiguillé dans mes projets et de m'avoir grandement aider pour la rédaction de mes articles.

Pour l'implication et l'aide apportées à mes articles je remercie : le **Professeur Bruno Crestani**, **Joelle Marchal-Somme** et le **Docteur Valérie Besnard** ainsi que leur équipe et le **Docteur Jack Gauldie**.

Je remercie l'**European IPF network**, et l'**ANR Blanc meso-IPF** pour avoir financé mes travaux.

Merci à la plateforme d'histologie **Cellimap** dirigée par **André Bouchot**. Merci pour vos conseils et votre aide en microscopie. Merci à **Amandine** et **Audrey** pour leurs magnifiques coupes histologiques.

Merci à **Valérie St Gorgio** et au personnel de l'animalerie pour le temps accordé à mes précieuses souris. Merci pour votre gentillesse et votre écoute.

Merci au nom du **Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire"** et de la **Fondation du Souffle**, ainsi qu'à la **Société de Pneumologie de Langue Française** pour avoir cru en mon projet et me permettre de partir en post-doc au Canada.

Je remercie également le Professeur **Martin Kolb** de croire en mes capacités et de m'avoir offert un post-doc outre-Atlantique.

Merci à **Alexandrine** et **Lucile** d'avoir géré mes différents financements et de s'être occupé de me faciliter mes nombreux déplacements en congrès. Merci d'avoir gardé votre calme et votre sourire.

Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe Garrido passés et actuels. Merci surtout à **Guillaume** de m'avoir tout appris notamment la manipulation de animaux (je suis toujours aussi peu à l'aise avec les rats !). Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Merci aussi pour les sorties escalades !!

Merci à **Sébastien M** et **Anne-laure** d'avoir permis mon intégration au début de ma thèse. **Anne-laure** j'espère te revoir sur un cours de bad !

Olivier, j'espère t'avoir bien formé. Je te souhaite tout le meilleur pour la fin de ta thèse. Je ne me fais pas trop de soucis pour toi, tu es bien parti. Conserve ta rigueur et ta bonne humeur et tout devrait rouler pour toi. Merci pour toute l'aide que tu m'a apporté sur les manips et sur la réflexion. Merci à **Julien** pour ton aide précieuse sur la fin de ma thèse. Je pense que d'ici peu tu seras le maître de la culture primaire de cellules pulmonaires en tout genre ! Merci aussi pour les fous rires ! L'équipe Bonniaud est entre de bonnes mains ! Merci aussi à **Sébastien C.** pour ton aide et tes conseils en microscopie et fluorescence. Tu resteras quand même un Bonniaud !

Merci à **Arlette** pour ton aide en cryométrie même si je n'en ai pas fait beaucoup. Merci à **Dominique** pour tes délicieuses tartes. Merci à **Gaëtan** et **Renaud** pour votre gentillesse. Je remercie également **Kévin, Oleg, Adonis, Jessica, Margaux, Guillaume, Antoine.**

Merci à **Jean** et à **Sabrina** mes deux acolytes depuis toujours (ou presque). Merci pour votre amitié et pour tous les bons moments passés ensemble ici ou ailleurs. Merci aussi pour votre soutien, Jean je n'oublierai pas d'où vient l'idée des fractions cyto/noyau !

Merci aux personnes de l'U866 que j'ai côtoyées, **Anne, Valentin, Arthur, Florent, Hélène, Aymeric, Benoit...**

Je terminerai en remerciant particulièrement ma **famille**, notamment mes **parents**. Merci pour votre soutien sur tous les plans, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir permis de partir un an en Suède pour perfectionner mon anglais, de m'avoir poussé dans la vie avec beaucoup d'intelligence. Je n'en serais pas là sans votre aide et votre amour. Merci pour tout. Mon petit frère **Jean-Victor**, te voilà bien parti toi aussi dans la vie. Le meilleur t'attend. En attendant bien sûr que tu viennes nous faire tes pâtisseries au Canada. Et ma grande sœur **Julie, Benoit** et ma nièce **Capucine** qui partent pour une nouvelle aventure briviste.

Je remercie également ma **belle famille, Philippe et Marie-Françoise** pour m'avoir accueilli avec tant de gentillesse dans la chaleur du Sud.

Enfin je te remercie **Sophie** pour ton amour, d'avoir toujours cru en moi et de me combler de bonheur, je t'aime. Nous nous lançons maintenant dans une nouvelle et belle aventure canadienne tous les deux...

Résumé

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est de pronostic sombre et sans traitement efficace. Elle est caractérisée par un début sous pleural et la présence de myofibroblastes responsables de la synthèse excessive de la matrice extracellulaire. La voie de signalisation du Transforming Growth Factor (TGF)- β 1, facteur clé de la genèse de la fibrose et sa progression, passe par les Smads, notamment Smad4. Le TGF- β 1 induit la différenciation des fibroblastes pulmonaires et des cellules épithéliales et mésothéliales en myofibroblastes.

α B-crystallin est une protéine de choc thermique surexprimée dans la fibrose du foie, du rein et la fibrose vasculaire. Elle peut être induite par le TGF- β 1.

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle d' α B-crystallin dans la fibrose pleurale et pulmonaire.

Nous montrons qu' α B-crystallin est surexprimée dans les poumons et la plèvre de patients atteints de FPI. *In vivo*, dans trois modèles de fibrose pulmonaire (bléomycine, surexpression de TGF- β 1 ou d'IL-1 β) les souris KO pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose avec une inhibition de la voie du TGF- β . *In vitro*, dans les cellules épithéliales, mésothéliales ou les fibroblastes, α B-crystallin augmente la localisation nucléaire de Smad4. En interagissant avec TIF1 γ , responsable de l'export nucléaire de Smad4, elle favorise la séquestration nucléaire de Smad4 et son activité pro-fibrosante. Au contraire, son inhibition permet la formation du complexe Smad4/TIF1 γ et l'export nucléaire de Smad4 inhibant son activité.

Ce travail montre l'importance d' α B-crystallin dans la fibrose pleuro-pulmonaire et son rôle sur la voie du TGF- β . α B-crystallin pourrait être une cible thérapeutique de la FPI.

Mots clés : Fibrose pulmonaire idiopathique, α B-crystallin, Transforming Growth Factor- β 1, Transition épithélio-mésenchymateuse, plèvre, Fibrose pleurale

Table des matières

<i>Remerciements</i>	2
<i>Résumé</i>	5
<i>Table des matières</i>	6
<i>Liste des abréviations</i>	9
<i>Liste des Figures</i>	11

INTRODUCTION..... 14

ETAT DE LA QUESTION..... 18

I- Les principaux acteurs de la fibrose	19
1- Mécanismes généraux de la fibrose	19
2- Matrice extracellulaire	22
a- Le collagène	23
b- Production et renouvellement de la MEC : Balance MMP/TIMP.....	24
c- MMP et TIMP dans la fibrose pulmonaire.....	26
d- Rôle actif de la matrice dans la fibrogenèse.....	27
3- Transforming Growth Factor- β 1	28
a- Structure	29
b- Activation du TGF- β	31
c- Rôle du TGF- β	33
d- Les récepteurs	34
4- Les Smad.....	35
a- Voie de signalisation des Smad.....	35
b- Fonction nucléaire des Smad.	37
c- Translocation nucléaire des Smad : rôle de Smad4.....	38
d- Les voies Smad-indépendantes	39
e- Les Smad dans la fibrose pulmonaire.....	40
5- Le myofibroblaste	41
a- Les fibroblastes pulmonaires résidants.....	42
b- Les cellules épithéliales	43
c- Les fibrocytes.....	46
II- Les modèles classiques de fibrose pulmonaire.....	48
1- Le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine	48
2- Le modèle par transfert de gènes (TGF- β et IL-1 β).....	50
III- Rôle de la plèvre et de la cellule mésothéliale dans la fibrose pulmonaire	54
1- La cellule mésothéliale : structure, fonction et rôle dans la fibrose	56
2- La fibrose pleurale.....	60
3- Intérêt de l'étude de la plèvre dans le FPI.....	61
a- La plèvre dans les modèles classiques de fibrose pulmonaire.....	61
b- La plèvre dans le FPI chez l'homme.....	63
c- Notre modèle de fibrose pleurale	64
d- Rôle potentiel de la plèvre et des cellules mésothéliales dans la FPI.....	67
IV- Les Heat Sock Proteins	68
1- La réponse cellulaire au stress.....	68
2- Classification des HSP	71
3- Les HSPs comme cibles thérapeutiques ?.....	73
4- HSP90	74
5- HSP70	78

6- HSP110	83
7- HSP47	84
8- Les petites protéines de stress (sHSP).....	87
a- HSP27	87
b- α B-crystallin.....	91
V- Approches thérapeutiques actuelles de la FPI.....	98
2- Pirfenidone	98
4- N-acétylcystéine (NAC).....	99
5- TGF- β	100
VI- Objectifs de la thèse	101

METHODES ET RESULTATS..... 102

LA PETITE PROTEINE DE STRESS α B-CRYSTALLIN EST UN ACTEUR ESSENTIEL REGULANT LA LOCALISATION DE SMAD4 : IMPLICATION DANS LA FIBROSE PULMONAIRE 103

I- Méthodes.....	104
1- Traitements des animaux.....	104
a- Injections.....	104
b- Sacrifices, liquides de lavages et prélèvement des poumons	104
2- Histologie	105
a- Tissus humains	105
b- Immunohistochimie (IHC).....	106
3- Quantification du collagène	107
a- Histomorphométrie (Rouge Sirius)	107
b- Sircol.....	108
4- Quantification du TGF- β 1	108
5- Culture cellulaire.....	108
6- ARN interference et transfection.....	109
7- Fractionnement cellulaire.....	110
8- Western blotting	110
9- Co-immunoprécipitation	111
10- RTq-PCR.....	112
11- Immunofluorescence	113
12- Analyses statistiques	113
II- Résultats	114
1- α B-crystallin est surexprimée au cours du processus de fibrose pulmonaire.....	114
2- Les souris déficientes pour α B-crystallin ont une structure pulmonaire normale au cours du vieillissement.....	115
3- L'absence d' α B-crystallin limite la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine <i>in vivo</i>	117
4- α B-crystallin est également impliquée dans la fibrose pulmonaire induite par une cytokine pro-inflammatoire, IL-1 β	121
5- α B-crystallin régule l'expression du TGF- β 1 et de ses gènes cibles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	123

6- α B-crystallin module la localisation cellulaire de Smad4.....	129
7- α B-crystallin régule la mono-ubiquitination de Smad4 via TIF1 γ	135
ROLE DE LA PETITE PROTEINE DE STRESS αB-CRYSTALLIN SUR LA FIBROSE PLEURALE	141
I- Méthodes.....	142
1- Traitement des animaux	142
a- Injections d'AdTGF	142
b- Injection de bléomycine et de noir de carbone.....	142
c- Sacrifices, liquides de lavages et prélèvement des poumons	143
2- Culture cellulaire.....	143
3- Test de migration.....	143
II- Résultats	144
1- α B-crystallin est surexprimée au niveau de la plèvre au cours du processus de fibrose.....	144
2- L'absence d' α B-crystallin protège de la fibrose pleurale et sous pleurale induite par l'administration conjointe de bléomycine et de particules de carbone.....	145
3- Les souris KO pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose pleurale et sous pleurale induite par le TGF- β 1	148
4- L'absence d' α B-crystallin inhibe la voie du TGF- β 1 au niveau de la plèvre et des cellules mésothéliales.....	150
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	154
I- Rôle d' α B-crystallin dans la fibrose pulmonaire.....	156
II- Rôle d' α B-crystallin dans la fibrose pleurale.....	162
III- Conclusion générale.....	163
RÉFÉRENCES.....	164
ANNEXES.....	183
Liste des Annexes :.....	184
1- Curriculum vitae.....	184
2- Autres publication et articles didactiques.....	186
a- Articles en préparation	186
The small heat shock protein α B-crystallin is essential for Smad4's nuclear localisation: impact on pulmonary fibrosis.....	187
The lack of the small heat shock protein α B-crystallin hampers pleural fibrosis by blocking TGF- β 1 signalling.....	222
Heat shock proteins and fibrosis: good or evil?.....	245
b- Article original.....	288
c- Articles didactiques.....	290

Liste des abréviations

17-AAG : 17-(Allylamino) -17-demethoxygeldanamycin

AdDI: Empty adenovector

AdLacZ: Adenovector encoding β -galactosidase

AdTGF- β 1 : Adenovector encoding TGF- β 1

AEC : Alveolar Epithelial Cell

ALK : Activin-receptor-Like kinase

LBA : Lavage Broncho-Alveolaire

BMP : Bone Morphogenetic Protein

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Diseases / maladies pulmonaires obstructives chroniques

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

DRM : Demin-Related Myopathy)

EMT : Epithelial-to-Mesenchymal Transition / transition épithélio-mésenchymateuse

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

FAM : Fat Facets in Mouse

FGF : Fibroblast Growth Factor

FI : Filaments Intermédiaires

FITC: (fluorescein isothiocyanate

FPI: Fibrose Idiopathique Pulmonaire

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GGA : Geranylgeranylacetone

GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

HSE : Heat Shock Element

HSF: Heat Shock Factors

HSP: Heat Shock Protein

IFN- γ : Interferon- γ

IL-1 β : Interleukine 1 beta

ILK: Integrin Linked Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LLC : Large Latent Complex

LAP: Latency Associated Peptide

LTBP: Latent TGF- β Binding Protein

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1

MEC: Matrice ExtraCellulaire

MK2: MAPKAP Kinase2
MMP : Matrix MetalloProtease / métalloprotéinase matricielle
NAC : N-acétylcystéine
NEF : Nucleotide Exchange Factor
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NLS : Nuclear Localisation Signal
P38 MAPK : P38 Mitogen Activated Protein Kinase
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PI3K : PhosphatidyInositol-3-kinase
PLF: Pleural Lavage Fluid
SBE : SMAD Binding Element
SLC : Small Latent Complex
SMAD: Mothers Against Decapentaplegic homolog
 α -SMA: α -Smooth Muscle Actin
SMURF: SMAD-Ubiquitin Regulatory Factor
T β RI : TGF- β Receptor I
T β RII : TGF- β Receptor II
TGF- β 1 : Transforming Growth Factor- β 1
TIF-1 γ : Transcriptional Intermediary Factor-1 γ
TIMP : Tissue Inhibitor MetalloProtease
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
tPA : Tissue-type Plasminogen Activator
uPA : Urokinase-type Plasminogen Activator
WNT: Wingless-type MMTV integration site
X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZO-1 : Zona Occludens-1

Liste des Figures

- Figure 1 : Résultats de la cicatrisation : Régénération tissulaire ou fibrose
- Figure 2 : L'homéostasie de la matrice extra-cellulaire : la balance MMPs/TIMPs
- Figure 3 : TGF- β : Structure, activation et récepteurs
- Figure 4 : Mécanisme général de la voie des Smad
- Figure 5 : Structure des deux domaines des R-Smad
- Figure 6 : Régulation de la localisation cellulaire de Smad4 par l'ubiquitine
- Figure 7 : Foyers fibroblastiques
- Figure 8 : Représentation schématique des grandes étapes de l'EMT
- Figure 9 : Représentation schématique des grandes étapes du processus de fibrose pulmonaire
- Figure 10 : Modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine
- Figure 11 : Modèle de fibrose pulmonaire par injection intra-trachéale d'adénovirus codant pour le TGF- β 1
- Figure 12 : Modèle de fibrose pulmonaire par injection intra-trachéale d'adénovirus codant pour l'IL-1 β
- Figure 13 : Représentation schématique de la plèvre
- Figure 14 : Histologie d'un feuillet pleural humain sain
- Figure 15 : Les différentes fonctions des cellules mésothéliales
- Figure 16 : L'induction d'une fibrose pulmonaire par différentes méthodes d'administration de bléomycine, induit un début de fibrose au sein des régions sous-pleurales
- Figure 17 : Début d'FPI localisée dans la région sous-pleurale
- Figure 18 : Coupe histologique de biopsie pulmonaire réalisée chez un patient souffrant de FPI
- Figure 19 : Administration intra-pleurale d'adénovirus codant la β -galactosidase
- Figure 20 : Modèle de fibrose pleurale induite par le TGF- β 1
- Figure 21 : Les cellules mésothéliales peuvent subir une EMT *in vivo*
- Figure 22 : Activation de la réponse cellulaire au stress par HSF1
- Figure 23 : Activité protectrice des HSPs sur la cellule en condition de stress
- Figure 24 : Nomenclature des différentes HSPs
- Figure 25 : Représentation schématique du mode d'action d'HSP90
- Figure 26 : L'inhibition d'HSP90 bloque la voie du TGF- β 1
- Figure 27 : Représentation schématique du mode d'action d'HSP70
- Figure 28 : L'induction d'HSP70 perturbe la voie du TGF- β 1
- Figure 29 : Représentation schématique du mode d'action d'HSP110
- Figure 30 : Rôle d'HSP47 dans la synthèse et la maturation du collagène
- Figure 31 : Structure et organisation d'HSP27
- Figure 32 : HSP27 stabilise le facteur de transcription Snail et favorise l'EMT

Figure 33 : Posture caractéristique des souris déficientes pour α B-crystallin

Figure 34 : Structure et organisation oligomérique d' α B-crystallin

Figure 35 : α B-crystallin favorise l'EMT par la voie ERK

Figure 36 : Injection intratrachéale

Figure 37 : Représentation des mesures histomorphométriques

Figure 38 : α B-crystallin est exprimée dans le tissu pulmonaire fibrotique chez les patients atteints de FPI

Figure 39 : α B-crystallin est surexprimée dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire

Figure 40 : Le manque d' α B-crystallin n'affecte pas la structure pulmonaire au cours du vieillissement

Figure 41 : Le manque d' α B-crystallin n'affecte pas le taux de collagène dans les poumons en conditions normales

Figure 42 : L'absence d' α B-crystallin n'affecte pas l'inflammation induite par la bléomycine

Figure 43 : L'absence d' α B-crystallin n'affecte pas l'apoptose induite par la bléomycine

Figure 44 : Les souris déficientes pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose induite par la bléomycine

Figure 45 : L'accumulation de collagène induite par la bléomycine est plus faible chez les souris déficientes pour α B-crystallin

Figure 46 : Le taux de TGF- β 1 est plus faible dans les LBA des souris déficientes pour α B-crystallin

Figure 47 : Les souris déficientes pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose induite par l'AdIL1

Figure 48 : Les souris déficientes pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose induite par l'AdIL1

Figure 49 : Les souris α B-KO présentent une voie de signalisation du TGF- β 1 déficiente

Figure 50 : α B-crystallin est surexprimée par un traitement au rTGF- β 1

Figure 51 : α B-crystallin régule l'expression des gènes cibles du TGF- β 1 dans les cellules A549

Figure 52 : α B-crystallin régule l'expression des gènes cibles du TGF- β 1 dans les cellules épithéliales primaires

Figure 53 : α B-crystallin régule l'expression des gènes cibles du TGF- β 1 dans les fibroblastes primaires

Figure 54 : L'inhibition d' α B-crystallin ne modifie pas l'expression des protéines Smad

Figure 55 : α B-crystallin interagit avec Smad4 mais pas Smad3

Figure 56 : α B-crystallin module la localisation cellulaire de Smad4

Figure 57 : α B-crystallin module la localisation cellulaire de Smad4 (immunofluorescence)

Figure 58 : L'inhibition d' α B-crystallin n'affectait pas l'expression de l'Importine 8

Figure 59 : α B-crystallin module l'export nucléaire de Smad4

Figure 60 : α B-crystallin module l'activité transcriptionnelle des Smad

Figure 61 : α B-crystallin interagit avec la E3-ubiquitine ligase TIF1 γ

Figure 62 : La mono-ubiquitination de Smad4 est conservée en cas d'inhibition d' α B-crystallin

Figure 63 : La surexpression α B-crystallin induit la diminution de la protéine TIF1 γ

Figure 64 : la diminution de TIF1 γ induite par α B-crystallin n'implique pas le protéasome

Figure 65 : L'inhibition d' α B-crystallin induit une surexpression de TIF1 γ *in vitro* et *in vivo*

Figure 66 : *In vivo* Smad4 est exclue du noyau chez les souris KO pour α B-crystallin traitées à la bléomycine

Figure 67 : Mécanisme d'action hypothétique d' α B-crystallin sur la voie du TGF- β 1 Smad4-dépendante

Figure 68 : Injection intrapleurale

Figure 69 : α B-crystallin est exprimée au niveau pleural en cas de fibrose

Figure 70 : Les souris KO pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose pleurale induite par l'administration conjointe de bléomycine et de particules de carbone.

Figure 71 : L'accumulation de collagène au niveau pleural et sous pleural est plus faible chez les souris KO pour α B-crystallin après administration conjointe de bléomycine et de particules de carbone

Figure 72 : L'absence d' α B-crystallin protège de la fibrose pleurale induite par le TGF- β 1

Figure 73 : Les souris KO et WT sont capables d'exprimer le gène codé par les adénovirus de la même manière

Figure 74 : L'accumulation de collagène pleural est plus faible chez les souris KO après administration d'AdTGF

Figure 75 : α B-crystallin régule la voie du TGF- β 1 au niveau de la plèvre

Figure 76 : α B-crystallin régule la voie du TGF- β 1 au niveau des cellules mésothéliales

Figure 77 : α B-crystallin régule la localisation de Smad4 dans les cellules mésothéliales

Figure 78 : L'inhibition d' α B-crystallin limite la migration des cellules mésothéliales pleurales *in vivo* et *in vitro*

Figure 79 : L'inhibition d' α B-crystallin n'affecte pas la voie ERK

Figure 80 : L'inhibition des caspases restaure l'expression de TIF1 γ après surexpression d' α B-crystallin.

Figure 81 : L'inhibition d' α B-crystallin entraîne l'export nucléaire de Smad2 et Smad3

INTRODUCTION

Introduction

La fibrose est un mécanisme normal de cicatrisation développé par l'organisme pour lutter contre les diverses agressions tissulaires auxquelles il est soumis. Dans certains cas, elle peut dépasser le processus de cicatrisation normal. La fibrose devient alors pathologique pouvant être responsable d'une dégradation des fonctions du tissu concerné.

La fibrose pulmonaire est une maladie invalidante pouvant conduire à une forte altération des fonctions respiratoires. Elle se manifeste chez les sujets atteints par une sensation de difficulté respiratoire (dyspnée) compensée par une augmentation de la fréquence ou de l'amplitude des mouvements respiratoires. Cette pathologie se caractérise par une production et une accumulation disproportionnées de matrice extra-cellulaire (MEC), principalement de collagène, dans le parenchyme pulmonaire détruisant la structure alvéolaire des poumons.

Il a déjà été montré que de nombreux agents chimiques, notamment certains traitements utilisés chez l'homme, pouvaient induire des fibroses pulmonaires (www.pneumotox.com, (1)). La bléomycine est le plus connu et le plus étudié d'entre eux. Malgré la bonne efficacité de cet agent chimiothérapeutique sur certains cancers (2), son utilisation par les cliniciens est fortement limitée par son importante toxicité pulmonaire (3, 4). Cet agent est largement utilisé chez l'animal, par les chercheurs, pour induire et étudier les processus impliqués dans l'initiation et la progression des fibroses pulmonaires (5).

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pathologie chronique progressive et létale dont l'origine reste inconnue. Elle affecte principalement les sujets âgés de plus de 50 ans avec une prévalence de 13 à 20 cas/100 000 habitants. Elle est caractérisée par une évolution rapide conduisant à une insuffisance respiratoire et au décès avec une médiane de survie de 2 à 5 ans après diagnostic (6). Malgré une recherche intensive il n'existe aujourd'hui aucun traitement pour bloquer la progression de la maladie et encore moins pour la faire régresser une fois établie (7). Les premiers traitements proposés ciblaient principalement l'inflammation associée à la progression de la FPI mais leur efficacité n'a jamais pu être démontrée (8, 9). De nouvelles molécules comme la pirfenidone ou les inhibiteurs de tyrosine kinase (10) apparaissent dans l'espoir de contrecarrer la progression de la pathologie chez les sujets atteints. Leur efficacité reste encore limitée voire controversée. Le besoin de comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place de la FPI demeure donc aujourd'hui primordial.

Si l'origine directe de la FPI reste encore un mystère pour les chercheurs, les principaux acteurs conduisant à l'établissement de fibroses pulmonaires chroniques sont bien identifiés. Les myofibroblastes sont considérés comme les cellules clés du processus de fibrose puisqu'ils sont les responsables essentiels de la synthèse de MEC lors de la FPI et sont associés à la progression de la maladie. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'origine de ces cellules agressives. Les cellules épithéliales constituent également un acteur important lors de la fibrose pulmonaire puisqu'elles peuvent se trans-différencier pour acquérir un phénotype myofibroblastique et ainsi participer à l'accumulation de MEC dans le tissu pulmonaire. Cette transformation, nommée par les anglo-saxons Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT), est initiée par le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), facteur de croissance essentiel à la fibrogenèse. Le rôle des cellules mésothéliales et plus généralement de la plèvre dans le FPI a été récemment évoqué. Notre équipe a déjà montré que lors d'une fibrose pleurale induite par la surexpression du TGF- β 1 par les cellules mésothéliales, le collagène s'accumule non seulement au niveau de la plèvre mais également dans la région sous-pleurale, comme observé lors de l'initiation de fibroses pulmonaires chez l'homme. Au cours de ce processus, les cellules mésothéliales subissent un EMT et migrent dans le parenchyme pulmonaire (11). Ces travaux ont permis pour la première fois de suggérer un rôle de la plèvre dans l'initiation de la FPI.

Pour lutter contre les agressions auxquelles elles sont soumises, les cellules développent des mécanismes de protection afin de maintenir leurs fonctions. La « réponse de choc thermique » a été mise en évidence en 1964 chez la drosophile par Ritossa (12, 13) et se caractérise par l'expression d'une famille de protéines particulières, les protéines de choc thermique (HSP). Les HSP sont des protéines cellulaires hautement conservées qui sont capables d'interagir avec des protéines matures et immatures, pour permettre leur repliement, leur stabilisation, leur transport vers les organites comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique, et leur renouvellement (14). Elles sont classées en six grandes familles en fonction de leur masse moléculaire : la famille des petites protéines de stress (sHSP (small HSP)), la famille d'HSP47, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110.

Les HSP sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires essentiels. Par exemple, plusieurs études ont montré que les HSP pourraient inhiber l'apoptose en interagissant avec des protéines impliquées dans ce processus, comme le cytochrome c, les caspases ou Apaf-1 (facteur apoptotique protéase activant 1) (15-18). Les HSP peuvent également être impliquées dans l'induction des cytokines (19), l'inflammation (20) et les maladies du cytosquelette (21).

Les HSP ont également été largement décrites comme impliquées dans la pathogenèse du cancer (22). Elles participent à plusieurs mécanismes moléculaires des cellules cancéreuses, tels que la prolifération (23), le caractère invasif (24) et l'angiogenèse (25, 26). Dans plusieurs rapports, les HSP sont apparues bénéfiques pour les cellules cancéreuses et donc délétères pour les patients atteints par un large éventail de types de cancer (27).

Le recrutement des cellules inflammatoires, la sécrétion abondante de cytokines profibrotiques, notamment le TGF- β 1, l'augmentation du stress oxydatif, et l'apoptose sont des événements importants au cours de la fibrogenèse et qui sont susceptibles d'impliquer les HSP.

Dans ce travail de thèse nous avons étudié la fibrose affectant l'appareil respiratoire à deux niveaux. Nous avons tout d'abord montré que la petite protéine de stress α B-crystallin était impliquée dans l'activation des mécanismes mis en jeu lors de la fibrogenèse pulmonaire notamment en facilitant la voie du TGF- β 1 et ainsi l'accumulation de MEC. L'inhibition de cette protéine pourrait déboucher sur de réels espoirs thérapeutiques. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle d' α B-crystallin dans le processus de fibrose pleurale en étudiant l'implication de cette protéine dans la transformation des cellules mésothéliales en cellules « agressives » et leur rôle dans la fibrogenèse pulmonaire.

ETAT DE LA QUESTION

Etat de la question

Dans cette partie nous allons décrire les principaux acteurs impliqués dans le processus de fibrogenèse. Nous décrirons les mécanismes généraux de la fibrose en insistant particulièrement sur le rôle du TGF- β 1 et de la matrice extracellulaire (MEC). Nous présenterons ensuite les protéines de choc thermique et leurs potentielles actions dans la fibrogenèse.

I- Les principaux acteurs de la fibrose

1- Mécanismes généraux de la fibrose

Les mécanismes de réparations tissulaires après une agression chronique et répétée impliquent généralement deux étapes distinctes : une phase régénérative au cours de laquelle les cellules affectées sont remplacées par de nouvelles cellules du même type, et une phase de fibrose ou de « cicatrisation », où le tissu d'origine est remplacé par du tissu conjonctif (MEC) (28, 29). Dans certaines conditions, encore peu connues ce mécanisme peut échapper à tout contrôle et devenir pathologique conduisant par exemple à la cirrhose, la fibrose rénale et la fibrose pulmonaire.

Quelque soit l'organe atteint, la fibrose se caractérise principalement par une accumulation disproportionnée ou un défaut de dégradation de matrice extracellulaire accompagnée d'un remodelage de l'architecture tissulaire. Bien qu'il existe des différences dans la pathogenèse de la fibrose en fonction de l'organe atteint, les grands mécanismes impliqués restent les mêmes (Figure 1 ; (28, 30)) :

- Lésion de la barrière épithéliale/endothéliale
- Sécrétion de cytokines inflammatoires et pro-fibrotiques
- Recrutement de cellules inflammatoires
- Stress oxydatif
- Synthèse de matrice extracellulaire
- Apoptose

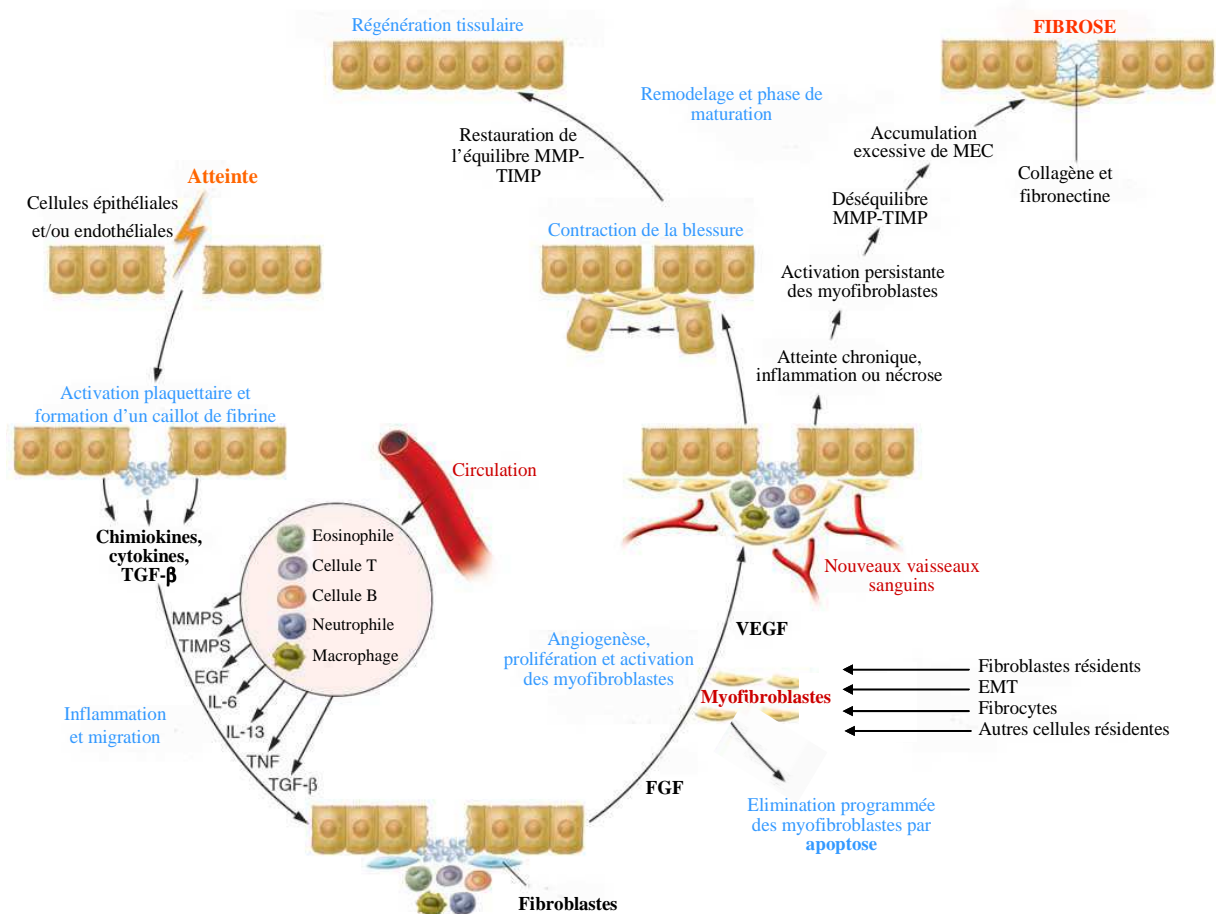


Figure 1 : Résultats de la cicatrisation : Régénération tissulaire ou fibrose.

Après une atteinte tissulaire, les cellules épithéliales et/ou les cellules endothéliales vont libérer des médiateurs de l'inflammation qui vont activer une cascade de réactions menant à la réparation tissulaire. Dans le cas d'une atteinte chronique, le processus normal est perturbé et la persistance d'un certain degré d'inflammation va induire une activation permanente des myofibroblastes. Ceux-ci vont produire un dépôt excessif de matrice extra-cellulaire et ainsi vont être responsables de la formation d'une fibrose (d'après Wynn *et al.*, 2007 (28)).

Les cellules épithéliales pulmonaires (pneumocytes) sont des composants cellulaires essentiels du tissu pulmonaire et sont responsables des échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires. Les lésions de ces cellules sont considérées par beaucoup comme l'évènement déclenchant du processus de fibrose. Les cellules endommagées vont libérer des cytokines et des chimiokines activant les voies de signalisation des cellules voisines qui vont, à leur tour, sécréter des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes comme le transforming growth factor (TGF)-β, le connective tissue growth factor (CTGF) ou encore le tumor necrosis factor (TNF)-α (31).

Les cellules épithéliales et endothéliales étant étroitement liées au sein du parenchyme pulmonaire, les lésions des pneumocytes peuvent induire l'apoptose des cellules endothéliales

(32, 33). L'atteinte des cellules endothéliales induit une perte de la fonction de barrière de l'endothélium mais aussi la sécrétion de nombreuses cytokines et facteur de croissance conduisant au recrutement de cellules inflammatoires sur le site de la lésion (34, 35). Les éosinophiles, lymphocytes, neutrophiles et macrophages recrutés vont participer à la fois à la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (36) qui contribuent à l'établissement de la fibrose (31). Mais ils vont également relarguer d'importantes quantités de cytokines pro-fibrosantes tel que IL-13 et TGF- β 1 (37, 38). C'est la mise en place de cet environnement cytokinique pro-fibrosant après des lésions répétées des cellules épithéliales et endothéliales qui peut transformer le processus de cicatrisation en processus de fibrose chronique. En effet, la production excessive et persistante de cytokines tel que TGF- β est à l'origine de la transformation des cellules pulmonaires (cellules épithéliales et fibroblastes) en cellules agressives productrices de MEC, les myofibroblastes. Au cours du processus de cicatrisation normal, ces cellules permettent la contraction du site de lésion empêchant sa progression et synthétisent également des facteurs favorisant la prolifération, la migration et la régénération des cellules épithéliales et endothéliales (29). Après recolonisation du site endommagé par de nouvelles cellules épithéliales et endothéliales, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose (39). Cependant lors du processus de fibrose, le phénomène d'inflammation chronique mis en évidence par de nombreux auteurs semble favoriser une activation permanente des myofibroblastes et une inhibition de leur apoptose. Il en résulte une production excessive et non contrôlée des composants de la MEC (acide hyaluronique, fibronectine, peptidoglycane et collagène) (29). Le processus fibrotique est ainsi favorisé à la fois par l'apoptose des cellules épithéliales conduisant au relargage de cytokines pro-fibrosantes tel que TGF- β 1 mais également par l'inhibition de l'apoptose des myofibroblastes produisant l'excès de MEC à l'origine de la pathologie. Ce « paradoxe » a été largement évoqué dans la littérature et l'action du TGF- β 1 a été mise en évidence (40, 41). Outre les ROS, la mort des cellules épithéliales passe notamment par la stimulation du récepteur Fas par son ligand FasL qui peut être induite par le TGF- β 1 (42). Au contraire, il a été montré que les myofibroblastes possèdent une résistance naturelle à l'apoptose induite par la voie Fas/FasL notamment grâce à une forte expression de facteur anti-apoptotiques tel que XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) et FLIP_L (Fas-like interleukin (IL)-1 β -converting enzyme-inhibitory protein) (43). Dans ce contexte, l'acquisition d'un phénotype résistant à l'apoptose par les myofibroblastes est, au moins en partie, due à la sécrétion d'un facteur de croissance soluble qui active la voie de survie PI3K-Akt (44). Les relations entre la MEC et les myofibroblastes sont aussi importantes pour l'activation des voies de survie et de prolifération de ces cellules

(45). La rigidité de la MEC peut favoriser l'activation de la voie integrin-FAK par le TGF- β 1 chez les myofibroblastes et conduire au phénotype résistant à l'apoptose observé en cas de fibrose (46).

Dans la suite de cette partie nous allons décrire plus en détail certains des éléments que nous avons particulièrement étudiés au cours de ce travail de thèse notamment la matrice extracellulaire, le TGF- β 1 et le myofibroblaste.

2- Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe et dynamique dans lequel se trouvent les cellules de tous les organes. Elle a longtemps été considérée comme un simple support mécanique pour les cellules, mais plus récemment, de nombreuses recherches lui confèrent un rôle important dans la transduction de signaux biologiques cruciaux pour la formation, le développement et la fonction des différents tissus et organes (47).

La MEC forme un gel composé de glycoprotéines, protéoglycanes, glycosaminoglycanes, protéines, ainsi que d'un réservoir de facteurs de croissances, cytokines, chemokines et protéases fixés au sein même de la matrice (48). Les composants protéiques majeurs de la MEC sont le collagène et l'élastine qui sont responsables de sa structure. Le collagène assure la résistance tissulaire aux déformations alors que l'élastine confère les propriétés d'extensibilité ce qui permet aux tissus de résister aux contraintes mécaniques répétitives. La fibronectine et la laminine sont également deux composantes protéiques importantes qui assurent l'adhérence cellules-MEC.

Il existe des liens étroits entre la MEC et les cellules. En effet, les composants de la matrice jouent un rôle important dans la transduction de divers signaux notamment par l'intermédiaire d'interactions avec les récepteurs de surfaces, telles que les intégrines, qui sont directement reliées aux cytosquelette d'actine intracellulaire (49). Ainsi, les récentes études semblent repousser la vision de la matrice comme un support inerte pour les cellules et considèrent la MEC comme un acteur fondamental dans les processus cellulaires incluant la différenciation, la prolifération, la migration et l'apoptose (49, 50).

a- Le collagène

Le collagène est la protéine principale constituant la MEC et représente environ un tiers des protéines totales chez les mammifères. Cette protéine assure un rôle essentiel dans la résistance des tissus face aux forces de tractions auxquelles ils sont soumis. Dans certains tissus comme les tendons, le collagène assure également un rôle dans l'élasticité tissulaire. Dans l'ensemble des autres organes, il constitue un réseau structural pour les cellules (51). A ce jour, 28 types différents de collagènes sont répertoriés chez les vertébrés même s'ils ne participent pas tous à la composition de la MEC.

Le collagène se caractérise par une répétition d'un triplet d'acides aminés spécifiques, Glycine-X-Y (Gly-X-Y), permettant la formation de chaînes polypeptidiques (les chaînes- α) qui s'associent pour composer une structure en triple hélice. Le résidu glycine est un élément invariant du triplet d'acides aminés et la majorité des mutations les plus dommageables du collagène conduisent au remplacement d'un résidu glycine à l'intérieur de la triple hélice (52, 53). Les autres positions (X et Y) du triplet peuvent être occupées par n'importe quel acide aminé mais la proline (Pro-28%) et l'hydroxyproline (Hyp-38%) sont privilégiées, conférant une structure plus rigide et plus stable aux fibres de collagène. Ainsi le triplet Pro-Hyp-Gly est le plus fréquent (10.5%) (54). Les chaînes- α sont produites sous forme de procollagène par les cellules puis excrétées dans le milieu extracellulaire où les triples hélices, nommées tropocollagène, s'assemblent pour former des complexes organisés conduisant à la structure macromoléculaire du réseau de collagène. Les types de collagène sont divisés en six groupes selon le mode d'assemblage des hélices de tropocollagène entre elles. Les collagènes les plus fréquents sont les collagènes I à IV :

- Le collagène de type I se trouve essentiellement dans la peau, les tendons, les os (armatures), la cornée et les organes internes.
- Le collagène de type II représente plus de 50% des protéines du cartilage.
- Le collagène de type III est présent dans les tissus hématopoïétiques, les muscles squelettiques et les parois des vaisseaux sanguins.
- Enfin le collagène de type IV est spécifique des lames basales dans lesquelles il forme un réseau.

Bien que les différents types de collagène soient spécifiques de tissus particuliers, en condition pathologique certains tissus expriment des types de collagène qu'ils ne leurs sont pas propres. La persistance de la surproduction de collagène de type I, ainsi que des autres macromolécules de tissus conjonctifs par les fibroblastes menant à un dépôt excessif de tissus

dans les organes lésés, est la conséquence d'une altération du contrôle de régulation de l'expression génique. Cette dérégulation semble être un événement crucial dans le développement de la fibrose (55).

b- Production et renouvellement de la MEC : Balance MMP/TIMP

Les types de collagène prédominant dans le tissu pulmonaire normal ou fibreux sont les collagènes de type I et III. Les poumons atteints de fibrose produisent deux à trois fois plus de composants de la matrice que les poumons sains, comme les collagènes I et III mais également la fibronectine, l'élastine et les peptidoglycanes (56). Cependant, la seule surproduction d'éléments de la matrice ne peut pas nécessairement expliquer l'accumulation de MEC observée lors du processus de fibrose. En effet, l'accumulation de MEC fait intervenir deux mécanismes : d'une part l'augmentation de la synthèse des composants de la matrice et, d'autre part, l'altération du processus de dégradation de ceux-ci.

Si un large nombre de types cellulaires sont capables de synthétiser les macromolécules matricielles, les fibroblastes et les myofibroblastes (fibroblastes exprimant l' α -Smooth Muscle Actin ou α -SMA), que nous développerons ultérieurement dans cette partie, en sont les producteurs majeurs au niveau du poumon en condition normale et pathologique (57).

Le dépôt excessif de MEC peut également être lié à un défaut de dégradation des composants de la matrice. Le renouvellement des macromolécules matricielles est rapide, constant et implique deux grandes familles de protéines : les métalloprotéinases matricielles (MMPs ; matrix metalloprotease) qui dégradent la MEC et les « tissu inhibitor metalloproteases » (TIMPs), inhibiteurs naturels des MMPs (58).

Les MMPs sont des endopéptidases dépendantes principalement du zinc et capables de dégrader tous les composants de la MEC. Cependant les MMPs ne sont pas exclusives à la matrice et peuvent dégrader d'autres éléments extérieurs à celle-ci. Par leur fonction protéolytique, elles peuvent affecter l'adhérence des cellules à la matrice, et peuvent être impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques y compris le développement embryonnaire, la morphogenèse, le remodelage des os, la cicatrisation, le cancer, l'asthme et la fibrose pulmonaire (56, 59). Elles sont également importantes pour le relargage des fragments bioactifs de molécules de la matrice extracellulaire et des cytokines « piégées » dans la MEC, fournissant des signaux dans le microenvironnement des cellules (59, 60). A ce jour, 24 MMPs ont été décrites chez les vertébrés. Historiquement, les MMPs étaient divisées en collagénases, gélatinases, stromélysines et matrilysines sur la base de leur

spécificité pour les composants de la MEC. Avec l'augmentation du nombre de leurs substrats elles sont actuellement classées en fonction de leur structure et elles sont désignées par le sigle MMP suivi d'un chiffre (59, 61). Il existe huit types structuraux différents de MMPs parmi lesquels cinq donnent des MMPs qui seront secrétées et trois constituent les MMPs trans-membranaires. La majorité des MMPs partagent des domaines conservés : le domaine catalytique incluant un site de fixation du zinc, une séquence d'acides aminés en N-terminal dirigeant les MMPs vers le réticulum endoplasmique suivi d'une propeptide contenant un résidu -SH, interagissant avec le site catalytique (zinc) et permettant le maintien des MMPs sous forme de pro-MMP inactives. La plupart des MMPs ont également un « domaine hémapexine » permettant une interaction avec les TIMPs, leurs inhibiteurs. Les MMPs sont secrétées sous forme de pro-enzymes inactives nécessitant, pour être activées, le clivage du propeptide N-terminal (10 kDa) (62). Cette activation par clivage du propeptide met en jeu généralement d'autres MMPs déjà activées mais également d'autres protéases à sérine (63). Une autre voie de régulation des MMPs réside dans l'action des TIMPs. Il existe quatre membres de la famille des TIMPs (TIMP-1 à TIMP-4) capables d'inhiber les MMPs avec des spécificités différentes. Leur expression, ainsi que celle des MMPs est finement régulée afin de maintenir un équilibre entre activation et inhibition de la protéolyse de la MEC (Figure 2). En effet, la dérégulation de la balance TIMP/MMP peut conduire soit à une dégradation trop importante de la matrice soit à un dépôt excessif de celle-ci conduisant à la fibrose (59).

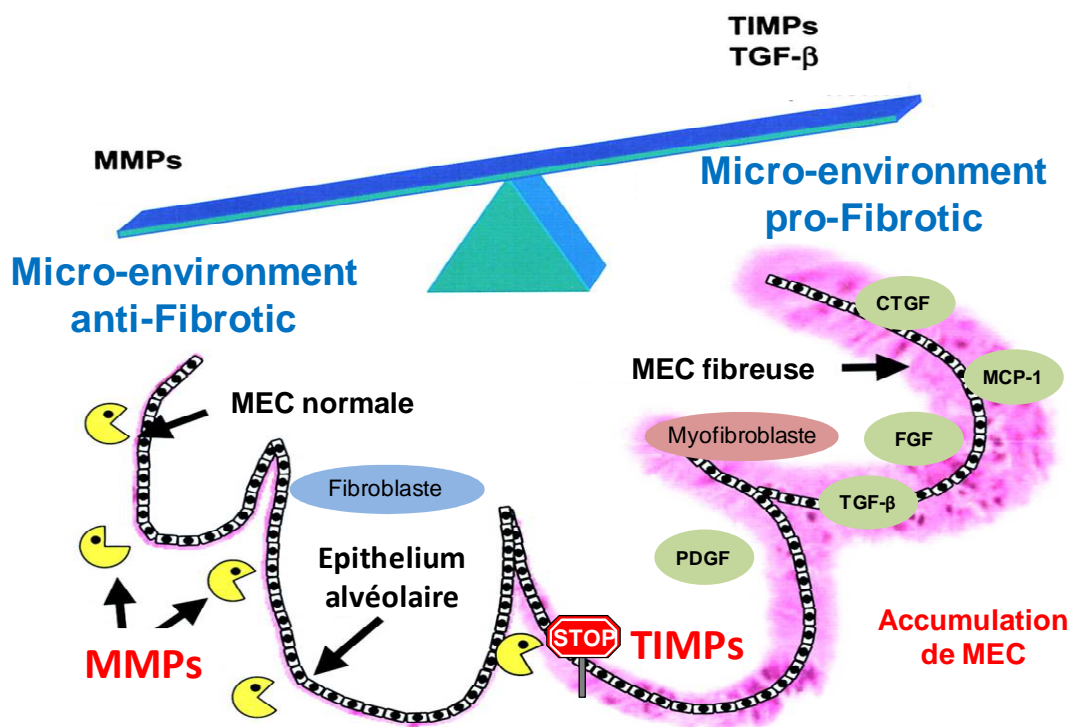


Figure 2 : L'homéostasie de la matrice extra-cellulaire : la balance MMPs/TIMPs

La conservation d'un équilibre entre les MMPs et les TIMPs est essentielle au maintien d'un tissu pulmonaire sain. Une augmentation du ratio TIMPs/MMPs induit un environnement profibrotique (d'après Cook *et al.*, 2002 (64)).

c- MMP et TIMP dans la fibrose pulmonaire

Il a longtemps été considéré qu'un défaut de dégradation de la matrice, donc un défaut d'expression et d'activation des MMPs, expliquait l'accumulation de matrice lors de la fibrose pulmonaire. Cependant, plusieurs études révèlent que cette vision est bien trop simplifiée puisque la majorité des MMPs semblent surexprimées chez les patients atteints de FPI (65). Même si ce constat semble paradoxal au premier abord, il peut être expliqué par la grande variété des substrats et des fonctions des MMPs.

MMP-7 constitue la métalloprotéinase la plus souvent évoquée comme étant surexprimée au cours de la FPI. Elle est considérée comme pro-fibrotique par son action sur la libération des cytokines, notamment le TGF- β 1, « piégées » au sein de la matrice entraînant une activation des fibroblastes contribuant au dépôt de collagène (66).

De nombreuses études ont également montré que MMP-1 était surexprimée au cours de la FPI (67). Cependant, elle était retrouvée majoritairement au niveau de l'épithélium et non de

l'interstitium où se trouve le collagène suggérant un rôle annexe de la MMP-1 sur les cellules épithéliales plutôt que sur la dégradation des macromolécules matricielles dans ce contexte. De plus, ces études montrent une augmentation parallèle des inhibiteurs de MMP-1 limitant grandement son activité de dégradation de la MEC.

MMP-2 et MMP-9 sont deux gélatinases fortement impliquées dans le processus de fibrose pulmonaire. MMP-9 est produite par les cellules inflammatoires comme les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les lymphocytes et parfois par les cellules endothéliales et épithéliales. Son activation semble prédominante à un stade précoce du processus. MMP-9 contribue vraisemblablement à la dégradation de la membrane basale favorisant l'invasion des fibroblastes producteurs de MEC dans l'espace alvéolaire (68). MMP-2 semble avoir également un effet sur la dégradation de la membrane basale et pourrait avoir un rôle plus tardif sur la régénération des cellules épithéliales alvéolaires (59).

MMP-8 est produite majoritairement par les neutrophiles et son expression au cours de la FPI est corrélée avec un mauvais pronostic (65). Le rôle majeur de MMP-8 lors du processus de fibrose est la favorisation du recrutement des fibroblastes favorisant l'accumulation de MEC. Cependant, dans un modèle de fibrose pulmonaire chez le rat, Ruiz *et al.* ont montré que l'expression de MMP-8 et MMP-13 était diminuée en corrélation avec une augmentation de TIMP-1 (69).

En parallèle aux diverses actions des MMPs sur la fibrose pulmonaire, de nombreuses études montrent une augmentation d'expression des TIMPs chez les sujets atteints de FPI (70-72). L'étude de la balance MMP/TIMP semble donc primordiale pour expliquer l'établissement d'un environnement favorable à l'accumulation de MEC, plutôt que l'expression individuelle de chaque MMP ou TIMP.

d- Rôle actif de la matrice dans la fibrogenèse

La matrice extracellulaire interagit avec les cellules pour influencer leur adhésion, leur prolifération, leur migration et leur survie. A leur tour, les cellules interfèrent avec la MEC pour influencer sa composition et sa conformation. Dans les tissus sains, la matrice procure un environnement optimal pour les fonctions cellulaires normales. L'interaction cellules-MEC se fait via des récepteurs transmembranaires, telles que les intégrines, qui assurent à la fois un support mécanique pour les cellules mais aussi un point d'échange et d'information entre les cellules et leur environnement. L'interaction des composants de la MEC avec ces récepteurs, peut influencer le comportement des cellules. Ainsi une modification de la composition de la

MEC pourra être « ressenti » par les cellules et modifiera leurs fonctions (48). La fibrose peut être vue comme le résultat d'une série de changement de la MEC (28). Les cellules répondent aux changements mécaniques et biochimiques de la matrice, grâce à l'interaction entre les intégrines et le cytosquelette d'actine intracellulaire. Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent être combinées selon 24 combinaisons différentes (49). Ces dimères sont capables de lier différents éléments de la MEC selon les sous-unités les constituant (73). Ainsi, la nature des intégrines exprimées par une cellule dicte sa capacité à interagir avec telle ou telle macromolécule matricielle, conduisant à l'activation de voies de signalisation spécifiques. L'adhésion des composants de la MEC sur les intégrines et la signalisation induite via le cytosquelette d'actine dans les cellules peuvent réguler de nombreuses fonctions cellulaires primordiales lors de la fibrogenèse, comme la migration des cellules immunitaires et des fibroblastes mais aussi l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire.

La MEC constitue également un énorme réservoir de cytokines. Le remodelage de la matrice lors de la fibrogenèse perturbe l'équilibre entre MEC et cytokines entraînant un relargage massif et une activation de cytokines comme le TGF- β 1, cytokine au fort pouvoir pro-fibrosant. La plupart des protéines de la MEC ont des sites de fixation pour les intégrines et pour les cytokines ce qui favorise une concentration de ces dernières au niveau de la surface des cellules, proches de leurs récepteurs. Le TGF- β 1 est lié à la MEC de façon covalente dans sa forme latente par la Latent TGF- β 1 binding protein (LTBP)-1 (74, 75). La forme active du TGF- β 1 peut être libérée par le remodelage et l'augmentation de la rigidité de la MEC au cours du processus de fibrose. Cette libération entraîne une fixation accrue du TGF- β 1 sur ces récepteurs conduisant à une activation d'une signalisation cellulaire pro-fibrosante comme nous allons le décrire dans le chapitre suivant.

3- Transforming Growth Factor- β 1

La dérégulation de l'environnement cytokinique est un facteur clé dans l'établissement de la fibrose pulmonaire. Même si le rôle exact de l'inflammation dans le processus fibrosant reste discuté au sein de la communauté scientifique, il semble clair que les médiateurs inflammatoires jouent un rôle dans la phase précoce conduisant à la fibrose (76). En effet, la forte production des cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α et l'interleukine-1 β (IL-1 β) lors des lésions épithéliales, contribue à l'initiation et la progression de la fibrose (77, 78).

Ces cytokines vont initier le processus inflammatoire en stimulant les fibroblastes qui vont à leur tour produire des chimiokines comme IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) et des facteurs de croissance comme IL-6, GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et FGF (Fibroblast Growth Factor) (79). Ces facteurs favorisent le recrutement de cellules inflammatoires, notamment les macrophages, qui vont sécréter des facteurs de croissance comme PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), CTGF et surtout TGF- β (80). De toutes ces cytokines, le TGF- β 1 est manifestement la molécule pro-fibrosante essentielle et apparaît être par conséquent un médiateur pivot du processus fibrosant (81).

a- Structure

Trois isoformes du TGF- β ont été identifiées chez les mammifères : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Ces isoformes ont une structure presque identique et sont codées par trois gènes distincts hautement conservés, témoignant du rôle essentiel joué par la famille du TGF- β . La molécule active du TGF- β est un homodimère de deux peptides de 12,5 kDa reliés par une liaison sulphidryl pour former une molécule de 25 kDa (TGF- β _{1.1}, β _{2.2} ou β _{3.3}). Des hétérodimères (par exemple TGF- β _{1.2} et β _{2.3}) peuvent également se former (82). Ces formes atypiques sont plus rares et ont des fonctions différentes des homodimères classiques.

Les membres de la famille du TGF- β sont considérés comme des molécules pléiotropiques multifonctionnelles, composés de nombreuses cytokines dont le TGF- β , les activines, les « bone morphogenetic proteins » (BMP) et la myostatine. Ces facteurs peuvent réguler de manière soit positive soit négative différents processus biologiques comme la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire, en fonction de l'environnement cellulaire et du stade de développement et de différenciation des cellules cibles (82). La signalisation des trois isoformes du TGF- β passe par les mêmes récepteurs membranaires et elles ont quasiment les mêmes cibles cellulaires. Bien que leurs effets *in vitro* soient similaires, leur action *in vivo* est bien distincte (83-85). Des études sur la perte de fonction d'une ou l'autre isoforme montrent qu'elles jouent un rôle bien différent dans le développement embryonnaire et qu'elles n'ont pas d'effets compensatoires (86). Bien que les trois isoformes soient exprimées au cours de la fibrogenèse, il a été montré que le développement initial de la fibrose était bien dû au TGF- β 1. En effet, l'administration de TGF- β 1 grâce à des adénovirus au sein du parenchyme pulmonaire entraînait une fibrose sévère et progressive, contrairement à l'administration de TGF- β 3 seulement initiateur d'une fibrose transitoire (87).

Le TGF- β est synthétisé sous forme de précurseur inactif (pre-pro-peptide) de 392 aminoacides. L'obtention du TGF- β actif nécessite deux étapes de clivage successives (88). Un peptide signal hydrophobe situé à l'extrémité N-terminale du pre-pro-peptide est clivé dans l'appareil de Golgi par des protéases de type furine (89). Le fragment C-terminal (aminoacides 280-392), qui constitue le TGF- β 1 mature, reste attaché au pro-peptide N-terminal, appelé « Latency Associated Peptide » (LAP), par des interactions non covalentes. Après sa synthèse, le TGF- β est sécrété par les cellules sous forme de complexes inactifs. Deux types de complexes ont été décrits : le « Small Latent Complexe » (SLC) dans lequel une molécule active de TGF- β est liée de manière non covalente à un dimère de peptide LAP, eux mêmes liés par des ponts disulfures ; et le « Large Latent Complexe » (LLC) dans lequel le complexe TGF- β /LAP est lui-même lié à une protéine d'environ 125 kDa, la « Latent TGF β -Binding Protein » (LTBP) (82, 90). La LTBP permet au complexe TGF- β /LAP de se fixer aux composants de la MEC, comme la fibronectine et l'élastine, où il sera stocké. Le relargage du TGF- β inactif de la MEC peut être initié par les protéases comme l'élastase et la plasmine qui peuvent cliver la LTBP. Le TGF- β sécrété sera ainsi conservé sous sa forme latente en concentration relativement élevée prêt à être activée en cas de nécessité (91-93). Comme l'affinité du TGF- β avec ses récepteurs est très grande, l'activation d'une faible quantité de TGF- β génère rapidement une réponse cellulaire maximale (84).

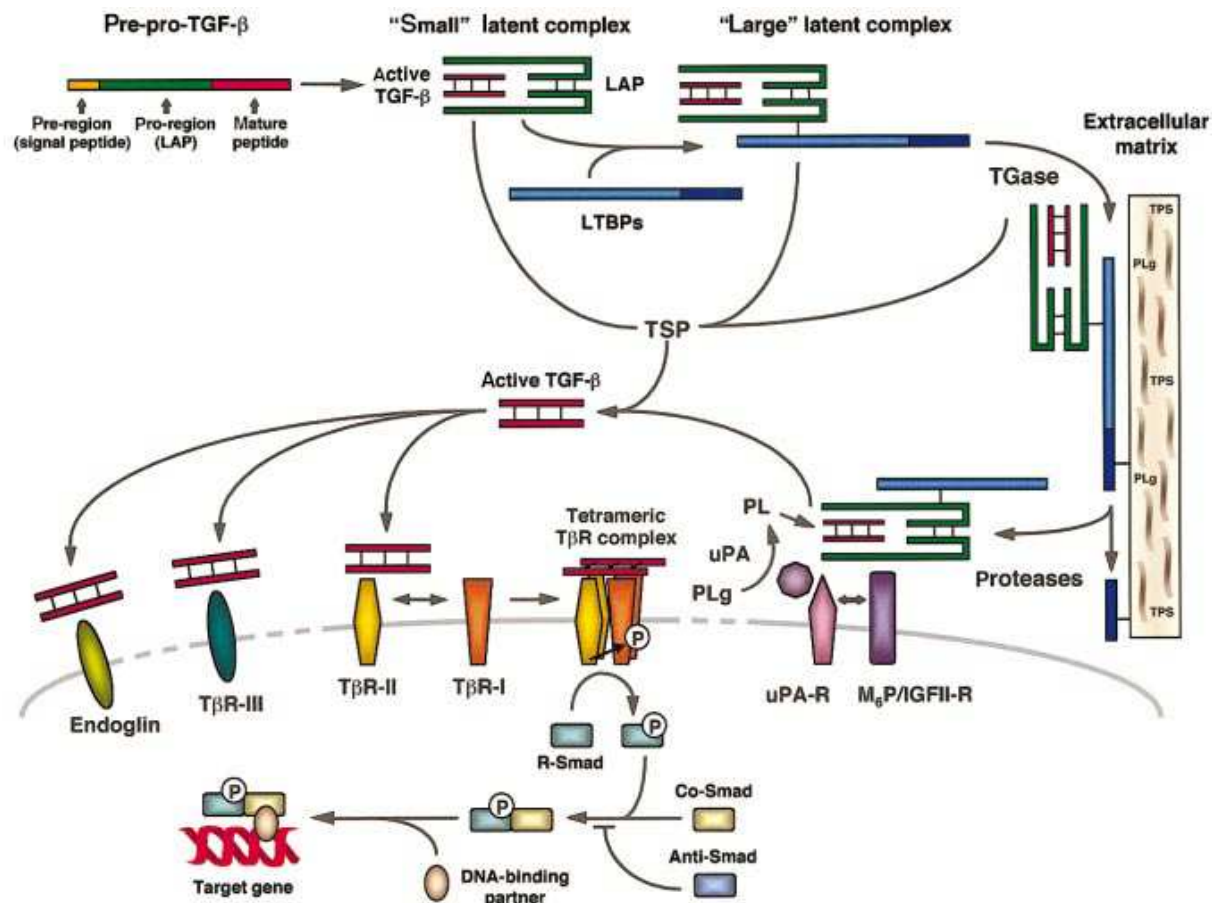


Figure 3 : TGF-β : Structure, activation et récepteurs

Après clivage du pré-peptide, le TGF-β est sécrété sous forme inactive lié au peptide LAP formant le « Small Latent Complexe » (SLC). Le TGF-β actif est libéré du SLC par rupture des liaisons non-covalentes entre TGF-β et LAP sous des conditions de stress cellulaire. Un « Large Latent Complexe » (LLC) peut se former via la liaison de la protéine LTBP au SLC. LTBP ancre le LLC à la MEC pour former un réservoir de TGF-β qui sera libéré dans des conditions conduisant à un remodelage ou une dégradation de la MEC. Une fois activé, le TGF-β se lie à ses différents récepteurs trans-membranaires pour initier la cascade de signalisation intracellulaire (d'après Fortunel *et al.*, 2000 (88)).

b- Activation du TGF-β

L'activation des complexes latents (SLC et LLC) est une étape cruciale pour la régulation des fonctions du TGF-β. Dans le SLC, l'interaction non covalente entre TGF-β et LAP empêche la liaison du TGF-β à ses récepteurs (91). *In vitro*, la dissociation du complexe peut se faire par de nombreux stimuli qui induisent la dénaturation des protéines, y compris les conditions extrêmes de température ou de pH et l'exposition aux oxydants ou des rayonnements ionisants. La libération de la molécule de TGF-β actif peut également être effectuée par différentes protéases qui rompent l'interaction LAP/TGF-β.

L'activation du LLC passe par une étape préalable de dissociation du complexe et de la MEC sous l'action de protéases comme la plasmine. Plusieurs mécanismes d'activation, présentés en Figure 3, ont été proposés dans la littérature.

La plasmine peut interagir avec la région N-terminale du peptide LAP et ainsi perturber les interactions TGF- β /LAP libérant la forme active du TGF- β (94). Dans les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales, deux types de récepteurs ont été impliqués, le « mannose-6-phosphate/type II insulin-like growth factor receptor » (M6P/IGFII-R) et « l'urokinase plasminogen activator receptor » (uPA-R). Ces deux récepteurs ont un rôle synergique induisant l'activation du TGF- β . En effet, M6P/IGFII-R et uPA-R forment un complexe membranaire qui peut lier le LLC (via M6P/IGFII-R) et la plasmine générée localement (via uPA-R) et va permettre la libération du TGF- β actif (Figure 3).

Les intégrines sont également largement impliquées dans l'activation du TGF- β (95). La majorité des intégrines se lie à leurs ligands par une séquence RGD (Arg-Gly-Asp). Cette séquence est retrouvée dans le peptide LAP, ce qui facilite la liaison et l'activation du TGF- β par principalement deux intégrines, $\alpha\beta6$ et $\alpha\beta8$, *in vitro* (96). Les intégrines peuvent activer le TGF- β via deux mécanismes : un mécanisme protéase dépendant ($\alpha\beta8$) et un mécanisme protéase indépendant ($\alpha\beta6$).

L'intégrine $\alpha\beta6$, dont la partie cytoplasmique de la sous-unité $\beta6$ est liée au cytosquelette d'actine, est la première à avoir été impliquée dans l'activation du TGF- β . Les études suggèrent que l'action d' $\alpha\beta6$ se fait grâce à l'encrage et la formation d'un complexe $\alpha\beta6$ /TGF- β à la surface des cellules. Des stimuli impliquant un remodelage du cytosquelette d'actine perçus par $\alpha\beta6$ peuvent induire un changement de conformation de l'intégrine et conduire à l'activation du TGF- β via ce complexe. Il a été montré que la mutation du domaine $\beta6$ abolit l'activation du TGF- β médiée par l'intégrine (95). En outre, dans les cellules dépourvues de LTBP-1, $\alpha\beta6$ ne peut pas activer le TGF- β . L'activation du TGF- β par $\alpha\beta6$ dépend donc essentiellement de l'association du TGF- β latent avec la LTBP et $\alpha\beta6$ (97). *In vivo*, ce mécanisme peut être d'une grande importance lors du processus fibrosant. Il a en effet été montré, que les souris Knock-Out (KO) pour l'intégrine $\alpha\beta6$ sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Le traitement de souris Wild Type (WT) à la bléomycine entraîne une surexpression des intégrines à la surface des cellules pulmonaires causant une plus forte activation du TGF- β et par conséquent une fibrose pulmonaire (95).

L'intégrine $\alpha\beta8$ peut également lier et activer le TGF- β , mais le mécanisme mis en jeu est différent. L'activation du TGF- β par $\alpha\beta8$ n'est pas dépendante de la contraction du

cytosquelette mais permet une exposition du complexe TGF- β /LAP à des protéases. En effet, à la surface des cellules, $\alpha\beta 8$ co-localise avec MMP14. Par conséquent, le TGF- β latent est présenté à la MMP-14 par l'intégrine $\alpha\beta 8$, ce qui se traduit par le clivage protéolytique de la LAP et la libération du TGF- β actif (96, 98).

Enfin, les MMP-2 et MMP-9 peuvent également cliver et libérer le TGF- β latent de la MEC via leur activité de gélatinase (83).

c- Rôle du TGF- β

Les souris KO pour le TGF- β ne présentent pas de trouble de développement embryonnaire important mais elles présentent très tôt des signes d'inflammation majeurs et létaux. Ainsi, TGF- β apparaît comme un régulateur essentiel du système immunitaire. De plus, 50% des foetus de souris TGF- β $-/-$ présentent des signes d'anémie sévère dus à un nombre très faible d'érythrocytes suggérant un rôle du TGF- β dans l'hématopoïèse.

Outre son action dans les processus de cicatrisation, l'angiogenèse, la formation de la peau et l'inflammation, le TGF- β est aussi fortement connu pour son rôle crucial dans la fibrogenèse. Comme déjà décrit précédemment, la réparation tissulaire implique une séquence d'évènements biologiques débutant par une infiltration de cellules inflammatoires et de fibroblastes, la formation d'une nouvelle MEC et de nouveaux vaisseaux sanguins et enfin par la prolifération de cellules pour reconstituer le tissu lésé. Le TGF- β , et plus particulièrement le TGF- $\beta 1$, est impliqué dans tous ces évènements. Les plaquettes contiennent de fortes concentrations de TGF- $\beta 1$ qui vont être libérées sur le site de la lésion. A des concentrations de l'ordre du femtomolaire, le TGF- $\beta 1$ sera fortement chimio-attractant pour les neutrophiles, les cellules T, les monocytes et les fibroblastes. Une fois arrivées sur le site lésé, ces cellules seront activées par les concentrations en TGF- $\beta 1$ plus élevées (picomolaire) auxquelles elles seront soumises. Les monocytes vont alors produire les cytokines profibrosantes FGF, TNF, IL-1 et les fibroblastes vont produire la MEC (92). Les cellules infiltrées mais aussi les cellules résidentes (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes résidents) vont, au contact du TGF- β , produire à leur tour du TGF- β augmentant ainsi son action. Cette boucle d'amplification du TGF- β semble jouer un rôle déterminant dans la progression de la fibrose (92).

En outre, bien que les mécanismes conduisant à la FPI soient encore méconnus, il semble que l'activation du TGF- $\beta 1$ latent soit une caractéristique de la progression de la pathologie. En effet, dans les poumons de patients souffrant de FPI, un taux significativement plus fort de

TGF- β 1 actif est relevé comparativement à celui trouvé chez des sujets sains. Le taux de TGF- β 1 total synthétisé est par contre sensiblement le même (99).

d- Les récepteurs

Au niveau extracellulaire, la signalisation du TGF- β passe par des récepteurs transmembranaires. Il existe deux types principaux de récepteurs, type I et type II (T β R-I ou ALK, et T β R-II), qui représentent deux familles de récepteurs transmembranaires de type serine/thréonine kinase capable d'interagir pour former des complexes hétérotetramériques. Il existe plusieurs formes pour chaque récepteur variant de 53 à 65 kDa pour T β R-I et de 80 à 95kDa pour T β R-II. Cependant, en absence de ligand, les récepteurs sont sous forme homodimérique (100, 101). Les mécanismes de transduction du signal par T β R-I et T β R-II sont aujourd'hui bien connus (102). La première étape d'activation de la voie de signalisation consiste en la fixation du TGF- β sur un homodimère du récepteur T β R-II qui possède un domaine kinase actif de manière constitutive. Cette fixation entraîne le recrutement et la phosphorylation d'un homodimère du récepteur T β R-I au sein du complexe TGF- β /T β R-II pour former un complexe hétérotetramérique, base de l'activation de la voie du TGF- β (Figure 3). C'est la phosphorylation du T β R-I qui permet la propagation du signal à d'autres substrats intracellulaires via une cascade de phosphorylation. Les multiples formes des récepteurs de type I et II suggèrent que les différentes formes homo- ou hétérodimériques du TGF- β (TGF- β _{1.1}, β _{2.2}, β _{3.3}, β _{1.3}, β _{1.2}, β _{2.3}) et les autres membres de la famille du TGF- β (activines, BMP, myostatine) peuvent induire une réponse différente en interagissant avec différentes formes de complexes hétérotetramériques avec chacune leur propre capacité de transduction du signal (103).

D'autres récepteurs du TGF- β , non nécessaires à la transduction du signal, peuvent être exprimés à la surface cellulaire. Le récepteur de Type III (T β R-III ou β glycan) et la glycoprotéine Endoglin servent de régulateurs pour les autres récepteurs de type I et II (Figure 3). Plusieurs éléments montrent une fonction différente de ces deux récepteurs annexes. D'abord, le β glycan peut interagir avec les TGF- β 1, β 2 et β 3 alors que l'interaction entre l'Endoglin et TGF- β 2 ne peut pas avoir lieu. De plus, le rôle du β glycan pourrait être de favoriser la liaison entre TGF- β et le récepteur T β R-II alors que l'expression de l'Endoglin semble diminuer la signalisation du TGF- β . Enfin, la distribution cellulaire des deux récepteurs annexes est différente ce qui permet aux différents types cellulaires une réponse spécifique au TGF- β en fonction des récepteurs exprimés à leur surface (104).

Dans la fibrose pulmonaire, les récepteurs les plus impliqués sont le récepteur de type II, T β RII, et le récepteur de type I, T β RI (Alk5). En effet, des études ont montré que l'inhibition d'Alk5 par des molécules bloquantes empêchait le TGF- β 1, administré dans les poumons par injection intra-trachéale par l'intermédiaire d'adénovirus, d'induire une fibrose (105).

Le TGF- β 1 inhibe normalement la prolifération des cellules épithéliales. Cependant, chez les patients souffrant de FPI, l'expression d'Alk5 par les cellules épithéliales est diminuée, inhibant ainsi l'effet bénéfique du TGF- β 1 sur leur prolifération. La baisse de l'expression d'Alk5 permettra une réparation et une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales. Toutefois, T β R-II ainsi qu'Alk5 sont surexprimés à la surface des fibroblastes, cellules responsables de l'accumulation de MEC, permettant leur activation et leur prolifération (99).

4- Les Smad

Après l'activation du T β R-I, la majeure partie de la signalisation intracellulaire de la voie du TGF- β passe par une famille de protéines, les Smad (mothers against decapentaplegic homolog).

a- Voie de signalisation des Smad

Cette famille de protéines joue un rôle central dans la transduction du signal des récepteurs jusqu'aux gènes cibles dans le noyau (Figure 4). Jusqu'à présent, huit membres de la famille ont été identifiés, qui, sur la base de différences structurales et fonctionnelles, ont été subdivisés en trois groupes: (1) les Smad associées aux récepteurs (R-Smad) sont les substrats directs des récepteurs de la famille du TGF- β (Smad1, 2, 3, 5, 8), (2) les Smad co-régulateurs (Smad4), et (3) les protéines Smad inhibitrices (Smad6, 7) qui ont un rôle antagoniste de la fonction de signalisation des R- et Co-Smad (85). Parmi les R-Smad : Smad1, Smad5 et Smad8 sont des substrats pour les récepteurs de type BMP tandis que Smad2 et Smad3 sont des substrats du T β R-I (106). Les R-Smad peuvent interagir directement avec le récepteur T β R-I activé et sont ensuite phosphorylées sur deux résidus sérines dans un motif conservé, SSXS en C-terminale. Le recrutement de Smad2 et Smad3 au niveau du récepteur activé, est facilité à la fois par la présence d'une protéine d'ancrage, SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), qui interagit directement avec les R-Smad et avec le T β R-I (107), et par le réseau

de microtubules intracellulaires contrôlant la localisation subcellulaire des R-Smad. Une fois phosphorylées, les R-Smad associées sous forme de complexes hétérodimériques (Smad2/3) sont capables de se fixer à la Co-Smad, Smad4. Smad4 permet la translocation du complexe Smad2/3/4 dans le noyau pour initier l'activation des gènes cibles de la voie du TGF- β (108, 109), mécanisme que nous détaillerons plus loin dans cette partie.

La régulation de la voie des Smad passe par l'activation des I-Smad. En effet, ils ont la capacité de se lier de manière très stable au récepteur T β R-I et d'entrer en compétition avec Smad4 afin d'empêcher à la fois la phosphorylation des R-Smad sur leur récepteur mais aussi leur interaction avec Smad4 (110). Smad7 peut également interagir avec les E3 ubiquitine ligases Smurf1 et 2, et induire leur recrutement au niveau du T β R-I. Les protéines Smurf induisent l'ubiquitination du T β R-I conduisant à sa dégradation par le protéasome et inhibant la voie du TGF- β (111).

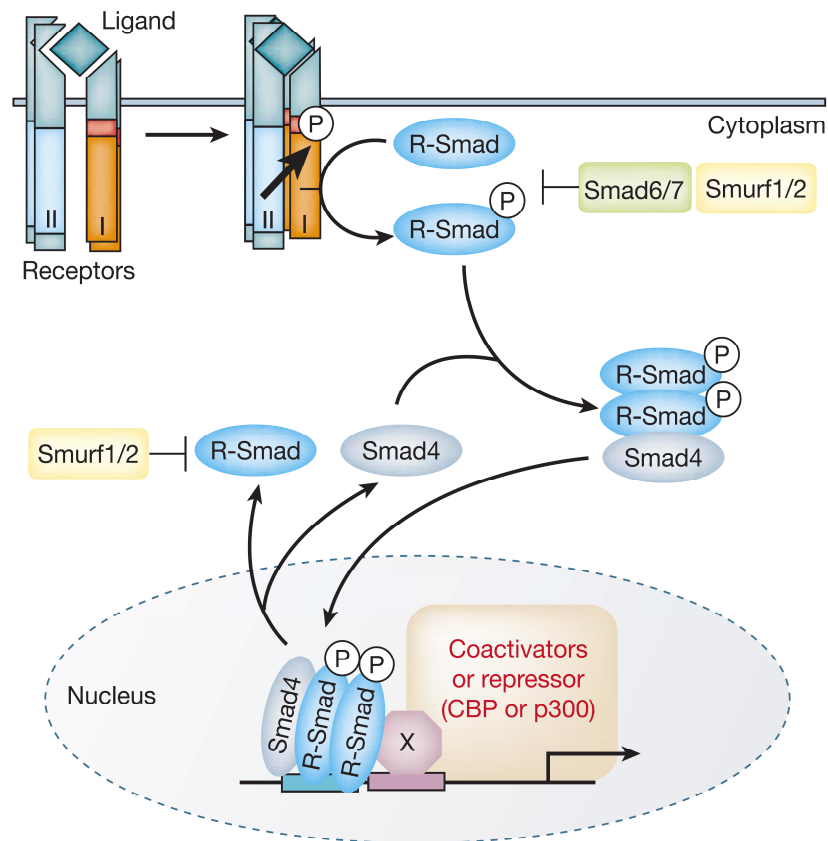


Figure 4 : Mécanisme général de la voie des Smad.

Le ligand se fixe à la surface des cellules aux récepteurs sérine/thréonine kinase (type I et II) ce qui induit la transphosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II. Ce récepteur phosphorylé active alors les R-Smad qui forment un complexe avec la co-Smad (Smad4) afin de permettre leurs translocations dans le noyau. C'est dans le noyau que ce complexe se fixera à l'ADN et activera, en coopération avec des co-activateurs, la transcription de gènes cibles (d'après Derynck *et al.*, 2003 (112)).

b- Fonction nucléaire des Smad.

Les R-Smad et les Co-Smad sont caractérisées par deux domaines N-terminal et C-terminal hautement conservés, MH1 et MH2 (homology MAD domains), et une région de liaison variable en longueur et en séquence. Le domaine MH2 des R-Smad contient le site de phosphorylation -SSXS-. La phosphorylation entraîne un changement conformationnel qui dissocie les deux domaines et permet la cascade de signalisation (Figure 5). Le domaine MH2 assure aussi les liaisons protéines-protéines entre les R-Smad et le T β R-I, Smad4 mais aussi divers co-activateurs et régulateurs de transcription. Une fois dans le noyau, le domaine MH1 sert à la liaison des R- et Co-Smad à l'ADN (112, 113).

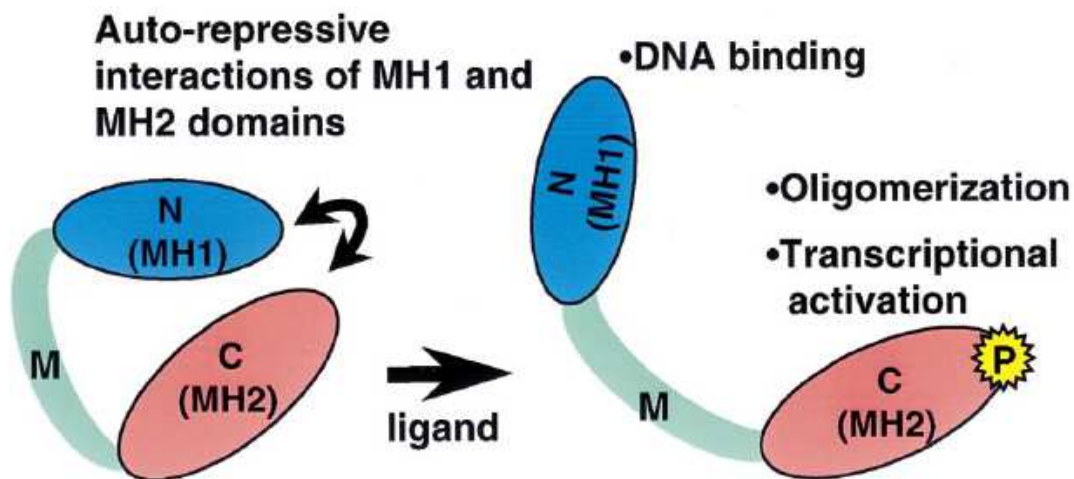


Figure 5 : Structure des deux domaines des R-Smad.

La phosphorylation au niveau du motif -SSXS- du domaine MH2 entraîne un changement de conformation des R-Smad, permettant l'activation de leur fonction de liaison à l'ADN et aux protéines co-activatrices et co-répressives de la transcription (d'après Roberts *et al.*, 1999 (108)).

Cette interaction se fait via une courte séquence (Smad Binding Element ; SBE) de nucléotides, 5'-AGAC-3'. La structure aux rayons X du domaine MH1 de SMAD3 montre qu'un motif β -hairpin (deux brins courts anti-parallèles séparés par une boucle de liaison) dans le domaine MH1 permet cette interaction MH1-SBE (113). Cependant, la faible spécificité des Smad pour se lier à l'ADN, nécessite des co-activateurs tels que CBP (CREB (cAMP response element-binding)-Binding Protein), p300, sp1 ou encore SKI-interacting protein (SKIP) qui sont des protéines nucléaires. L'interaction des Smad avec ces co-activateurs va augmenter l'activation de certains promoteurs dépendants de la voie du TGF- β (112, 114). A l'inverse, des co-represseurs tels que c-Ski et SnoN (Ski-related novel gene)

vont réprimer des promoteurs dépendants du TGF- β en se fixant aux Smad (115). L'ensemble de ces co-activateurs et co-represseurs va interférer dans l'expression génique induite par le TGF- β et pourrait expliquer comment la voie apparemment simple du TGF- β peut réguler des centaines de gènes différents et avoir des effets distincts selon les différents types cellulaires (116).

c- Translocation nucléaire des Smad : rôle de Smad4

L'étape essentielle pour l'activité de la voie des Smad est la translocation du complexe R-Smad/Co-Smad dans le noyau. Même s'il semble que Smad4 ne soit pas absolument nécessaire pour obtenir une faible activité de la voie du TGF- β Smad-dépendante, il a été montré que sa présence favorisait grandement la translocation nucléaire de Smad2/3 dans le noyau (117) ainsi que leur activité transcriptionnelle en recrutant des co-activateurs et favorisant leur liaison à l'ADN. La localisation cellulaire de Smad4 est indépendante de celle des autres Smad. En effet, alors que Smad2/3 sont localisées dans le cytoplasme en condition normale et qu'elles sont relocalisées dans le noyau après une stimulation par le TGF- β , Smad4 semble « voyager » indépendamment et de manière constante entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire (118, 119). Des séquences NLS et NES spécifiques de Smad4 ont été identifiées pour expliquer ce transport constant entre cytoplasme et noyau. De plus, la liaison entre Smad4 avec les R-smad dans le noyau semble inhiber l'export nucléaire de Smad4 favorisant son activité transcriptionnelle. En 2009, Dupond *et al.* proposaient un nouveau mécanisme de régulation de la localisation de Smad4 en évoquant la mono-ubiquitination nucléaire de Smad4 par la protéine à activité E3-ubiquitine ligase, TIF-1 γ (Transcriptional Intermediary Factor-1 γ) (120). Les auteurs démontraient que la mono-ubiquitination de Smad4 par TIF-1 γ inhibait la voie de signalisation des Smad en détruisant le complexe R-Smad/Smad4 et en favorisant l'export nucléaire de la forme mono-ubiquitinylé de Smad4 (Smad4-Ub, Figure 6). Leur étude dévoilait aussi un mécanisme de « recyclage » de Smad4-Ub puisqu'une fois dans le cytoplasme, la protéine FAM (Fat Facets in Mouse) est capable de dés-ubiquitinyler Smad4-Ub lui redonnant la possibilité de se lier aux R-Smad et de retourner dans le noyau (120).

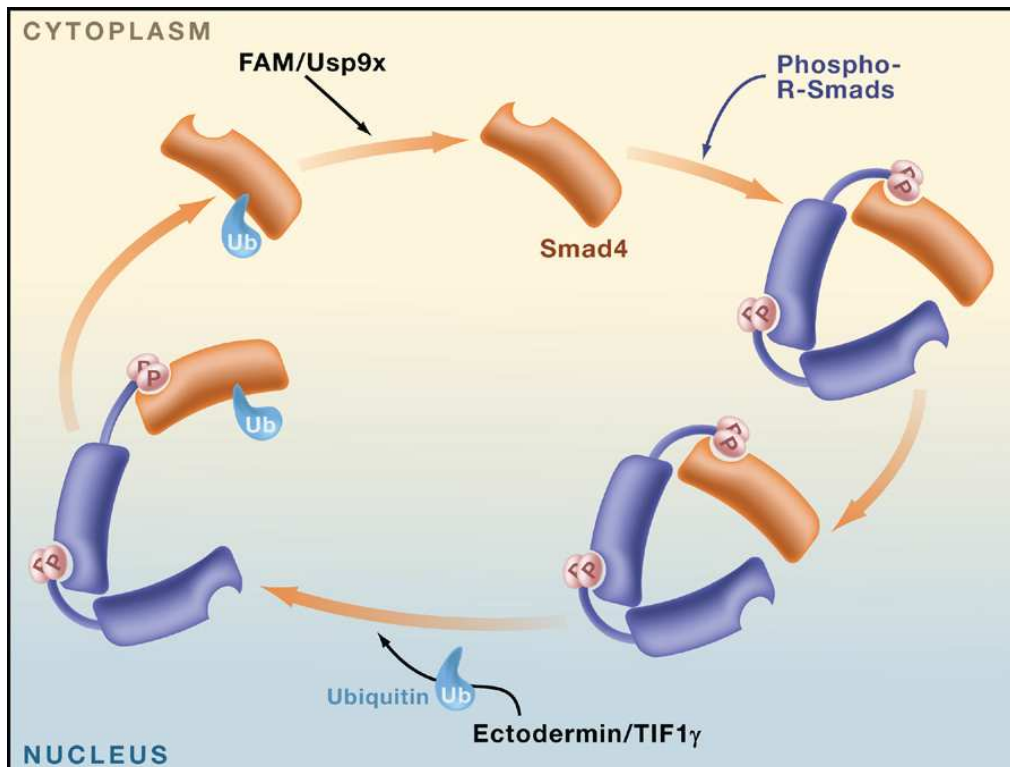


Figure 6 : Régulation de la localisation cellulaire de Smad4 par l'ubiquitine.

La stimulation de la phosphorylation des R-Smad par la kinase du T β R-I induit l'assemblage d'un hétéromère R-Smad/Smad4 qui s'accumule dans le noyau. L'interaction de ce complexe avec TIF1 γ dans le noyau conduit à la dissociation du Smad4 et sa mono-ubiquitination. Grâce à l'activité de la désubiquitinase FAM dans le cytoplasme, Smad4 est désubiquitinylée et est recyclée pour reformer un complexe R-Smad/Smad4 (d'après Wrana *et al.*, 2009 (117)).

d- Les voies Smad-indépendantes

Le TGF- β peut aussi activer des voies de signalisation indépendantes des Smad comme les trois voies distinctes des MAP (mitogen activated protein) kinases : la voie ERK (Extracellular signal-regulated kinase), la voie c-Jun N-terminal kinase (JNK) et la voie p38 MAP kinase. Ces voies MAPK peuvent être activées et agir complètement indépendamment de la voie des Smad. Elles peuvent aussi interagir avec les Smad (121). La voie ERK par exemple peut inhiber ou augmenter la voie des Smad selon le type cellulaire. Les voies JNK et P38 MAPK renforcent la réponse induite par la voie des Smad (83). En plus de ces voies, le TGF- β active les voies PI3K/Akt, c-Abl (Abelson nonreceptor tyrosine kinase) et Rho GTPase. Enfin, le TGF- β peut aussi coopérer avec les voies WNT (wingless-type MMTV integration site) et NOTCH (122).

Cependant, dans ce travail de thèse nous nous sommes concentrés sur la voie principale impliquée dans le processus de fibrose, la voie du TGF- β Smad-dépendante.

e- Les Smad dans la fibrose pulmonaire.

Lors de la fibrose pulmonaire, l'activation massive de la voie du TGF- β confère aux Smad un rôle potentiel important. Smad3 est la protéine la plus étudiée dans le contexte de fibrogenèse pulmonaire. L'étude de souris KO pour le gène Smad3 (S3-KO) montre que l'absence de cette R-Smad conduit à une modification de la structure pulmonaire. En effet, les souris S3-KO développent spontanément au cours du vieillissement un emphysème (élargissement des alvéoles, et destruction de la MEC) associé à la présence de MMP-9 et MMP-12. Ceci montre l'importance de la voie du TGF- β et particulièrement de la voie des Smad dans la structure de la MEC. Ces souris sont également protégées de la fibrose pulmonaire induite par la surexpression transitoire de TGF- β 1 à l'aide d'adénovecteurs (123), mais aussi induite par la bléomycine (124). Il a été montré qu'au cours de la fibrose, une forte activation de Smad2 et Smad3 était retrouvée dans les noyaux des macrophages infiltrant le site fibrotique, dans les cellules épithéliales alvéolaires et dans une moindre mesure, dans les fibroblastes (125). Ce résultat peut s'expliquer par la forte expression de T β R-I et -II à la surface de ces cellules. Les macrophages sont connus pour être de grands producteurs de TGF- β ce qui leur confère probablement un rôle central dans la fibrose pulmonaire. L'activation de la voie du TGF- β chez les fibroblastes entraîne une activation de la production des éléments de la MEC et des MMP, importants pour la progression de la fibrose (126). Le rôle de Smad2 dans la fibrose pulmonaire reste cependant moins clair. Smad2 a une plus faible affinité pour l'ADN que Smad3 (110) et est plus considérée comme un modulateur de la voie de signalisation impliqué dans le développement plutôt que comme une protéine effectrice de l'activation de la réponse rapide au TGF- β (124).

La surexpression des I-Smad, notamment Smad7, a également été rapporté comme impliquée dans la limitation du processus fibrosant (127). Cet effet de l'induction de Smad7 est compréhensible puisque l'inhibition de la phosphorylation des R-Smad ainsi induite va causer une rupture de la voie du TGF- β .

Les études sur le rôle de Smad4 dans la fibrose pulmonaire sont aujourd'hui très peu nombreuses. Cependant la génération de souris Smad4 KO dans les cellules épithéliales rénales (l'absence systémique de Smad4 est létale) a permis de montrer que l'absence de cette

Co-Smad avait un effet protecteur sur la fibrose rénale et limitait la production de collagène par les fibroblastes (128).

5- Le myofibroblaste

Au cours du processus de cicatrisation, les myofibroblastes sont recrutés au niveau de la lésion pour permettre sa contraction et empêcher sa progression. Ils sont caractérisés par l'expression importante de la protéine α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) qui est leur marqueur le plus communément utilisé (129). Cette protéine va leur conférer leur fort pouvoir contractile nécessaire à la fermeture des tissus lésés. En effet, les molécules d' α -SMA vont se fixer sur les fibres de F-actine pour les renforcer (130, 131). Comme nous l'avons évoqué précédemment, une fois leur mission accomplie, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose. En cas d'emballement du processus de cicatrisation, le micro-environnement cytokinique, et surtout la présence en très forte quantité de TGF- β , peuvent conduire à une persistance et une activation permanente des myofibroblastes conduisant, à terme, à l'établissement d'une fibrose. En effet, le TGF- β 1 est connu comme étant le principal activateur de ces cellules agressives dont la présence est corrélée avec un mauvais pronostic et la progression de la fibrose pulmonaire (57). Malgré la variété de types cellulaires capables de produire les éléments de la MEC, les myofibroblastes activés sont les plus grands producteurs de protéines matricielles, notamment les collagènes I et III (132). En outre, ces dernières sont également responsables d'une forte production de TGF- β entraînant un auto-maintien du « pool » de myofibroblastes dans les poumons (29, 129).

Les myofibroblastes sont localisés dans des régions spécifiques du poumon fibreux appelées « fibroblastic foci » ou foyers fibroblastiques (FF, Figure 7). Les FF représentent les zones pathologiques du poumon atteint de fibrose et regroupent à la fois des fibroblastes et myofibroblastes ainsi qu'une grande quantité de composants de la MEC. Leur présence au sein du poumon a été corrélée avec la perte des fonctions respiratoires, un mauvais pronostic et une baisse de la survie des patients (133).

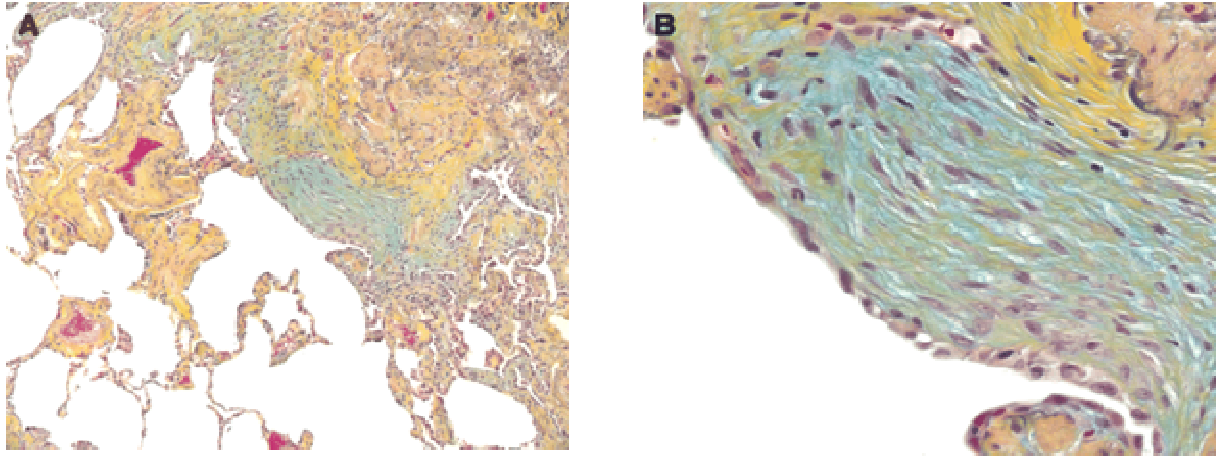


Figure 7 : Foyers fibroblastiques

Section de poumon de patient souffrant de FPI (grossissement 100x (A) et 400x (B)) présentant un foyer fibroblastique (en bleu-vert) correspondant à un dépôt localisé de collagène immature. Tout autour en jaune, un dépôt hétérogène de collagène mature peut être observé (d'après Cool *et al.*, 2006 (134)).

Si le rôle et la localisation des myofibroblastes sont aujourd'hui bien connus, les origines de ces cellules sont encore très discutées. Trois hypothèses ont été avancées possédant chacune un grand nombre de publications les confirmant. Même si la contribution et l'importance réelle de chacune d'elles restent débattues, le point commun à chaque mécanisme donnant naissance aux myofibroblastes est l'implication nécessaire du TGF- β 1.

Ces hypothèses mettent en lumière trois types de progéniteurs différents pour les myofibroblastes que nous allons décrire: les fibroblastes pulmonaires résidants, les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses issues de la moëlle osseuse (fibrocytes).

a- Les fibroblastes pulmonaires résidants

La plus ancienne hypothèse suggère que les myofibroblastes résultent de l'activation des fibroblastes résidents dans le poumon comme les fibroblastes péri-bronchiques et péri-vasculaires (30). Les fibroblastes sont des cellules qui ont une origine embryonnaire mésenchymateuse. Ces cellules fusiformes sont normalement présentes dans la majorité des organes et tissus de l'organisme, souvent intriquées dans les protéines de la MEC. En réponse aux lésions tissulaires, ces cellules acquièrent un phénotype spécifique caractérisé par l'augmentation de l'expression d' α -SMA, la sécrétion de TGF- β et leur capacité migratoire.

La capacité des cellules mésenchymateuses de se transformer en cellule contractile α -SMA positive (myofibroblastes) au cours de la réparation des tissus et sous certaines conditions

expérimentales a été largement rapportée dans la littérature (135). Ces cellules activées sont fortement impliquées dans la synthèse des protéines de la matrice et dans la production de cytokines fibrosantes (136). Les fibroblastes présentant un phénotype de type myofibroblastique sont aussi prédominant dans les lésions fibrotiques dans un certain nombre d'organes internes incluant les poumons, faisant de l'acquisition du phénotype myofibroblastique par les fibroblastes, un acteur majeur dans le dépôt excessif de protéines de la matrice au cours du développement d'une fibrose tissulaire (137).

b- Les cellules épithéliales

Les alvéoles pulmonaires sont le site des échanges gazeux qui ont lieu dans les poumons. L'épithélium alvéolaire assure sa fonction grâce principalement à deux types de cellules épithéliales alvéolaires, les AEC I (Alveolar epithelial cell type I) et les AEC II (Alveolar epithelial cell type II). Les AEC II représentent 15% des cellules pulmonaires et occupent 5% de la surface alvéolaire. Ces cellules synthétisent du surfactant qui stabilise les alvéoles pulmonaires en réduisant les tensions de surface. Elles permettent aussi la régénération de l'épithélium pulmonaire par leur prolifération et minimisent les processus inflammatoires par la sécrétion de cytokines (138). Les AEC I représentent 7% des cellules pulmonaires et recouvrent 95% de la surface alvéolaire. Elles forment un fin épithélium qui permet les échanges gazeux et forme une barrière protectrice pour l'espace alvéolaire. Les AEC I sont différenciées, manquent d'activité mitotique, et sont facilement lésées. Lors des lésions des AEC I, les AEC II prolifèrent et se différencient pour réparer l'épithélium alvéolaire endommagé (139).

Malgré le stade différencié et la complexité des fonctions des ces cellules, elles sont capables dans diverses conditions de se transdifférencier pour présenter des caractéristiques de cellules mésenchymateuses (fibroblastes et myofibroblastes). Ce processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est important au cours du développement puisqu'il permet la formation du mésoderme à partir de l'épithélium pendant la gastrulation. Il est aussi impliqué dans la formation du cœur (formation du coussin endocardique du canal auriculo-ventriculaire), et la fermeture du palais (140, 141). L'EMT peut également intervenir dans des phénomènes pathologiques comme le cancer où elle se caractérise par l'acquisition d'un phénotype migratoire des cellules malignes associé à l'invasion des tumeurs. Dans la fibrose pulmonaire l'EMT est considérée comme une source de myofibroblastes participant à l'accumulation de collagène et à la destruction de l'architecture du poumon.

La première étape du processus d'EMT est la **perte de polarité des cellules épithéliales et l'abrogation des interactions cellule-cellule** au sein de l'épithélium alvéolaire (142). Cette étape se manifeste par une diminution de l'expression de protéines spécifiques des cellules épithéliales impliquées dans les jonctions cellulaires telles que ZO-1 (Zona Occludens-1) et l'E-cadhérine. L'EMT est également accompagnée par une surexpression des MMP-2 et MMP-9 qui, comme vu précédemment, ont pour substrat le collagène de type IV de la membrane basale. **La dégradation de la membrane basale** et l'individualisation des cellules leur permettent de migrer au sein du parenchyme pulmonaire grâce au remodelage du cytosquelette d'actine qui se polymérise en fibres de stress avec la myosine et confère des propriétés contractiles aux cellules et permet **leur migration** (143). De plus, ces dernières vont créer des points d'ancrage avec la MEC qui permettent la mobilité et « l'invasion » des cellules via les intégrines. Après leur migration, les cellules vont **acquérir un phénotype mésenchymateux** (Figure 8). Par exemple, l'apparition de l'expression de protéines telles que l' α -SMA, la vimentine, la desmine, le (pro)-collagène, la fibronectine, la N-cadhérine, les facteurs de transcription Snail et slug (qui sont des répresseur de l'E-cadherine) et certaines MMP sont autant d'éléments qui confirment le phénotype mésenchymateux.

La perte des marqueurs cellulaires épithéliaux comme l'E-cadherine ainsi que l'expression de marqueurs mésenchymateux comme α -SMA mais aussi la production de TGF- β et de procollagen par les AEC sont donc des caractéristiques spécifiques du processus d'EMT (144).

Au cours de cette thèse, nous avons particulièrement étudié le TGF- β 1 comme principal initiateur de l'EMT. Bien que la voie du TGF- β soit la plus importante, durant l'EMT deux autres voies de signalisation, la voie Intégrines/ILK et la voie Wnt/ β -caténine complètent et modulent ce phénomène (145). Comme nous l'avons décrit précédemment, la voie de signalisation du TGF- β passe essentiellement par la voie des Smad. L'EMT induite par cette voie est donc la plus connue et la plus documentée. En effet, l'EMT peut être inhibée en cas de défaillance de la voie de Smad chez les souris Smad3 KO par exemple. De plus, la surexpression de Smad7, inhibiteur de la phosphorylation des R-Smad, peut abroger ou retarder l'initiation de ce processus. Le rôle direct du TGF- β a été montré chez des souris transgéniques présentant des AEC II marqués au X-Gal. En effet, chez ces souris, après surexpression du TGF- β à l'aide d'adénovecteurs, les cellules X-gal positives (donc les AEC II) subissaient une EMT avec apparition de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et l' α -SMA (146). Les gènes cibles d'intérêt de la voie TGF- β /Smad qui sont impliqués dans l'EMT sont l' α -SMA, le collagène I, MMP2 mais aussi les intégrines- β , Wnt, Snail, Slug et

ILK (integrin linked kinase). Il existe aussi des voies indépendantes des Smad qui impliquent d'autres éléments comme RhoA, P38 MAPK et PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) et Akt. Chacune de ces voies a un rôle spécifique mais ne semble pas suffisante pour induire une EMT sans le concours de la voie TGF- β /Smad. Par exemple, la petite GTPase RhoA est importante pour le changement de morphologie ainsi que pour l'activation du promoteur d' α -SMA (145). La voie P38 MAPK est aussi impliquée dans l'organisation du cytosquelette puisque son inhibition réduit le changement de morphologie et la réorganisation du cytosquelette induite par le TGF- β 1 (147). Enfin, la voie de PI3K/Akt semblerait elle, outre avoir un rôle dans la survie cellulaire, favoriser la voie Wnt/ β -caténine induisant l'EMT (145).

Le TGF- β régule aussi l'expression de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Snail et Slug sont deux protéines en doigt de zinc qui ont un rôle répresseur sur l'E-cadherine conduisant à la rupture des jonctions serrées entre les cellules épithéliales et favorisant l'invasion du parenchyme par les cellules épithéliales présentant un phénotype myofibroblastique.

Cependant, l'importance de l'EMT dans la fibrose pulmonaire est actuellement très controversée notamment en raison des travaux de Rock *et al.* en 2011, réalisés sur le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (148). Au cours de leur étude, les auteurs ont utilisé des souris transgéniques dont les cellules alvéolaires de type II (AECII) étaient spécifiquement marquées *in vivo* afin de suivre leur devenir après l'administration de bléomycine. Ils ont démontré que les cellules épithéliales ne génèrent pas de myofibroblastes en réponse à la bléomycine. Dans leur modèle, la bléomycine activait les AECII et favorisait leur transformation en AECI plutôt qu'en myofibroblastes (148).

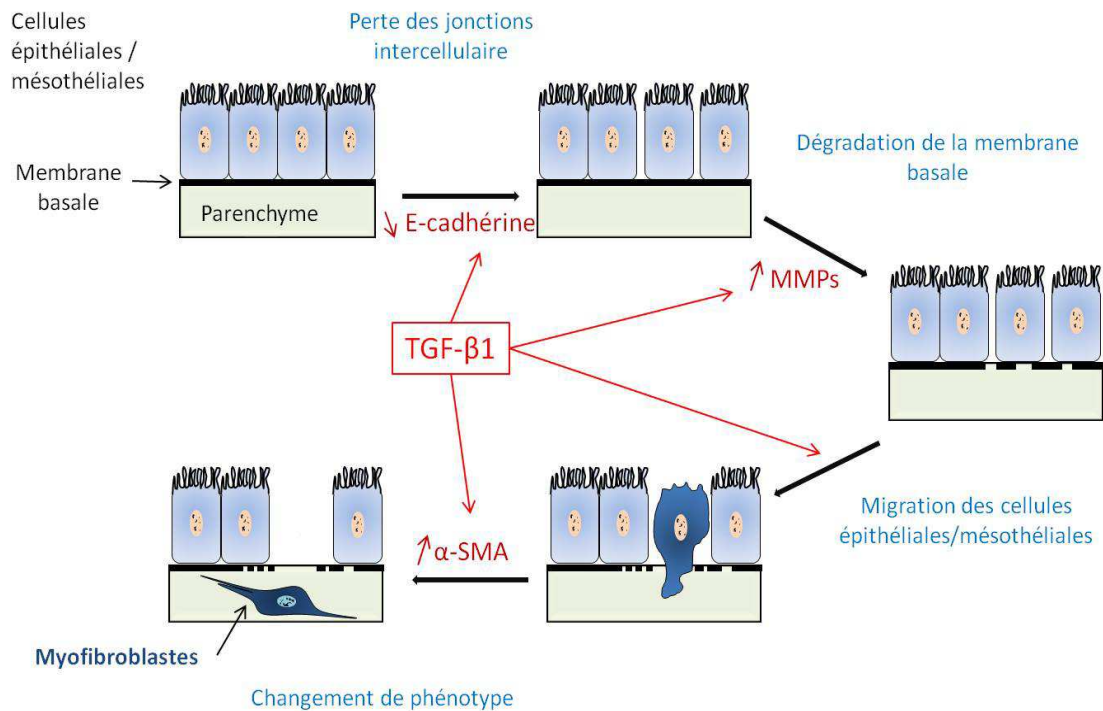


Figure 8 : Représentation schématique des grandes étapes de l'EMT.

Lors de l'EMT, les cellules épithéliales vont d'abord perdre leurs jonctions serrées, puis la membrane basale va se dégrader, sous l'influence des MMPs, permettant aux cellules détachées de l'épithélium de migrer au sein du parenchyme où elles termineront leur changement de phénotype pour devenir des myofibroblastes.

c- Les fibrocytes

Les fibrocytes sont des précurseurs de cellules mésenchymateuses dérivés de la moëlle osseuse identifiés pour la première fois en 1994 comme acteurs lors du processus pathologique de fibrose (149). Dans cet article, les auteurs décrivent une population de cellules circulantes avec des propriétés de fibroblastes qui entrent spécifiquement au niveau des sites de lésion des tissus. Ce type de cellule, nommé « fibrocytes », présente un phénotype distinctif (collagène + / vimentine + / CD34 +), et se caractérise par son passage rapide du sang dans les zones de lésion du tissu conjonctif. Si la nature des précurseurs cellulaires des fibrocytes est encore débattue, il est aujourd'hui clair que ces derniers expriment à la fois des marqueurs de surfaces leucocytaires (CD45), hématopoïétiques (CD34) et mésenchymateux (collagène I, fibronectine, α-SMA) ainsi qu'un grand nombre de récepteurs aux chemokines comme CCR2, CCR7 et CXCR4 qui sont responsables de leur recrutement au niveau des lésions inflammatoires, site d'initiation de la fibrose (150).

La présence de fibrocytes infiltrants a été démontrée dans des études réalisées sur des modèles animaux de fibrose pulmonaire. De plus, les patients atteints de FPI présentent un taux élevé

de fibrocytes circulants provenant de la moëlle osseuse. Des cellules qui expriment des marqueurs spécifiques des fibrocytes ont été trouvées dans le parenchyme pulmonaire des patients atteints de FPI, montrant potentiellement un processus de migration et de « homing » de ces populations cellulaires, via leurs récepteurs aux chemokines, susceptibles de contribuer à l'expansion de la population de fibroblastes/myofibroblastes dans le microenvironnement du poumon fibreux (151). Cette infiltration des fibrocytes au niveau pulmonaire et leur contribution au « pool » de myofibroblaste a été rapportée par des études *in vivo* utilisant des souris transgéniques dont les cellules de la moëlle osseuse étaient marquées par de la GFP (152, 153). Ces études montraient des niveaux élevés de cellules GFP-positives au niveau des zones fibrotiques. Ces cellules possédaient également un phénotype mésenchymateux avec l'expression du collagène I et de la vimentine confirmant la nature myofibroblastique des cellules originaires de la moëlle osseuse. La régulation du « homing » des fibrocytes vers les poumons comme approche thérapeutique a été récemment envisagée. L'utilisation d'un antagoniste du principal récepteur de chemokines des fibrocytes, CXCR4, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire conduit à une réduction du nombre de fibrocytes dans les poumons ainsi qu'une diminution du dépôt de collagène limitant ainsi la fibrose (154).

Les grandes étapes du processus de fibrose que nous avons décrit sont résumées dans le Figure 9.

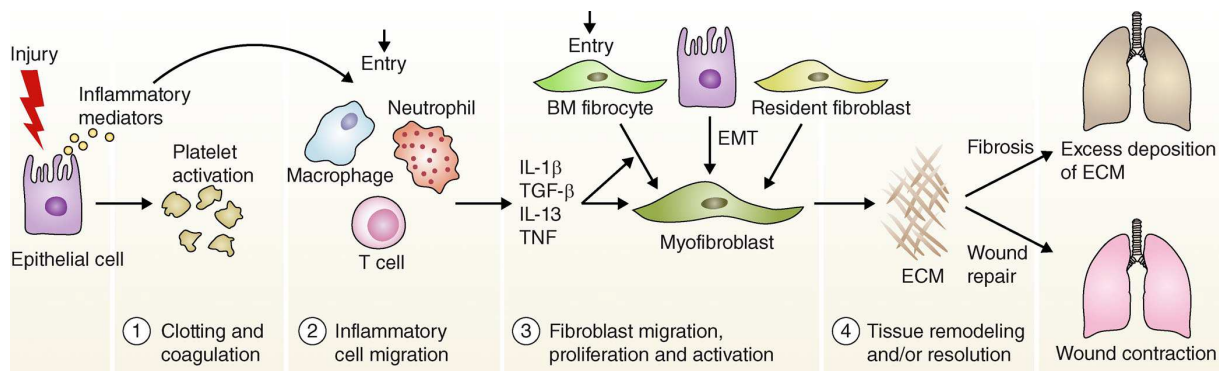


Figure 9 : Représentation schématique des grandes étapes du processus de fibrose pulmonaire.

Les lésions épithéliales induisent un processus inflammatoire et une apoptose permettant une importante sécrétion de cytokines et de chemokines par les macrophages et neutrophiles notamment le TGF-β. Le TGF-β favorise la formation des myofibroblastes à partir des fibroblastes déjà présents dans le poumon, des cellules épithéliales elles mêmes via l'EMT ou des fibrocytes recrutés grâce aux chemokines notamment CXCR4. Cette augmentation de la population de myofibroblastes activés entraîne une synthèse excessive d'éléments de la MEC et un remodelage de la matrice via les MMP pouvant conduire à une fibrose pulmonaire (d'après Wynn, 2011 (155)).

II- Les modèles classiques de fibrose pulmonaire

De nombreuses approches différentes dans la modélisation de la fibrose pulmonaire ont été développées. Parmi celles-ci, les plus couramment utilisés sont l'exposition à la bléomycine, la silice, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), l'irradiation, l'expression de gènes spécifiques grâce à des vecteur viraux (adénovirus) ou l'utilisation de systèmes transgéniques. Bien que chaque modèle ait contribué de manière significative à l'évolution de la compréhension et des connaissances sur le processus de la maladie, chacun de ces modèles présente des avantages et des inconvénients (Tableau 1). Parmi les nombreux modèles animaux de fibrose pulmonaire, nous allons dans ce chapitre, décrire les modèles utilisés au cours de cette thèse qui sont : le modèle à la bléomycine, le modèle par transfert de gènes codant pour le TGF- β 1 et le modèle par transfert de gènes codant pour le IL-1 β .

1- Le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

La bléomycine est un agent chimiothérapeutique qui a montré son efficacité sur de nombreux types de cancers comme les lymphomes, les tumeurs de la peau ou des testicules (2). Cependant, son utilisation thérapeutique est aujourd'hui limitée à cause de son principal effet secondaire conduisant au développement de complications pulmonaires chez environ 46% des patients pouvant conduire parfois à l'établissement de fibrose pulmonaire (3, 4). L'efficacité anti-tumorale de la bléomycine est due à sa capacité d'induire la mort des cellules cancéreuses par des cassures dans les molécules d'ADN et la formation d'espèces actives de l'oxygène (156). En chimiothérapie, la bléomycine est administrée par diverses voies (intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée) et elle est éliminée par les reins. Dans les cellules de la majorité des organes, la bléomycine peut être inactivée par une enzyme, la bléomycine hydrolase (157). Cette enzyme est cependant très faiblement présente dans les poumons ce qui explique sa grande toxicité pulmonaire.

Le modèle animal d'induction de fibrose par la bléomycine est le plus connu et le plus utilisé pour étudier les mécanismes de fibrogenèse pulmonaire mais également pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques conduisant au développement de nouveaux traitements potentiels (5). Ce modèle a été développé chez le chien, la souris, le hamster et le rat et différentes voies d'injection peuvent être utilisées comme par exemple en intraveineuse, intrapéritonéale, intratrachéale ou sous-cutanée. L'injection intratrachéale, que nous avons

utilisée pour nos travaux, induit une fibrose plus rapide et plus sévère que les autres voies d'administration en affectant directement toutes les cellules pulmonaires.

Durant la première semaine après l'injection de bléomycine, une première phase se met en place avec le développement d'une inflammation sévère, accompagnée d'une forte augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β (5, 158). Cette phase est suivie, au cours de la seconde semaine, par une augmentation des facteurs profibrosants comme le TGF- β au niveau pulmonaire avec un pic 14 jours après l'injection initiale. Ce « switch » entre phase inflammatoire et phase fibrotique semble s'opérer au 9^{ème} jours après l'injection de bléomycine. La troisième semaine se caractérise par un dépôt excessif de composants de la MEC (collagène, fibronectine) constituant la fibrose pulmonaire en elle-même (Figure 10). Malheureusement, certaines caractéristiques de la FPI ne sont pas retrouvées dans ce modèle. En effet, même si il y a vraisemblablement une augmentation du nombre de myofibroblastes après injection de bléomycine, ces derniers ne forment pas de réels foyers myofibroblastiques comme lors de la FPI chez l'homme. L'accumulation de collagène n'est donc pas limitée par ces foyers myofibroblastiques et est retrouvée dans l'ensemble du poumon. Une autre limitation importante est la régression spontanée de ce modèle à partir de la quatrième semaine post-injection. En effet, les poumons retrouvent un aspect proche de la normale environ six semaines après l'injection initiale de bléomycine réduisant grandement son utilité pour le développement de nouvelles thérapies puisqu'il est parfois difficile de distinguer la régression de la fibrose due au traitement et la régression spontanée (159). Enfin, la réponse à la bléomycine semble être dépendante du background génétique des souris. Par exemple, les souris C57Bl/6 sont très sensibles à la bléomycine et développent une fibrose très sévère alors que les souris Balb/c développent une fibrose limitée après administration de bléomycine. Ces différences peuvent être expliquées par des variations du taux de bléomycine hydrolase d'une souche à l'autre (5). Le choix du type de souris pour conduire les études devient alors un élément primordial.

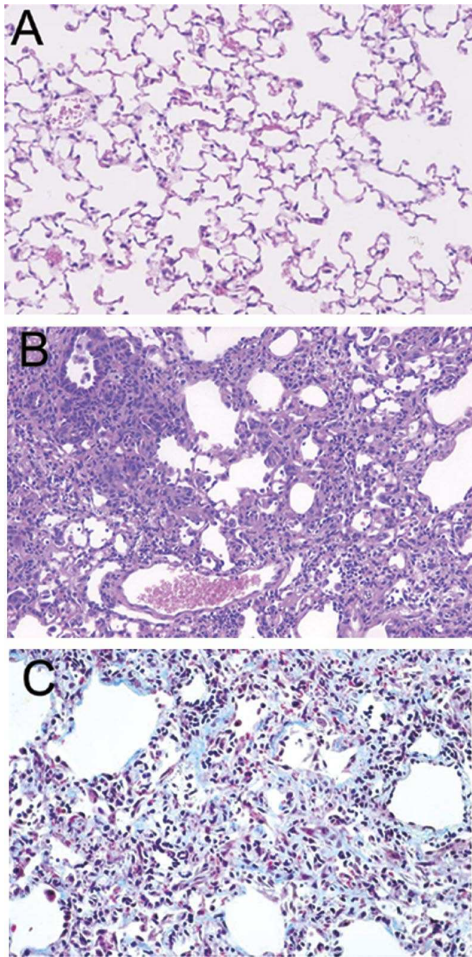


Figure 10 : Modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

Sections de poumons de souris C57bl/6 marqués à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) et au trichrome de Masson (TM). A : poumon de souris sain n'ayant reçu aucun traitement. B : Poumon de souris 14 jours après administration de bléomycine par injection intratrachéale (H&E). On observe un épaissement interstitiel, une forte inflammation et une réduction des alvéoles pulmonaires. C : Poumon de souris 14 jours après administration de bléomycine par injection intratrachéale (TM). On observe une large accumulation de collagène (vert) (d'après Moore *et al.*, 2008 (158)).

2- Le modèle par transfert de gènes (TGF- β et IL-1 β)

L'administration d'adénovecteurs par voie intratrachéale permet une surexpression localisée d'un gène spécifique pour étudier son effet sur les cellules pulmonaires. Plusieurs gènes ont déjà été surexprimés essentiellement chez le rat mais aussi chez la souris comme le TNF- α , le TGF- β et l'IL-1 β , tous induisant une fibrose pulmonaire. D'autres adénovecteurs ont également été utilisés pour protéger les poumons du processus de fibrose induit par la bléomycine comme par exemple Smad7 que nous avons décrit précédemment. Au cours de ce travail de thèse, nous avons essentiellement utilisé des adénovecteurs codant pour le TGF- β 1 (AdTGF β). Pour induire une fibrose, il est nécessaire que l'adénovirus code pour la forme active du TGF- β 1. En effet, il a été montré que l'administration d'adénovecteurs codant pour le TGF- β 1 sous sa forme latente, même en grande quantité, n'induisait pas de fibrose (160). La surexpression du TGF- β grâce à une injection intratrachéale d'AdTGF β conduit à une forte augmentation du taux de cette cytokine pro-fibrotique au niveau des cellules alvéolaires pulmonaires et bronchiques. Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle indispensable du TGF- β dans l'initiation de la fibrose (160). Le TGF- β induit donc une fibrose pulmonaire progressive et sévère (Figure 11), et bien que ce modèle induise également une faible

inflammation, cette dernière reste très limitée en comparaison à la bléomycine constituant un de ces avantages. Un autre intérêt de ce modèle est le caractère transitoire de l'expression de la molécule cible puisque celle-ci n'excède pas 14 jours (11, 160). Dans le cas d'AdTGF β , La fibrose pulmonaire continue cependant de se développer par la suite. Ce modèle permet donc d'initier une fibrose qui progressera par la suite de façon autonome, lui donnant ainsi une pertinence clinique. Il a aussi permis de mettre en évidence l'implication du TGF- β 1 dans la formation des myofibroblastes dont une partie provenait du processus d'EMT (161).

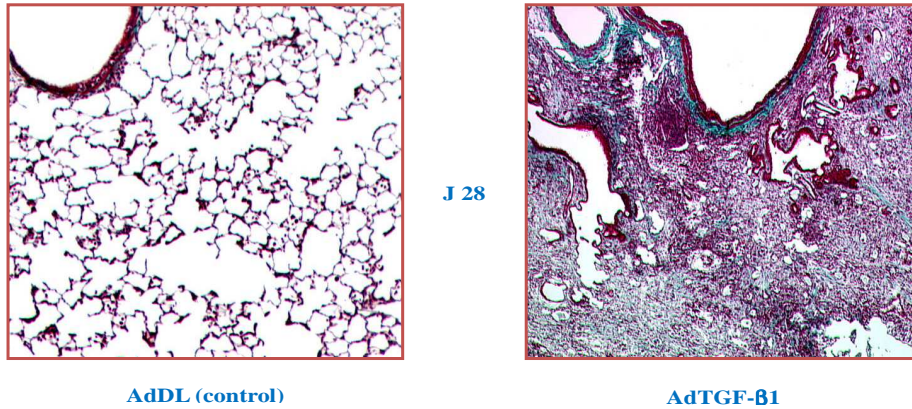


Figure 11 : Modèle de fibrose pulmonaire par injection intra-trachéale d'adénovirus codant pour le TGF- β 1

Sections de poumons de rat marqués au trichrome de Masson. A Gauche : rat ayant été traité avec un adénovirus vide (AdDL) et à Droite : rat ayant été traité avec un adénovirus codant pour le TGF- β 1 (d'après Sime *et al.*, 1997 (160)).

Nous avons également utilisé, au cours de cette thèse, un modèle inflammatoire de fibrose pulmonaire basé sur l'administration intratrachéale d'adénovecteurs codant pour le gène IL-1 β (AdIL1 β). Plusieurs éléments mettent en évidence un rôle de l'IL-1 β dans la fibrogenèse. En effet, des études montrent une surexpression de cette cytokine inflammatoire dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire (modèle bléomycine par exemple) (162) et Piguet *et al.* rapportent en 1993 que l'inhibition des récepteurs à l'IL-1 β via l'administration de l'antagoniste IL1RA protège de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (163).

L'injection d'AdIL1 β crée une forte réaction inflammatoire avec une augmentation du nombre de neutrophiles et de macrophages au niveau pulmonaire, suivie par le développement d'une fibrose pulmonaire progressive détruisant l'architecture alvéolaire (Figure 12). Dans ce modèle, la première semaine suivant l'injection d'AdIL1 β est corrélée avec une surexpression de nombreuses cytokines exacerbant la réaction inflammatoire dont l'IL-1 β endogène, l'IL-6 et le TNF- α . Le début de l'accumulation de collagène ainsi que l'apparition de cellules avec un phénotype myofibroblastique sont observés durant la seconde semaine après

l'administration d'AdIL1 β . De manière intéressante, les myofibroblastes et le collagène sont retrouvés dans des régions spécifiques du poumons avec des caractéristiques communes aux foyers myofibroblastiques observés chez l'homme, ce qui constitue un avantage important en comparaison au modèle à la bléomycine (78). L'apparition des foyers myofibroblastiques et le dépôt excessif de collagène sont corrélés avec la surexpression du TGF- β 1 induite par l'IL-1 β . La phase inflammatoire précoce de ce modèle permet l'expression persistante du TGF- β qui initie la mise en place d'une fibrose progressive proche de celle observée chez l'homme.

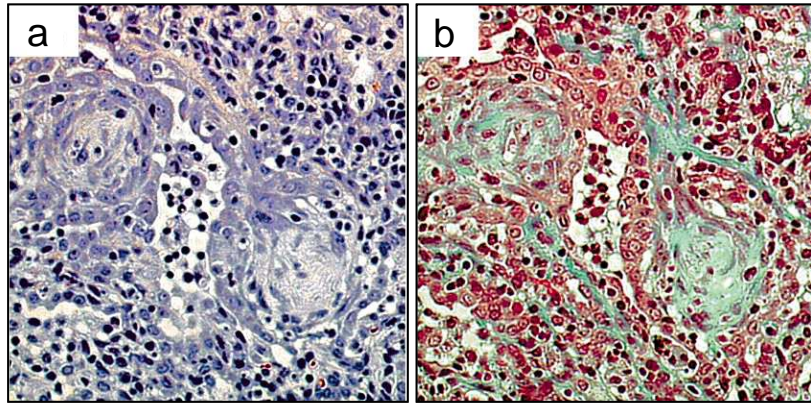


Figure 12 : Modèle de fibrose pulmonaire par injection intra-trachéale d'adénovirus codant pour l'IL-1 β

Coupe de poumon de rat ayant été traité par l'AdIL1 β . a : marquage spécifique montrant la formation de foyers myofibroblastiques. b : marquage au trichrome de Masson montrant l'accumulation de collagène au niveau des foyers myofibroblastiques (d'après Kolb et al., 2001 (78)).

Malgré ces nombreux avantages, les modèles de surexpression de transgènes par infection virale présentent des limitations importantes. D'abord sur le plan pratique, ils sont assez coûteux et nécessitent des infrastructures lourdes puisque les injections *in vivo* d'adénovirus doivent être effectuées dans des locaux d'animalerie de niveau 2. Un autre inconvénient majeur est la réaction immunitaire induite par l'adénovecteur lui-même qui peut rendre les expositions ultérieures à ce dernier inefficaces et qui peut également interférer avec les mécanismes inflammatoires et fibrosants que nous voulons observer. Pour évaluer cette réaction due aux adénovecteurs et pour pouvoir distinguer les effets relevant effectivement du transgène, les groupes contrôles dans ces modèles reçoivent un adénovecteur vide, sans transgène (AdDL). Enfin, la dernière limitation concerne les taux d'expression du transgène induite lors de l'infection des cellules épithéliales pulmonaires par l'adénovecteur. En effet, la surexpression induite par ces modèles est généralement beaucoup plus élevée que les taux physiologiques naturellement induit lors d'un processus de fibrose. Ces taux très élevés permettent la mise en place rapide de la fibrose pulmonaire mais de toute évidence cela peut

altérer les voies naturelles qui sont en jeu et peut donner une image biaisée de la pathogenèse de la maladie (164).

Modèle	Avantages	Inconvénients
<p>Injection unique intratrachéale de bléomycine</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité de mise en place et faible coût - Développement rapide de la fibrose (14 jours) - Pertinence clinique dans le cas des fibroses induites par des agents chimiques - Modèle bien caractérisé et largement accepté par la communauté scientifique 	<ul style="list-style-type: none"> - Dépendant de la souche de souris utilisée - Régression spontanée après 28 jours - Manque de certaines caractéristiques de la FPI : foyers myofibroblastiques inexistantes
<p>Surexpression de transgènes via infection virale (TGF-β1 et IL-1β)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Faible inflammation (TGF-β1) - Apparition de foyers fibroblastiques caractéristiques de la FPI (IL-1β) - Permet l'étude spécifique de la surexpression d'un gène particulier sur la fibrose pulmonaire - L'effet transitoire du transgène (10 à 14 jours) permet une seconde phase de développement autonome de la fibrose 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté de mise en place : nécessité de manipuler les animaux dans un secteur de niveau 2 de l'animalerie - Le système immunitaire de la souris identifie le vecteur viral rendant les expositions ultérieures moins efficaces - Les transgènes sont généralement exprimés à des niveaux supérieurs en comparaison aux conditions physiologiques

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des modèles animaux utilisés (d'après Degryse *et al.* 2011(164)).

III- Rôle de la plèvre et de la cellule mésothéliale dans la fibrose pulmonaire

La plèvre est un organe à part entière indissociable du parenchyme pulmonaire malgré une origine embryologique différente. Au cours du développement, la plèvre se développe à partir de la cavité coelomique et possède donc la même origine mésodermique que la cavité péricardique et péritonéale. La plèvre est une membrane séreuse formée par deux feuillets composés principalement de cellules mésothéliales : le feuillet viscéral qui longe les poumons en étant en continuité directe avec le parenchyme pulmonaire et le feuillet pariétal qui borde la cavité thoracique et le diaphragme (Figure 13).

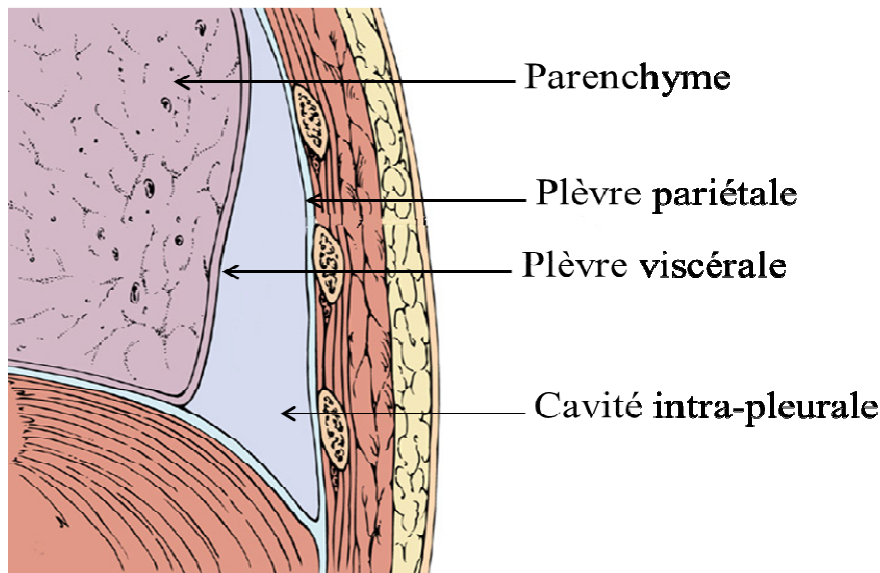


Figure 13 : Représentation schématique de la plèvre

Coupe longitudinale de la cage thoracique laissant apparaître les deux feuillets pleuraux qui sont normalement accolés. La cavité intra-pleurale est donc une cavité virtuelle ne contenant que quelques millilitres de liquide facilitant le glissement des deux feuillets lors de la respiration.

Entre les deux feuillets délimitant la plèvre se trouve la cavité pleurale, qui est une cavité virtuelle (figure 13). Il n'y a pas de réel espace libre entre les deux feuillets, ils sont séparés par un liquide riche en glyco-protéines (concentration protéique $\approx 1,5$ g pour 100 ml), en albumine et en immunoglobulines (IgG). La présence de ce liquide dans la cavité pleurale permet aux deux feuillets de glisser l'un contre l'autre lors des mouvements respiratoires. Il contient également de nombreuses cellules immunitaires comme des monocytes, des macrophages et quelques lymphocytes. Le volume de ce liquide est proportionnel à la masse

corporelle de l'individu (0,1 à 0,2 ml par kg) et représente donc en moyenne entre 8 et 10 ml (165).

Alors que chez le rongeur la plèvre est composée d'une monocouche de cellules mésothéliales reposant sur une membrane basale, chez l'homme, elle possède une structure un peu plus complexe. En effet, la surface pleurale humaine normale est lisse et est composée de cinq couches qu'il est difficile de distinguer en microscopie (Figure 14) :

- la première couche est le mésothélium composé d'une monocouche de cellules mésothéliales jointes par des jonctions serrées.
- la deuxième est une fine couche de tissu conjonctif sous-mésothélial
- la troisième est une couche de tissu élastique superficiel
- la quatrième est une deuxième couche de tissu sous pleural conjonctif. Celui-ci est plus lâche et riche en artères, veines, nerfs et vaisseaux lymphatiques.
- Enfin la cinquième est une couche profonde de tissu fibro-élastique adhérant au parenchyme pulmonaire sous-jacent (165, 166).

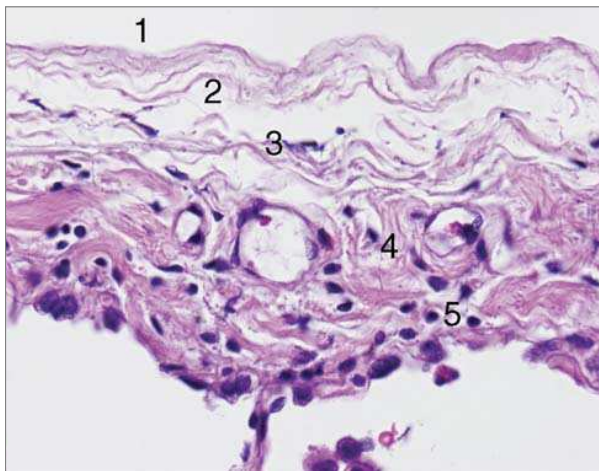


Figure 14 : Histologie d'un feuillet pleural humain sain.

(1) mésothélium, composé de cellules mésothéliales ;
(2) tissu conjonctif sous-mésothélial ; (3) tissu superficiel élastique ; (4) 2nd tissu conjonctif lâche, riche en artères, veines, nerfs et lymphatiques ; (5) couche profonde de tissu fibro-élastique, adhérant au parenchyme pulmonaire (d'après English *et al.*, 2006 (165))

La plèvre est étroitement liée au parenchyme pulmonaire sous-jacent, au-delà des interactions physiques, par un réseau de facteurs cellulaires et humoraux participant à la défense de l'espace pleural. Elle a donc, en plus de sa fonction de barrière, une fonction de défense permettant de garder une balance homéostatique dans l'espace pleural. Contrairement aux poumons, la plèvre n'interfère pas directement avec l'environnement extérieur. L'introduction de cellules étrangères, de protéines, de bactéries, de sang, d'air, l'inflammation ou encore la rupture mécanique de la monocouche de cellules mésothéliales peuvent entraîner une perte de l'équilibre homéostatique de l'espace pleural (167).

1- La cellule mésothéliale : structure, fonction et rôle dans la fibrose

Les cellules mésothéliales sont atypiques puisque malgré leur origine mésodermique, elles expriment à la fois des filaments intermédiaires des cellules mésenchymateuses comme la vimentine et la desmine, mais également des filaments intermédiaires des cellules épithéliales comme les cytokératines. Elles recouvrent la surface de trois cavités séreuses et sont trouvées principalement au niveau de la plèvre, du péritoine et du péricarde. Chez l'homme, les cellules mésothéliales peuvent avoir des formes cubiques ou cylindriques et présentent un noyau de forme ovoïde. Elles contiennent des microtubules, des microfilaments, du glycogène, des mitochondries, un réticulum endoplasmique abondant, des ribosomes et un appareil de golgi peu développé. Leur cytoplasme est également riche en vésicules dont le nombre varie en fonction de leur localisation. Généralement, le mésothélium viscéral possède une plus grande concentration de vésicules que le mésothélium pariétal. Ces vésicules permettent le transport de fluides et de particules à travers le mésothélium (168). Au niveau de la cavité pleurale, les cellules mésothéliales se font face. Leur pôle apical qui est en contact avec le liquide pleural comporte des microvillosités dont le nombre et la distribution varient en fonction de la localisation des cellules : plèvre viscérale, pariétale ou diaphragmatique. Le rôle de ces villosités est d'augmenter la surface cellulaire en contact avec le liquide pleural et de faciliter leur fonction d'échange.

Les jonctions inter-cellulaires du mésothélium sont nombreuses et fondamentales. En effet, les cellules mésothéliales présentent, des jonctions serrées, des jonctions d'adhérences et des jonctions communicantes. Les jonctions serrées sont cruciales pour l'acquisition de la polarité cellulaire et le maintient d'une barrière de diffusion semi-perméable. Les jonctions d'adhérences forment, quant à elles, le support structurel de la couche de cellules et les jonctions communicantes forment des canaux aqueux intercellulaires. Des études au cours des dernières années ont commencé à élucider les mécanismes moléculaires de la régulation et de la formation de ces jonctions et un certain nombre de protéines associées à ces complexes de jonction ont été identifiées dans une variété de types cellulaires. Le mésothélium exprime les E-, N- et P-cadhérines bien que, contrairement à l'épithélium, la N-cadhérine prédomine. En outre, l'expression à la membrane cellulaire de la protéine de jonction ZO-1 (Zonula Occludens-1), aussi présente dans les cellules épithéliales, a été démontrée dans le mésothélium normal (169, 170).

Historiquement, deux fonctions principales étaient attribuées aux cellules mésothéliales. D'abord une fonction de barrière protectrice contre les dommages physiques et l'invasion d'organismes grâce à la production de glycosaminoglycanes, principalement de hyaluronane, recouvrant la surface du mésothélium et le protégeant des agents infectieux, des attaques cytotoxiques des lymphocytes et des agressions. L'autre fonction attribuée aux cellules mésothéliales est l'établissement d'une interface de friction permettant le mouvement de deux organes ou tissus apposés l'un contre l'autre (168, 171) grâce à la sécrétion de surfactant (majoritairement de phosphatidylcholine). Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence d'autres fonctions fondamentales du mésothélium qui, plus qu'une simple barrière protectrice, peut être vue comme un acteur essentiel dans de nombreux processus physiologiques (Figure 15).

- **la réponse immunitaire** : les cellules mésothéliales sont capables d'induire la prolifération des cellules CD4+ T helper ainsi que leur capacité à présenter des antigènes. Cette présentation se fait grâce à ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1). Elles peuvent aussi sécréter de l'IL-15, en présence d'IFN- γ , une cytokine impliquée dans l'activation et la prolifération de cellules T et des cellules NK (natural killer).

- **la fixation et la croissance tumorale** : même si des études ont montré que les surfaces lésées des cellules mésothéliales pouvaient former un site privilégié pour la fixation de cellules tumorales, le rôle exact des cellules mésothéliales dans ce mécanisme reste encore controversé. En effet, l'hyaluronane présent au niveau de la surface des cellules mésothéliales pourrait être un point d'ancrage pour les cellules tumorales. Cependant, il a également été montré que le traitement *in vitro* de cellules mésothéliales par du milieu conditionné contenant de l'hyaluronane sécrété par d'autres cellules mésothéliales empêchait la fixation des cellules tumorales (172). Ceci pourrait avoir un intérêt lors d'interventions chirurgicales durant lesquelles, les lavages, ayant pour but d'enlever le sang ou d'autres matériels biologiques, pourraient également enlever le liquide contenant l'hyaluronane et les autres glycosaminoglycanes et favoriser ainsi la formation d'un environnement propice à la fixation et au développement tumoral (171).

- **le transport** de liquides et de cellules permettant la communication avec le réseau lymphatique sous mésothélial et ainsi l'évacuation rapide de liquides ou de cellules présents dans la cavité pleurale (171).

- **l'initiation et la résolution de l'inflammation** et de la **réparation tissulaire** : les cellules mésothéliales peuvent en effet sécréter après une agression, des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des ROS, des prostaglandines, des prostacyclines ainsi que des

composants de la matrice extracellulaire. Ces éléments vont directement promouvoir la migration de cellules de l'inflammation. Les cellules mésothéliales sont également responsables de l'efflux des cellules inflammatoires. La régulation de cette balance de facteurs pro- et anti-inflammatoire est très importante puisqu'elle permettra une réparation tissulaire normale alors qu'une perte de cette balance pourra conduire à une augmentation de la perméabilité, à des œdèmes et éventuellement à une fibrose (171).

- **la régulation de la fibrinolyse** : les cellules mésothéliales jouent un rôle important dans l'équilibre entre dépôt et élimination de la fibrine. Leur activité fibrinolytique permet de réguler le taux de fibrine au niveau du mésothélium. Cependant, si cette capacité de dégradation de la fibrine est insuffisante, un dépôt excessif de cette dernière entraînerait des adhésions fibreuses au sein des surfaces séreuses. La régulation du taux de fibrine est contrôlée par PAI-1, PAI-2 (dépôt de fibrine) et par tPA, uPA (activité fibrinolytique). Les cellules mésothéliales sont les productrices majeures de tPA dans les cavités séreuses mais produisent uPA en quantité plus limitée. Le taux de ces médiateurs est sous le contrôle de facteurs de l'inflammation comme IFN- α , IL-1 et TGF- β (171).

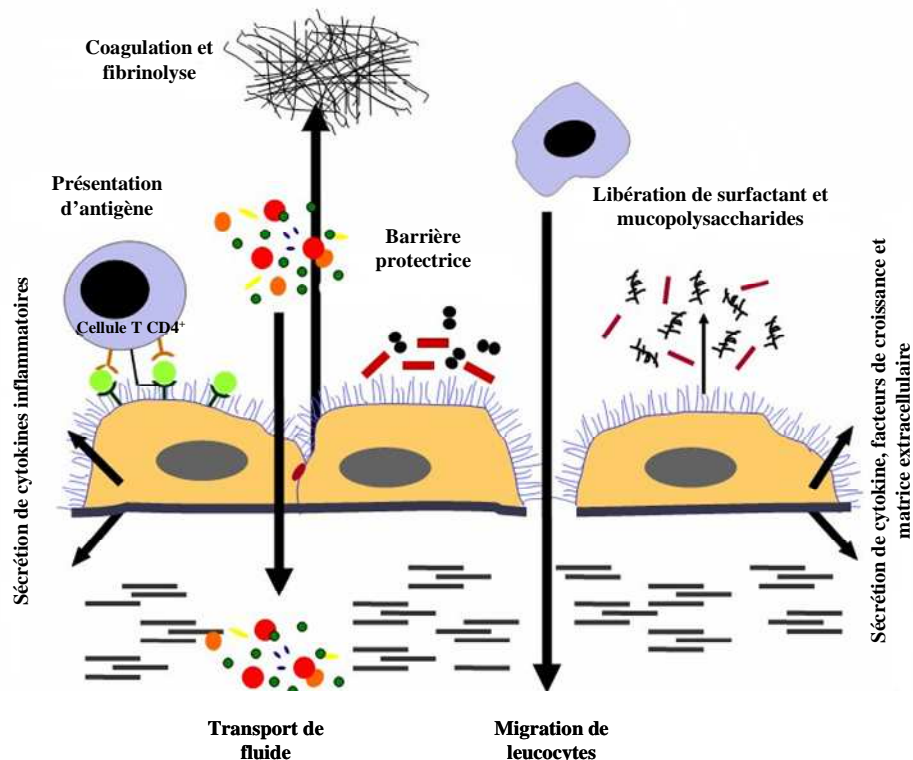


Figure 15 : Les différentes fonctions des cellules mésothéliales

Les cellules mésothéliales sont impliquées dans le transport de fluide, particules ou cellules à travers la cavité pleurale, dans la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires, dans la présentation d'antigènes, dans la sécrétion de facteurs stimulant le dépôt et l'élimination de fibrine, dans la synthèse de facteurs de croissance et de protéines de la MEC et dans la protection contre les micro-organismes (d'après Mutsaers *et al.*, 2004 (171)).

Les cellules mésothéliales sont capables d'une certaine plasticité et ont la capacité de changer leur phénotype de façon comparable aux cellules épithéliales. En effet, en culture, les cellules mésothéliales perdent leurs marqueurs « épithéliaux » comme les cytokératines et adoptent un phénotype proche de celui des fibroblastes (170, 173). Ce mécanisme semble analogue à celui observé pour les cellules épithéliales, l'EMT. Nous devrions alors parler de transition mésothélio-mésenchymateuse ou de transformation mésothélio-fibroblastoïde comme cela a été publié par Décologne *et al.* (11). Cependant, nous utiliserons l'abréviation plus générale, EMT, pour parler de ce type de transformation, comme cela est largement admis dans la littérature (161, 174, 175). La majeure partie des études sur l'EMT des cellules mésothéliales ont été conduites sur le péritoine. *In vitro*, les cellules mésothéliales péritonéales activées avec du TGF- β 1 peuvent subir une EMT caractérisée par une augmentation d' α -SMA et de la vimentine et une diminution d'expression d'E-cadhérine et cytokératine (175). Margetts *et al.* ont reporté que l'injection intra-péritonéale d'adénovirus codant pour le TGF- β 1 induit une fibrose péritonéale accompagnée d'événements cellulaires associés à une EMT (161). Les auteurs ont montré que quatre jours après l'injection de l'adénovirus, les cellules mésothéliales exprimaient la protéine α -SMA. Ils ont aussi montré *in vitro* que les cellules mésothéliales exprimaient des marqueurs de l'EMT, tels que le facteur de transcription snail et la MMP-2 et perdaient leurs caractéristiques « épithéliales » sous l'influence de TGF- β 1. En outre, Strippoli *et al.* ont montré que la reconstruction partielle de l'environnement pro-inflammatoire et profibrotique par la combinaison du TGF- β 1 et de l'IL1 β retrouvée lors de nombreuses pathologies du péritoine dont la fibrose, permettait d'accentuer ce phénomène d'EMT des cellules mésothéliales mettant en jeu la voie du TGF- β et le facteur de transcription Snail, impliqué dans l'EMT (176). Cette induction de l'EMT a également été corrélée avec une augmentation de l'expression du collagène de type I par les cellules mésothéliales montrant une potentielle implication de ces dernières dans le processus fibrosant (177).

Au niveau de la plèvre, notre équipe a montré que la surexpression de TGF- β 1 par l'administration d'adénovirus au sein de la cavité pleurale induisait une fibrose pleurale majeure accompagnée d'une EMT des cellules mésothéliales pleurales. Ceci a été mis en évidence par double marquage cytokératine/ α -SMA de lames d'histologie de rats traités avec un adénovirus vide ou un adénovirus codant pour TGF- β 1 (11, 173). Une équipe a récemment montré *in vitro* que les cellules mésothéliales pleurales pouvaient subir une EMT sous l'influence de TGF- β 1 (174). L'ensemble de ces études suggère donc fortement que les

cellules mésothéliales sont capables d'une certaine plasticité à l'image des cellules épithéliales et peuvent être à l'origine de fibrose péritonéale et pleurale.

2- La fibrose pleurale

La plèvre peut être, comme le parenchyme pulmonaire, le siège de pathologies importantes incluant la fibrose. Celle-ci résulte souvent d'autres pathologies pleurales induisant une réaction fibrotique au niveau du mésothélium. Les étiologies les plus connues de la fibrose pleurale sont, sans être exhaustif, l'exposition à l'amiante (178), les infections à germe banal ou les pleurésies tuberculeuses (179), les réactions pleurales induites par les médicaments (ergots de seigle (180), cyclophosphamide (181, 182)), les hémothorax (épanchement de sang dans l'espace pleural), la polyarthrite rhumatoïde (183), la radiothérapie ou encore très rarement l'insuffisance rénale.

Les cellules mésothéliales jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse inflammatoire pleurale puisqu'elles sont les premières cellules à reconnaître une perturbation dans l'espace pleural. L'inflammation au niveau de la plèvre n'est pas seulement associée à un afflux d'un grand nombre de cellules inflammatoires, mais également à un changement de la perméabilité de la plèvre. Le mésothélium pleural libère des cytokines avec une forte concentration sur la surface apicale, qui dirige la migration des cellules immunitaires dans l'espace pleural. En outre, un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires sont également libérées par les cellules recrutées dans l'espace pleural.

Comme au niveau pulmonaire, la fibrose pleurale est caractérisée par une accumulation excessive de composants de la MEC qui détruisent la structure de la plèvre perturbant les fonctions du mésothélium et de l'espace pleural. La plus forte expression des isoformes de TGF- β au sein des régions fibrosantes dans des biopsies de patients souffrant de fibrose pleurale due à une exposition à l'amiante démontre, là encore, un rôle de cette cytokine dans la fibrogenèse pleurale (184). Dans un contexte fibrosant les cellules mésothéliales participent également au renouvellement de la matrice extracellulaire. Après stimulation par le TGF- β , les cellules mésothéliales peuvent synthétiser du collagène, des protéines matricielles, des MMP (MMP-1 et MMP-9), ainsi que des TIMP démontrant leur rôle actif dans le développement de la fibrose pleurale (185, 186). De plus, le TGF- β inhibe la fibrinolyse en inhibant les activateurs du plasminogène tissulaire (tPA et uPA) et en activant la production

par les cellules mésothéliales des inhibiteurs des activateurs du plasminogène PAI-1 et PAI-2 (187). Le TGF- β a été démontré comme étant présent en grande quantité dans l'empyème, la pleurésie tuberculeuse ou encore les épanchements pleuraux de l'amiante, suggérant un rôle dans la fibrose pleurale associée à ces pathologies (184, 188). En effet, Sasse *et al.* ont montré, chez le lapin, que l'induction d'un empyème par injection d'une souche de *Pasteurella multocida* dans la cavité pleurale conduisait à la formation d'une fibrose pleurale. Dans leur modèle, le taux de TGF- β 1 dans les lavages pleuraux était corrélé à l'épaisseur pleurale. De plus, ils ont montré que l'augmentation de TGF- β 1 était préalable à l'apparition de l'épaississement pleural et à l'augmentation du nombre de fibroblastes (188). Cette même équipe, en utilisant leur modèle de fibrose pleurale, a montré le rôle central de TGF- β 1 en injectant des anticorps monoclonaux bloquant ce-dernier. Les animaux ayant reçu ces anticorps présentaient un degré de fibrose beaucoup plus faible que les contrôles ayant reçu uniquement la bactérie *Pasteurella multocida* (189). En outre, il a été démontré que l'administration intrapleurale du TGF- β était capable d'induire une fibrose pleurale dans divers modèles animaux (190, 191).

3- Intérêt de l'étude de la plèvre dans le FPI

a- La plèvre dans les modèles classiques de fibrose pulmonaire

Le modèle de fibrose pulmonaire le plus répandu est le modèle à la bléomycine comme nous l'avons vu. Les fibroses induites par la bléomycine chez le rongeur ont souvent une atteinte de la région sous-pleurale. En analysant l'histologie des poumons dans les très nombreuses études menées sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, et quand les photographies montrent la région pleurale, on peut observer que souvent la fibrose est prédominante dans la région sous-pleurale. Dans une étude menée sur la comparaison de l'administration de la bléomycine par les voies sous-cutanées, intraveineuses, intra-trachéales ou sous-cutanées en utilisant des pompes osmotiques (permettant une diffusion continue), il a été montré que la fibrose débutait au niveau des régions sous-pleurales sauf avec les injections intra-trachéales (Figure 16). En effet, avec les injections intra-trachéales, des sites d'initiation sont retrouvés dans l'ensemble du poumon bien qu'une forte densité de fibrose soit tout de même localisée aussi au niveau des régions sous-pleurales. Dans ce travail, les injections sous-cutanées et intraveineuses conduisent à la formation de zone de fibrose hétérogène sous

forme d'agrégat éparpillé le long de la région sous-pleurale. L'utilisation de pompe osmotique donnera lieu à une fibrose homogène et continue tout le long de la région sous-pleurale (192). Lors d'une administration intra-trachéale de bléomycine, l'atteinte sous-pleurale est beaucoup moins constante et beaucoup plus hétérogène, manifestement dépendante de la distribution aléatoire de la bléomycine lors de l'injection. Cependant, malgré ces constatations, peu d'auteurs relèvent cette observation pour s'interroger sur le rôle de la plèvre elle-même.

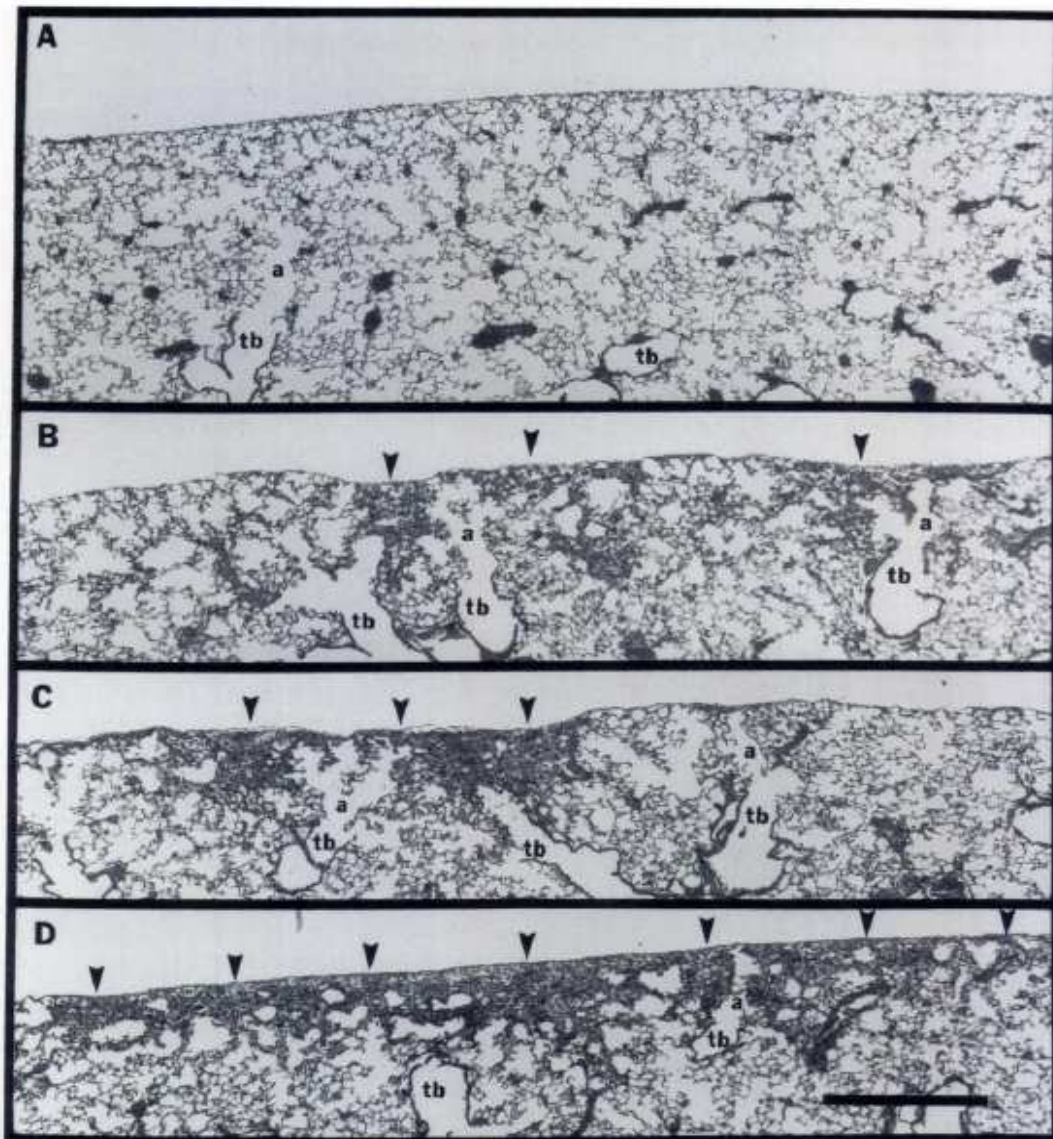


Figure 16 : L'induction d'une fibrose pulmonaire par différentes méthodes d'administration de bléomycine, induit un début de fibrose au sein des régions sous-pleurales.

A : Poumon de souris traité par une solution saline en sous-cutané ; B : Poumon de souris traité à la bléomycine en sous-cutané ; C : Poumon de souris traité à la bléomycine en intra-veineuse ; D : Poumon de souris traité à la bléomycine en sous-cutané avec une mini pompe osmotique (d'après Harrison & Lazo, 1987 (192)).

b- La plèvre dans le FPI chez l'homme

Comme dans les modèles animaux, la FPI débute classiquement dans la région sous-pleurale suggérant un rôle potentiel de la plèvre dans l'initiation de la maladie. Dans une étude sur les pneumonies interstitielles idiopathiques, Nicholson relève que le développement de la fibrose pulmonaire s'effectue dans la région sous-pleurale (193). La FPI observée chez l'homme se propage ainsi dans les poumons à partir de la région sous-pleurale (Figure 17).

Il n'a cependant jamais été montré un rôle de la plèvre ou des cellules mésothéliales dans le développement de la pathologie. Dans l'ensemble des études faites sur la FPI c'est la région sous-pleurale qui est mise en cause et non la plèvre en elle-même qui est incriminée.

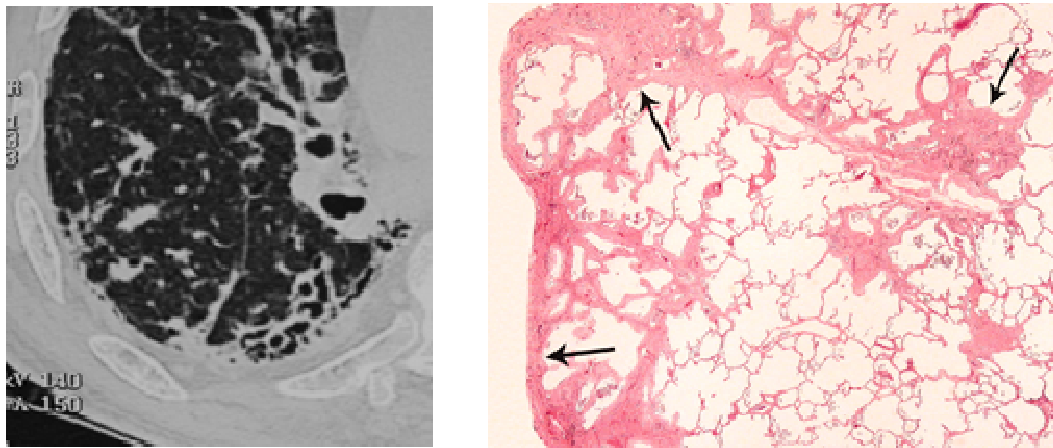


Figure 17 : Début d'FPI localisée dans la région sous-pleurale.

A gauche, un scanner de patient souffrant d'une FPI débutante, montre que cette pathologie débute dans la région sous-pleurale. A droite une coupe histologique de poumon d'un patient souffrant aussi de FPI avec zones fibreuses dans les régions sous-pleurales (d'après Souza *et al.*, 2005 (194)).

De plus, l'analyse de la plèvre chez les patients porteurs d'une FPI montre également que celle-ci est très pathologique, remaniée avec une fibrose et une néo-vascularisation importante (Figure 18).

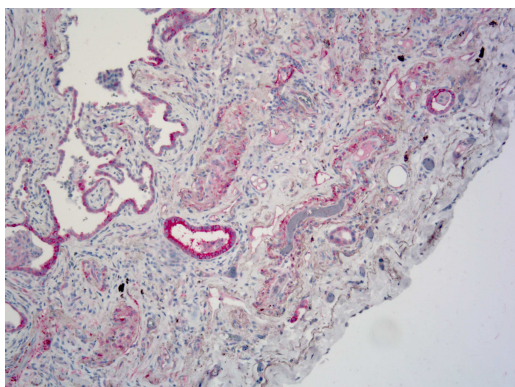


Figure 18. Coupe histologique de biopsie pulmonaire réalisée chez un patient souffrant de FPI.

La plèvre comme la région sous-pleurale apparaît très épaissie et remaniée.

c- Notre modèle de fibrose pleurale

Au sein de notre équipe, un modèle de fibrose pleurale chez le rat et la souris a été développé (11). Il utilise les adénovirus permettant l'expression transitoire de TGF- β 1 (AdTGF- β 1). Ces adénovirus sont administrés directement dans l'espace pleural. Cette administration se fait sans chirurgie, évitant ainsi des saignements et une éventuelle inflammation qui pourrait entraîner des adhésions pleurales et des pleurodèses. Elle se fait par simple injection, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille, sur le flan droit au niveau du sixième espace intercostal. Afin de valider cette méthode et de montrer que les adénovecteurs infectaient seulement les cellules mésothéliales, des adénovirus codant pour l'enzyme LacZ ont été utilisés. Ce gène code pour la β -galactosidase capable d'hydrolyser le lactose et le galactose. La β -galactosidase peut donc hydrolyser le X-Gal (un galactoside) et former ainsi par oxydation un composé bleu, qui précipite sur le lieu de l'hydrolyse et qui sera par conséquent facilement observable. Dans notre modèle, la coloration bleue apparaît donc au sein des cellules infectées par les adénovirus produisant en abondance la β -galactosidase. Cette méthode a confirmé que les adénovirus infectaient uniquement les cellules mésothéliales et ce de façon transitoire, c'est-à-dire pendant environ quatorze jours (Figure 19).

Après administration d'AdTGF- β 1 suivant cette méthode, la surexpression de TGF- β 1 dans l'espace pleural induit une fibrose pleurale progressive. La progression de la fibrose a été observée jusqu'à J64 (Figure 20). L'effet de l'injection ayant été naturellement stoppé autour du 14^{ème} jour, il est probable que la fibrose continue de se développer en raison d'un environnement profibrosant favorable avec une auto-induction du TGF- β 1 (160, 195). En observant non seulement la plèvre mais aussi les régions sous pleurales, notre équipe a montré qu'il existait une progression de la fibrose dans le parenchyme pulmonaire. La forte présence de la protéine HSP47 (Heat Shock Protein 47), chaperon du collagène, dans les régions pleurales mais également sous-pleurales à J64 montre bien que le processus de fibrose est toujours actif et que le collagène continue de s'accumuler.

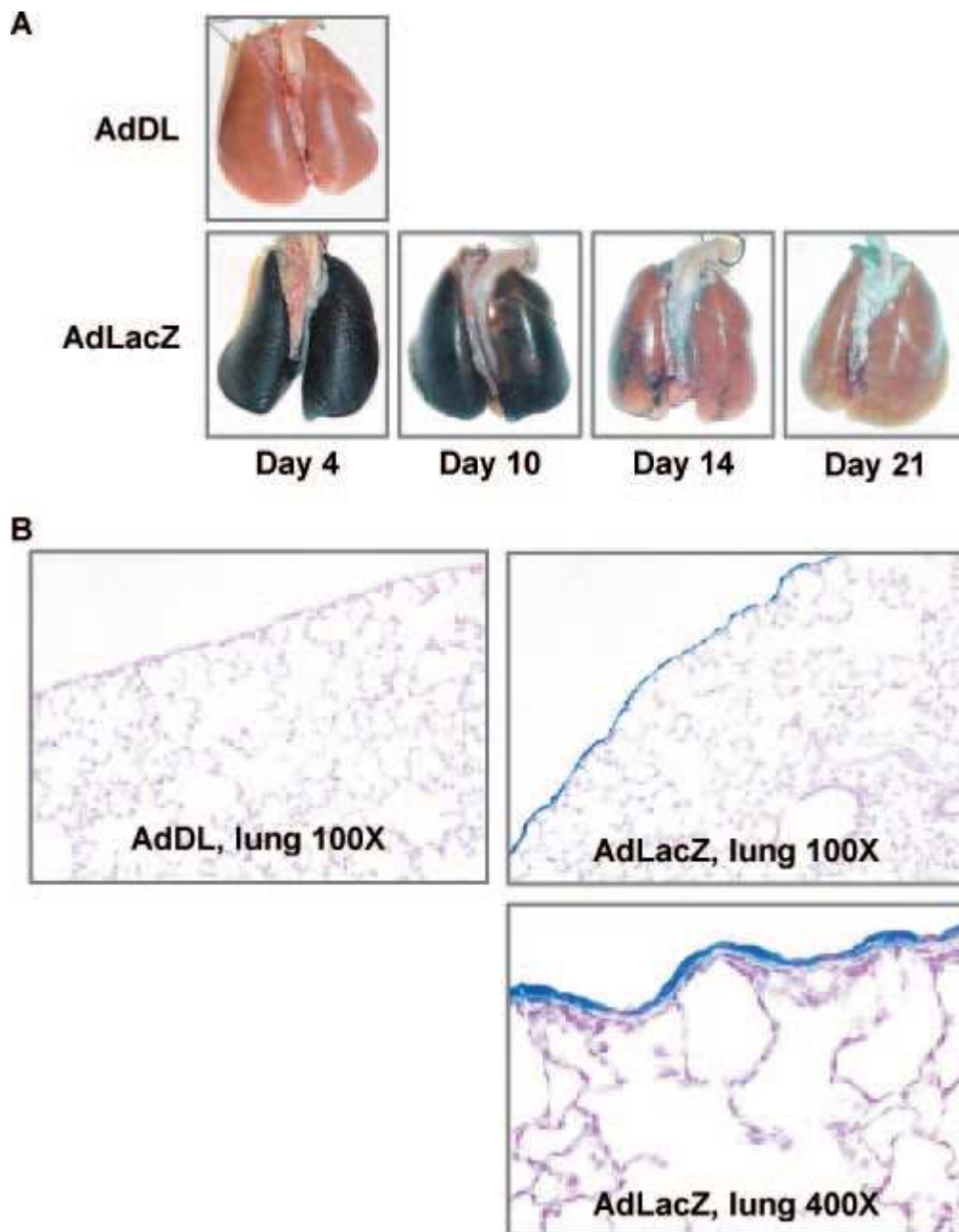


Figure 19 : Administration intra-pleurale d'adénovirus codant la β -galactosidase

A : Photo de poumon de rats 4, 10, 14 et 21 jours après avoir reçu une injection intra-pleurale d'adénovirus vide (contrôle, AdDL) ou d'adénovirus codant la β -galactosidase (AdLacZ).

B : Coupe histologique de poumon de rats 4 jours après administration intra-pleurale d'AdDL ou d'AdLacZ. La contre coloration est faite avec du Nuclear fast Red.

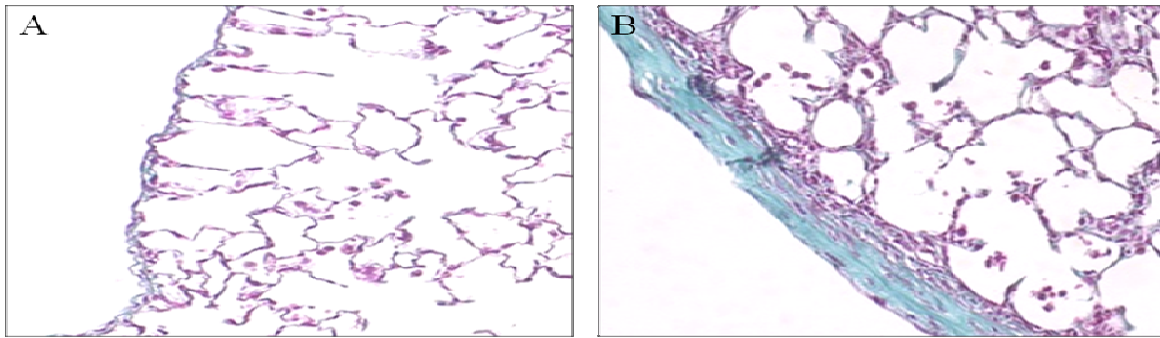


Figure 20 : Modèle de fibrose pleurale induite par le TGF- β 1

Coupe histologique de poumon de rat marqué au trichrome de Masson, 64 jours après avoir reçu une injection intra-pleurale d'adénovirus. A : Poumon de rat ayant reçu une injection intra-pleurale d'adénovirus vide (AdDL). B : Poumon de rat ayant reçu une injection intra-pleurale d'adénovirus codant pour TGF- β 1 (AdTGF- β 1) (d'après Décologne *et al.*, 2007 (11)).

Ce modèle a aussi permis de montrer, pour la première fois *in vivo*, que les cellules mésothéliales pleurales pouvaient subir une EMT. L'EMT, dans notre modèle, a été mis en évidence grâce à un marquage immunohistofluorescent. Les cellules mésothéliales étaient reconnues par la cytokératine 18 et les myofibroblastes avec l' α -SMA (figure 21). Des cellules doubles positives étaient abondantes dès le dixième jour après l'administration d'AdTGF- β 1 au niveau de la plèvre et de la région sous pleurale suggérant la transformation des cellules mésothéliales en myofibroblastes.

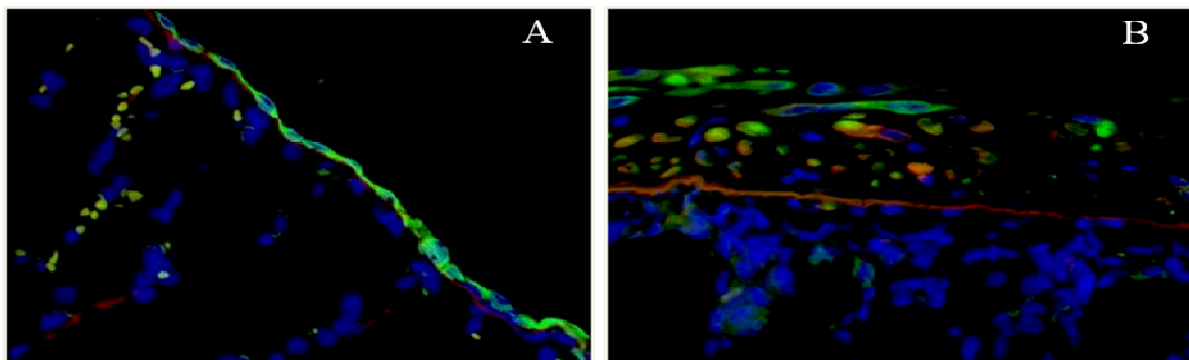


Figure 21 : Les cellules mésothéliales peuvent subir une EMT *in vivo*

Marquage immunofluorescent de coupe histologique de poumon de rat 14 jours après avoir été traité avec un adénovirus vide (A) ou un adénovirus codant pour le TGF- β 1 (B). Les cellules mésothéliales marquées avec de la cytokératine 18 (en vert) forment un feuillet homogène chez les animaux contrôles (A). L' α -SMA (en rouge) est très peu exprimée en condition non pathologique (A) mais présente au niveau de la plèvre lors du développement de la fibrose pleurale induite par le TGF- β 1 (B). Des cellules doubles positives sont visibles au sein de la plèvre épaissie suggérant que les cellules mésothéliales subissent une EMT (d'après Décologne *et al.*, 2007 (11)).

d- Rôle potentiel de la plèvre et des cellules mésothéliales dans la FPI

La progression de la fibrose au sein même du parenchyme dans notre modèle de fibrose pleurale ressemble au phénotype observé chez les patients souffrant de FPI. Pour la première fois, ce modèle suggère que la plèvre pourrait avoir un rôle dans l'initiation et la progression de l'IPF. Cette hypothèse a été consolidée par un autre modèle de fibrose pleurale induit par la co-administration de bléomycine et de nanoparticules de carbone développé dans notre équipe (196). L'équipe du Dr. Veena Antony a montré très récemment que, dans des biopsies de poumons de patient souffrant de FPI, des cellules positives pour la calrétinine, un marqueur des cellules mésothéliales, pouvaient être trouvées dans les zones fibreuses des poumons (197). Le nombre de cellules mésothéliales présentes dans les poumons était corrélé avec la sévérité de la pathologie. Cette même équipe a ensuite marqué des cellules mésothéliales pleurales de souris avec de la GFP et les a injectées dans la cavité pleurale alors que du TGF- β 1 ou du NaCl (souris contrôles) était administré par voie nasale aux mêmes animaux afin de créer une fibrose pulmonaire. Des cellules marquées GFP ont été retrouvées dans les lavages broncho-alvéolaires des souris ayant reçu du TGF- β 1 mais pas chez les souris ayant reçu du NaCl. Ces résultats semblent confirmer que les cellules mésothéliales ont la capacité de migrer de l'espace pleural vers le parenchyme pulmonaire. En utilisant le même modèle, ils ont montré que certaines de ces cellules mésothéliales, retrouvées dans le parenchyme, exprimaient le marqueur α -SMA. Ceci suggère que ces cellules auraient subi une EMT.

L'ensemble de ces études, ajoutées à l'observation de la localisation sous-pleurale de l'initiation de la fibrose pulmonaire chez les patients souffrant de FPI et dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire, laisse penser que la plèvre joue un rôle peut être non négligeable dans cette pathologie, du moins dans son initiation. Le rôle des cellules mésothéliales dans ce processus semble dû à leur facilité à subir une EMT et à migrer dans le parenchyme pulmonaire. L'ensemble des myofibroblastes présents dans la fibrose pulmonaire ne sont à l'évidence pas tous issus des cellules mésothéliales puisque beaucoup d'études ont déjà démontré la possibilité de leur origine épithéliale ou fibroblastique, comme nous l'avons décrit précédemment. Les cellules mésothéliales pourraient cependant contribuer à la formation d'un environnement pro-fibrotique au sein du parenchyme pulmonaire.

IV- Les Heat Shock Proteins

1- La réponse cellulaire au stress

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est essentiel pour le bon fonctionnement des cellules. Cependant, ces dernières sont en permanence soumises à diverses agressions qui menacent leur intégrité. L'état de stress des cellules peut être provoqué par de nombreux facteurs environnementaux (choc thermique, choc oxydatif, UV), l'exposition à des agents pharmacologiques (métaux lourds, alcool, agents oxydants, chimiothérapies anti-cancéreuses) ou encore certaines conditions pathologiques (fièvre, inflammation). Ces stress physiques, chimiques ou physiologiques induisent, dans la cellule, une modification de l'expression de certains gènes appelée *réponse de choc thermique* ou *réponse de stress*. La réponse de choc thermique a été mise en évidence en 1964 chez la drosophile (12). Elle est caractérisée par l'expression d'une famille particulière de protéines, les protéines de choc thermique ou protéines de stress également appelées *Heat shock proteins* (HSP). Les HSP sont des protéines cellulaires très conservées d'une espèce à l'autre et sont retrouvées aussi bien chez les bactéries, les levures, les plantes et les animaux que chez l'homme. Alors que les HSP représentent déjà 2 à 3% des protéines cellulaires totales à l'état basal, leur expression est fortement induite en condition de stress. Leur induction se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription, *heat shock factors* (HSF), qui ont la capacité de lier l'ADN sur des sites spécifiques, les *heat shock elements* (HSE), promoteurs des HSPs (198). HSF1 est le membre de la famille HSF responsable de l'induction de la réponse au stress grâce à l'activation de l'expression des protéines de choc thermique. En condition de stress, HSF1 se trimérise, s'accumule dans le noyau, et se lie aux HSE situés dans les régions promotrices des gènes *hsp* (Figure 22). Les HSE se composent de plusieurs répétitions adjacentes et inversées de la séquence -NGAAN-. L'activation de la transcription a lieu lors de la phosphorylation des trimères de HSF1 (199).

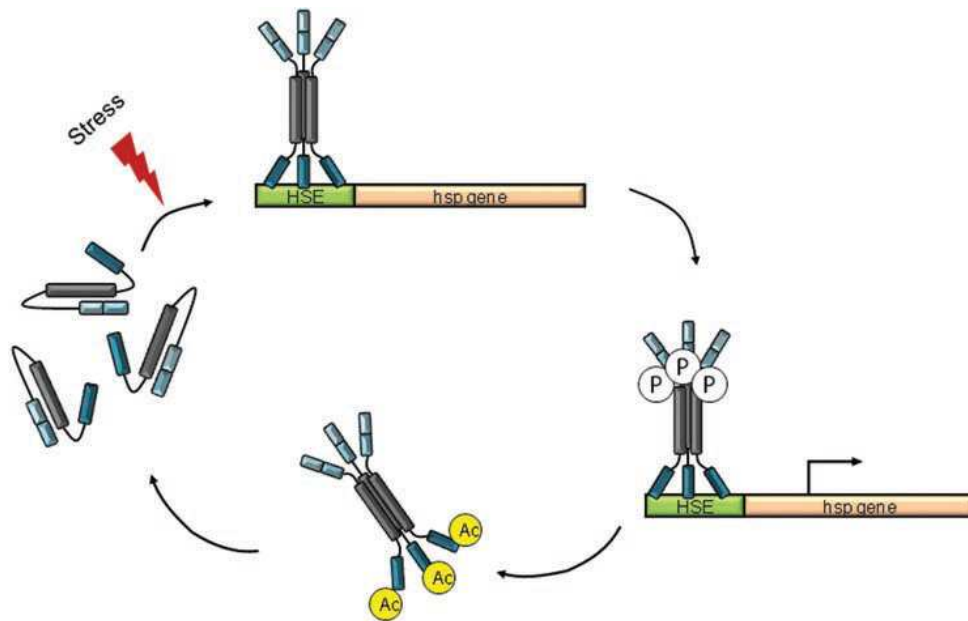


Figure 22 : Activation de la réponse cellulaire au stress par HSF1

Le stress cellulaire induit la relocalisation des trimères de HSF1 dans le noyau où ils se lient aux HSE et subissent une étape de phosphorylation pour activer la transcription des HSP. Le lien HSE-HSF1 peut être rompu par les HSP elles mêmes ou par l'acétylation de HSF1 afin d'atténuer la réponse au stress une fois les conditions revenues à la normale (d'après Westerheide et al., 2012 (199))

L'atténuation de la réponse au stress est importante, car la surexpression des HSP peut être nocive pour la cellule. Cette atténuation est régie par un double mécanisme impliquant une rétro-inhibition négative par les HSP elles mêmes (200) et par l'acétylation d'un résidu lysine, dans le domaine de liaison à l'ADN de HSF1 causant sa perte d'affinité pour l'ADN (201). HSF1 peut ensuite être déacétylée pour pouvoir de nouveau se lier à l'ADN.

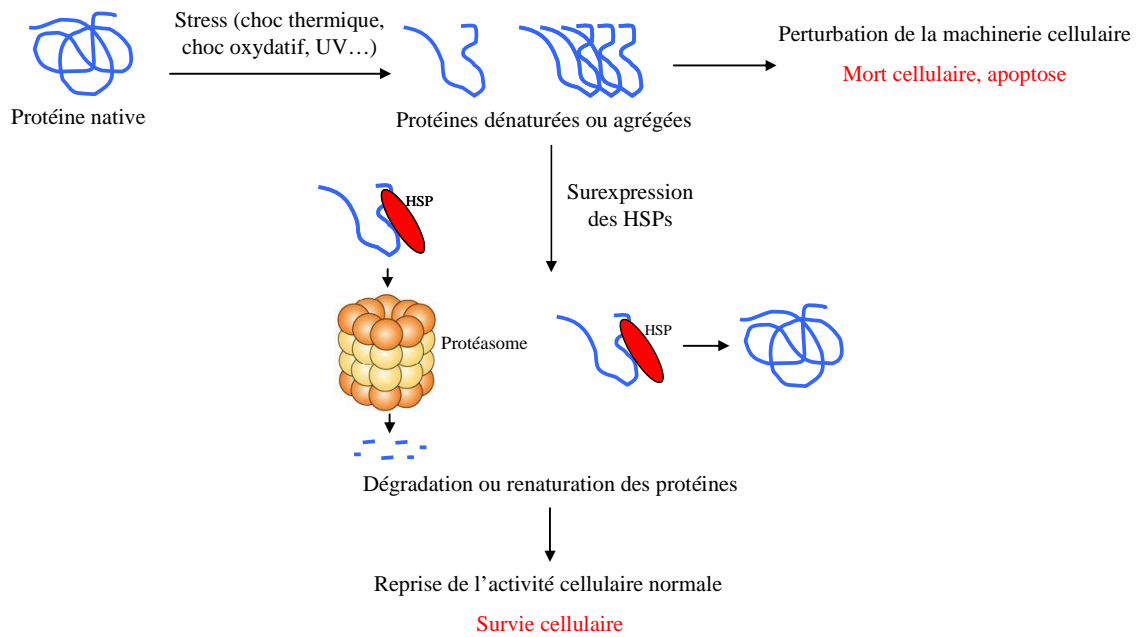


Figure 23 : Activité protectrice des HSPs sur la cellule en condition de stress

Lors d'un stress, les protéines sont dénaturées et peuvent s'agréger perturbant la cellule et pouvant conduire à sa mort. La surexpression des HSP en cas de stress permet la survie cellulaire en renaturant les protéines mal conformées ou en les orientant vers le protéasome où elles seront détruites.

La première étape de la réponse cellulaire au stress conduit à la dénaturation des protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats protéiques insolubles (202). L'accumulation de protéines dénaturées dans le cytoplasme perturbe la machinerie cellulaire et entraîne leur mort. La seconde étape, conduit à l'activation de la transcription de HSP par les HSF. En effet, il a été montré que l'expression des HSP pouvait être induite par l'injection intracellulaire de protéines dénaturées (203). De manière générale, les HSP sont capables de prendre en charge ces protéines défectueuses et peuvent les aider à retrouver une conformation correcte ou encore les guider vers le protéasome où elles seront détruites afin de protéger la cellule et ainsi éviter sa mort (204). Cette fonction commune des HSP est caractérisée par le terme de *chaperon moléculaire*. Cette étape, dite de récupération, est la phase durant laquelle les altérations morphologiques sont corrigées permettant aux protéines détériorées de retrouver leur activité initiale (202). Une fois les conditions physiologiques de la cellule retrouvées, les gènes *hsp* ne sont plus activés et le niveau protéique en HSP retourne rapidement à l'état basal.

Par ailleurs, certaines HSP ont aussi un rôle important dans le mécanisme de mort cellulaire programmée appelé apoptose, en régulant positivement ou négativement l'activité des

protéines pro-apoptotiques comme les caspases. Ces activités permettent une protection de la cellule face aux agressions qu'elle subit.

Enfin, les HSPs peuvent également avoir un rôle néfaste dans le cas du cancer, en favorisant la survie des cellules cancéreuses et en induisant une certaine résistance aux agents anti-tumoraux.

Cependant, la fonction de chaperon des HSPs n'intervient pas uniquement en cas de stress. En effet, certaines de ces protéines sont exprimées constitutivement et interviennent dans le « folding » des protéines immatures, la stabilisation des protéines matures ou immatures, la translocation au sein d'organelle comme la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique, le réarrangement des oligomères protéiques, la dissolution des agrégats protéiques et enfin la dégradation et le renouvellement des protéines (14).

2- Classification des HSP

Chez les mammifères, les protéines de choc thermique sont classées en six grandes familles en fonction de leur masse moléculaire : la famille des petites protéines de stress (sHSP (small HSP)), la famille d'HSP47, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110. La dénomination des HSP reste un sujet controversé et toujours discuté. En 2009, Kampinga *et al.* proposent une nouvelle directive pour la nomenclature des HSP. Cette nomenclature est essentiellement basée sur la nomenclature HUGO Gene Nomenclature Committee (GNC) (205). Cette nouvelle nomenclature ne fait pas l'unanimité quant à l'utilisation d'une seule dénomination par HSP mais permet en revanche, lorsque l'on rencontre la dénomination d'une HSP, de connaître tous ses autres noms (Figure 24).

Bien que les HSP partagent un grand nombre de propriétés communes, chaque famille présente en plus de la différence de poids moléculaire, des particularités qui leur sont propres comme par exemple : leur localisation cellulaire, leur expression qui peut être constitutive ou fortement inductible, leur dépendance ou non à l'ATP, leur spécificité de substrat ainsi que le type de pathologies dans lesquelles elles peuvent être impliquées.

Table 1 HSP70 superfamily: HSPA (HSP70) and HSPH (HSP110) families

	Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
HSP A					
1	<i>HSPA1A</i>	HSPA1A	HSP70-1; HSP72; HSPA1	3303	193740
2	<i>HSPA1B</i>	HSPA1B	HSP70-2	3304	15511
3	<i>HSPA1L</i>	HSPA1L	hum70t; hum70t; Hsp-hom	3305	15482
4	<i>HSPA2</i>	HSPA2	Heat-shock 70kD protein-2	3306	15512
5	<i>HSPA5</i>	HSPA5	BIP; GRP78; MIF2	3309	14828
6	<i>HSPA6</i>	HSPA6	Heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	3310	X
7	<i>HSPA7^a</i>	HSPA7	Heat shock 70kD protein 7	3311	X
8	<i>HSPA8</i>	HSPA8	HSC70; HSC71; HSP71; HSP73	3312	15481
9	<i>HSPA9</i>	HSPA9	GRP75; HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2	3313	15526
10	<i>HSPA12A</i>	HSPA12A	FLJ13874; KIAA0417	259217	73442
11	<i>HSPA12B</i>	HSPA12B	RP23-32L1.5.1; 2700081N06Rik	116835	72630
12	<i>HSPA13^b</i>	HSPA13	Stch	6782	110920
13	<i>HSPA14</i>	HSPA14	HSP70-4; HSP70L1; MGC131990	51182	50497
HSP H					
1	<i>HSPH1</i>	HSPH1	HSP105	10808	15505
2	<i>HSPH2^b</i>	HSPH2	HSPA4; APG-2; HSP110	3308	15525
3	<i>HSPH3^b</i>	HSPH3	HSPA4L; APG-1	22824	18415
4	<i>HSPH4^b</i>	HSPH4	HYOU1/Grp170; ORP150; HSP12A	10525	12282

^aAnnotated as pseudogene, but possibly a true gene^bUnder consultation with HGNC and the scientific community**Table 3** The HSPB family (small heat shock proteins)

	Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
1	<i>HSPB1</i>	HSPB1	CMT2F; HMN2B; HSP27; HSP28; HSP25; HS.76067; DKFZp586P1322	3315	15507
2	<i>HSPB2</i>	HSPB2	MKBP; HSP27; Hs.78846; LOH11CR1K; MGC133245	3316	69253
3	<i>HSPB3</i>	HSPB3	HSPL27	8988	56534
4	<i>HSPB4^a</i>	HSPB4	crystallin alpha A; CRYAA; CRYA1	1409	12954
5	<i>HSPB5^a</i>	HSPB5	crystallin alpha B; CRYAB; CRYA2	1410	12955
6	<i>HSPB6</i>	HSPB6	HSP20; FLJ32389	126393	243912
7	<i>HSPB7</i>	HSPB7	evHSP; FLJ32733; DKFZp779D0968	27129	29818
8	<i>HSPB8</i>	HSPB8	H11; HMN2; CMT2L; DHMN2; E2IG1; HMN2A; HSP22	26353	80888
9	<i>HSPB9</i>	HSPB9	FLJ27437	94086	75482
10	<i>HSPB10^a</i>	HSPB10	ODF1; ODF; RT7; ODF2; ODFP; SODF; ODF27; ODFPG; ODFPGA; ODFPGB; MGC129928; MGC129929	4956	18285
11	<i>HSPB11</i>	HSPB11	HSP16.2; C1orf41; PP25	51668	72938

^aUnder consultation with HGNC and the scientific community**Table 4** The HSP90/HSPC family

	Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
1	<i>HSPC1^a</i>	HSPC1	HSP90AA1; HSPN; LAP2; HSP86; HSPC1; HSPCA; HSP89; HSP90; HSP90A; HSP90N; HSPCAL1; HSPCAL4; FLJ31884	3320	15519
2	<i>HSPC2^a</i>	HSPC2	HSP90AA2; HSPCA; HSPCAL3; HSP90ALPHA;	3324	X
3	<i>HSPC3^a</i>	HSPC3	HSP90AB1; HSPC2; HSPCB; D6S182; HSP90B; FLJ26984; HSP90-BETA	3326	15516
4	<i>HSPC4^a</i>	HSPC4	HSP90B1; ECGP; GP96; TRA1; GRP94; endoplasmic	7184	22027
5	<i>HSPC5^a</i>	HSPC5	TRAP1; HSP75; HSP90L	10131	68015

^aUnder consultation with HGNC and the scientific community**Figure 24** : Nomenclature des différentes HSPs (d'après Kampinga *et al.*, 2009 (205))

3- Les HSPs comme cibles thérapeutiques ?

Du fait de leur surexpression et de leur rôle en condition de stress, il n'est pas étonnant que les HSP aient un impact sur l'évolution de différentes maladies. Cependant, contrairement à ce que l'on pourrait penser, les HSP n'exercent pas toujours un rôle bénéfique dans un contexte pathologique.

Dans les maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation de protéines devenues anormales et détruisant les neurones, les HSP semblent avoir le pouvoir de réduire les agrégats de protéines mutées et semblent même favoriser leur dégradation par le protéasome (206). Dans ce cas, les HSP ont donc un rôle protecteur puisqu'elles empêchent l'accumulation de protéines dénaturées toxiques pour la cellule.

Cependant, de nombreuses HSP sont largement exprimées par les cellules cancéreuses et permettent de favoriser leur survie en interférant avec l'activité de nombreuses substances anti-cancéreuses. De plus, *via* leur activité de chaperon moléculaire, les HSP permettent d'accroître la résistance des cellules tumorales à l'apoptose et aux agents de chimiothérapie, favorisent leur échappement au système immunitaire et favorisent la formation des métastases.

De nombreuses études sont donc en cours pour détruire cette activité délétère des HSP dans les cancers sans pour autant déclencher le développement d'autres maladies qui pourraient être empêchées par ces mêmes protéines. Les HSP sont donc de nouvelles cibles thérapeutiques dans de nombreuses maladies incluant les cancers. De nouveaux inhibiteurs des HSP ont été récemment découverts et sont aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches.

Le 17-AAG, inhibiteur de HSP90, est actuellement en essai clinique de phase III et des résultats montrent son effet sur la régulation de l'apoptose et notamment l'activation des caspases dans les cellules tumorales (207). De même, l'OGX-427, inhibiteur de HSP27, en essai clinique de phase II montre des résultats intéressants sur de nombreux cancers (vessie, prostate) en limitant la croissance tumorale, la formation de métastases et en sensibilisant les cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques (208).

L'étude des HSPs suscite un intérêt important pour la recherche actuelle. La compréhension des mécanismes d'intervention de ces protéines particulières dans des pathologies aussi diverses que les maladies neurodégénératives et les cancers constitue un point important dans

l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Il n'est donc pas surprenant que l'étude des protéines de choc thermique dans les maladies pulmonaires soit en plein essor.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons décrire les principales HSP et leurs implications dans les processus de la fibrose. Nous aborderons donc le rôle d'HSP47 et HSP110, ainsi que celui des deux grandes familles HSP90 et HSP70. Puis nous parlerons des petites protéines de stress HSP27 et α B-crystallin.

4- HSP90

HSP90 est la protéine la plus abondante dans les cellules eucaryotes puisqu'elle représente environ 1% du pool de protéines totales (209). La famille HSP90 est composée de 4 membres principaux : TRAP1 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Protein 1), GP96 (Glycosylated Protein 96), HSP90 α et HSP90 β . Tous les membres de cette famille de protéines peuvent être induits par divers stress cellulaires et leur activité nécessite de l'ATP.

Le rôle de **TRAP1** n'est, encore aujourd'hui, pas toujours très bien compris. Cette protéine est connue pour avoir une localisation mitochondriale, néanmoins, malgré ces similitudes avec HSP90 elle n'interagit avec aucune protéine cliente de la famille HSP90.

GP96 est une protéine chaperonne localisée et séquestrée dans le réticulum endoplasmique grâce à une séquence de rétention (KDEL) située en C-terminal, où elle peut prendre en charge les protéines et aider leur maturation et leur repliement correct. Récemment, il a été montré que GP96 pouvait agir sur l'activation du système immunitaire. En effet, certaines études rapportent que GP96 pourrait participer à la présentation d'antigènes grâce à son rôle de chaperon des antigènes anti-tumoraux (210).

HSP90 α (HSP86) et **HSP90 β** (HSP84) sont les membres principaux de cette famille. Ces deux isoformes proviennent de la duplication du gène originel et présentent 86% d'homologie entre elles. Pendant de nombreuses années, les études ne faisaient pas de différence entre ces deux isoformes. Cette protéine est constituée de trois grandes régions :

- un domaine N-terminal comprenant le site de fixation de l'ATP. La poche de fixation de l'ATP d'HSP90 est particulière et possède un motif appelé « Bergerat fold » que l'on ne retrouve pas chez les autres domaines ATPase.
- un domaine central impliqué dans la reconnaissance des protéines clientes
- un domaine C-terminal responsable de la dimérisation

HSP90 agit essentiellement en homodimère α - α ou β - β mais peut dans certains cas agir en hétérodimère ou sous forme de monomère.

HSP90 a un rôle de chaperon moléculaire en se fixant à plus d'une centaine de protéines, dites « protéines clientes ». Elle permet, par cette fixation, de stabiliser et d'empêcher l'agrégation de ses protéines clientes. Succinctement, HSP90 sous forme de dimère flexible, est capable de fixer une protéine cliente (Figure 25), puis sous l'effet de l'hydrolyse de l'ATP, elle change de conformation entraînant la stabilisation de sa protéine cliente au bout de plusieurs cycles (211). HSP90 exerce son activité de chaperon en étroite collaboration avec d'autres protéines, en particulier HSP70 et son co-chaperon HSP40. Elle est aussi impliquée dans la stabilisation du cytosquelette en s'associant à la fois à l'actine et à la tubuline. Cette interaction avec les microfilaments permet de préserver l'intégrité cellulaire après un stress et le transport intracytoplasmique de protéines (212), suggérant un rôle de HSP90 dans le réarrangement du cytosquelette souvent observé lors de la fibrogenèse.

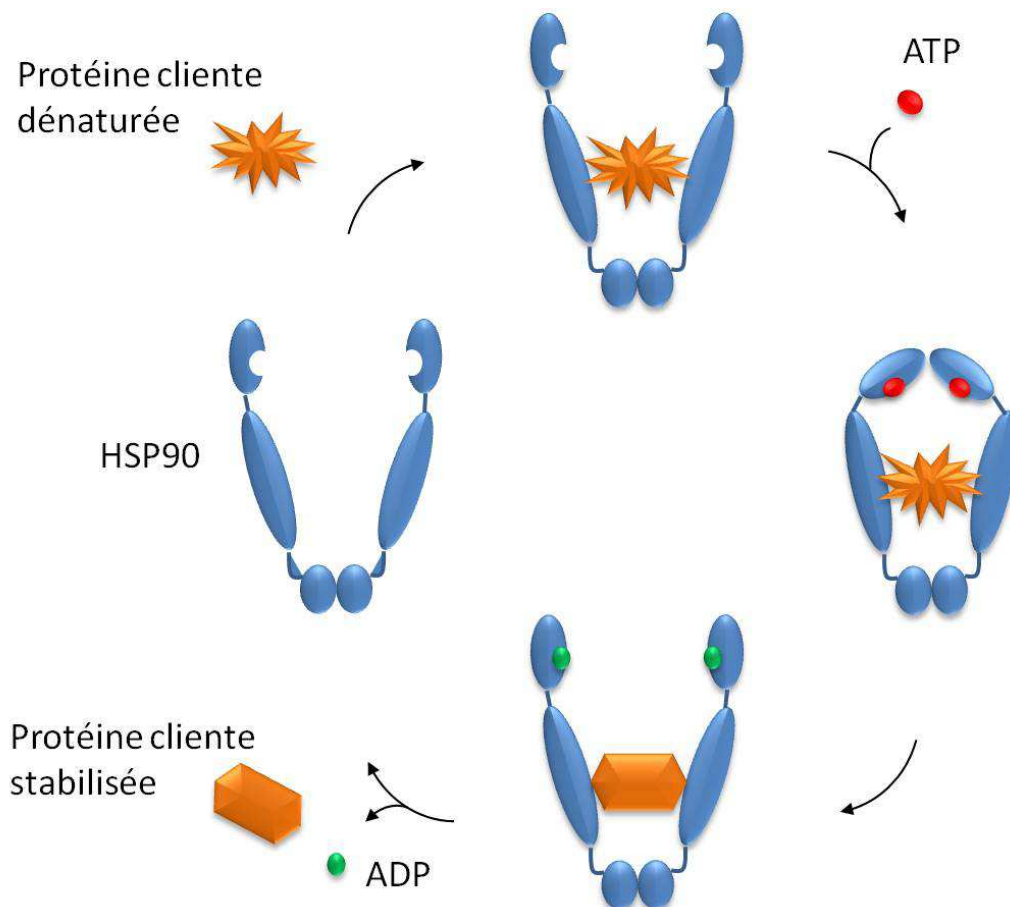


Figure 25 : Représentation schématique du mode d'action d'HSP90

Une fois qu'HSP90 s'est liée à une de ses protéines clientes dénaturées, la fixation ainsi que l'hydrolyse de l'ATP entraînera un changement de conformation d'HSP90 permettant le « re-folding » de la protéine cliente. Une fois stabilisée, la protéine sera libérée (d'après Pearl & Prodromou, 2006 (211))

La découverte d'inhibiteurs spécifiques d'HSP90 a donné un nouvel intérêt clinique à cette protéine. Le 17-AAG (17-(allylamino)-17-déméthoxygeldanamycine), dérivé de la geldanamycine, est un composé chimique capable de se lier spécifiquement au site de liaison de l'ATP de HSP90 inhibant ainsi son activité. Ce composé est maintenant en cours de test dans des essais cliniques de phase III pour ses propriétés anti-tumorales. Le 17-AAG présente un fort potentiel thérapeutique puisque l'inhibition de HSP90 pourrait sensibiliser les cellules à des agents cytotoxiques utilisés pour la chimiothérapie. En outre, dans la cellule cancéreuse, l'affinité de HSP90 pour l'ATP est augmentée de 100 fois. Comme 17-AAG imite l'ATP, son affinité dans des cellules tumorales est améliorée donnant une spécificité anti-tumorale à cet inhibiteur (213).

Bien que le nombre d'études reliant HSP90 et fibrogenèse soit limité, certains articles récents rapportent un effet bénéfique des inhibiteurs d'HSP90 sur la fibrose tissulaire. Noh *et al.* ont démontré, *in vitro*, en utilisant une lignée de cellules épithéliales rénales stimulées par le TGF- β 1 mais également *in vivo* dans un modèle murin de fibrose rénale, que le 17-AAG était capable de prévenir les événements de l'EMT tels que la surexpression d' α -SMA et des composants de la MEC (fibronectine et collagène I) ainsi que la perte de l'E-cadhérine (214). Des résultats similaires ont été observés dans la fibrose hépatique où l'inhibiteur d'HSP90 empêchait l'activation et réduit la survie des « hepatic stellate cells (HSCs) », des cellules particulières apparentées aux myofibroblastes qui sont les principaux participants à la fibrose hépatique. En effet, le 17-AAG peut induire l'inhibition de l'expression du collagène I et de l' α -SMA et favorise l'apoptose des HSCs *in vitro* (215).

En outre, au niveau pulmonaire, l'inhibiteur d'HSP90 induisait une abrogation totale de l'EMT dans les cellules pulmonaires (A549 et H658) en inhibant la baisse de l'E-cadhérine et la surexpression des N-cadhérines, α -SMA et de la vimentine induite par le TGF- β 1. Ces résultats ont été corrélés avec l'inhibition des changements induits par le TGF- β 1 dans la morphologie et la formation de fibres de stress dans les cellules A549 qui pourraient être d'importance dans le contexte de la fibrose (216). De plus, Banh *et al.* ont montré que le traitement d'explants de cristallin par choc thermique induisait l'expression d'HSP90 et les protégeait de l'EMT. L'apoptose induite par le TGF- β 1 dans ces explants était également réduite après choc thermique comparé aux explants contrôles (217).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle d'HSP90 dans le processus de fibrose. De récents articles basés sur des lignées de cellules pulmonaires et rénales ont montré que le 17-AAG pouvait bloquer l'ensemble des voies de signalisation du TGF- β 1 incluant l'inhibition de Smad2/3, Akt, GSK-3 β , et de la phosphorylation de ERK (214, 216, 218, 219). En condition normale, HSP90 exerce un rôle protecteur grâce à ses fonctions de chaperon pour les récepteurs au TGF- β 1 (T β RII principalement, Figure 26). Le 17-AAG, en inhibant HSP90, contrait se rôle protecteur d'HSP90 en diminuant l'interaction entre HSP90 et T β RII et conduisant à la dégradation de T β RII par le système ubiquitine-protéasome. Les auteurs ont identifié la protéine à activité E3-ubiquitine ligase, Smurf2, comme responsable de la dégradation T β RII en l'absence de HSP90. En effet, sans la protection d'HSP90, Smurf2 est capable de se lier au T β RII et d'induire son ubiquitination gouvernant sa dégradation par le protéasome (214, 218, 219).

Comme les HSCs ont été démontrés comme étant les principaux acteurs de la fibrose hépatique, leur inactivation et l'induction de leur apoptose est devenue une stratégie thérapeutique antifibrotique importante. Divers inhibiteurs chimiques d'HSP90 (17-AAG, VER-49009 et VER-49009M) ont montré leur action sur l'inhibition de la prolifération (220) et la favorisation de l'apoptose (215) des HSCs. Les HSCs activés sont les producteurs les plus importants de composants de la MEC au cours de la fibrose hépatique et NF κ B est un médiateur essentiel pour l'activation et la survie de ces cellules (221). Au cours de l'activation des HSCs, HSP90 chaperone le récepteur des glucocorticoïdes (GR), qui est un partenaire de liaison à la fois d'HSP90 et de NF κ B. Cette séquestration du GR par HSP90 libère NF κ B et favorise sa translocation nucléaire résultant en une activation des HSCs. Dans ce contexte, l'inhibition d'HSP90 par le 17-AAG favorise la formation du complexe GR/NF κ B et empêche l'activation de la signalisation NF κ B (215). En outre, le 17-AAG inhibe l'activation de la protéine Akt, protéine cliente d'HSP90, qui participe également à l'activation de NF κ B (215, 220). Par conséquent, l'inhibition d'HSP90 peut induire l'apoptose des HSCs en perturbant la signalisation NF κ B de deux manières distinctes, en induisant la formation du complexe GR/NF κ B et en inactivant Akt (Figure 26). En plus de leur apoptose, le 17-AAG peut également supprimer l'activation des HSCs, puisqu'il réduit l'expression d' α -SMA et du collagène I induite le par TGF- β 1 dans ces cellules.

Même si la plupart des ces études n'ont pas encore été réalisées dans des modèles de fibrose pulmonaire, la littérature démontre le rôle important d'HSP90 dans les processus de fibrose tel que l'EMT et la voie de signalisation du TGF- β .

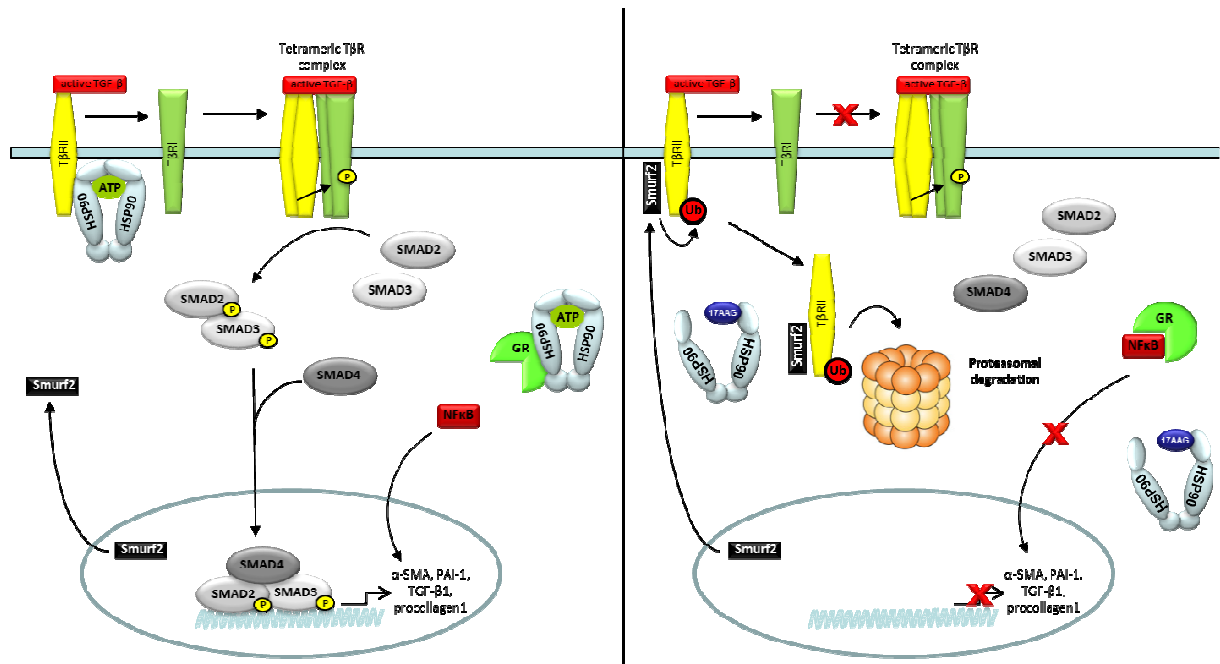


Figure 26 : L'inhibition d'HSP90 bloque la voie du TGF-β1

Gauche : HSP90 forme un complexe avec le TβRII inhibant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En parallèle, HSP90 se lie au Glucocorticoïd Receptor (GR) permettant la translocation nucléaire de NFκB et son activation. Droite: Le 17 AAG se lie au domaine de liaison à l'ATP d'HSP90 et inhibe son activité. La destruction du complexe HSP90/TβRII permet la liaison de Smurf2 sur le TβRII induisant son ubiquitination et sa dégradation. Le 17AAG perturbe également le complexe GR/HSP90 permettant l'interaction entre GR et NFκB. Ceci induit la séquestration d'NFκB dans le cytoplasme et inhibe son activité.

5- HSP70

La famille d'HSP70 est la plus étudiée, la plus conservée et celle comprenant le plus de membres. Elles sont présentes dans tous les organismes, de la bactérie jusqu'à l'homme, en passant par les plantes. Les membres de cette famille, qui sont au nombre de huit, ont un fort pourcentage d'homologie entre eux et au sein des différents organismes. Certains membres de cette famille sont exprimés de façon constitutive comme HSC70 (Heat Shock Cognate 70), HSP70.2, GRP75 (Glucose-Regulated Protein 75), GRP78 ainsi qu'HSP70.1t et participent au maintien de l'homéostasie cellulaire. Les autres membres HSP70 (HSP72) et HSP70-6 sont inductibles en condition de stress (222).

HSC70 (HSP73) est une protéine constitutive peu ou pas inductible qui est principalement impliquée dans la prise en charge des polypeptides nouvellement synthétisés, afin de faciliter leur repliement, le transport des protéines au sein de la cellule et la prévention de l'agrégation

des protéines en cas de stress (222). Cette protéine est essentielle au fonctionnement des cellules et à la survie de l'organisme puisque les animaux KO pour ce gène ne sont pas viables (223).

HSP70 (HSP72) est fortement inductible en condition de stress. Ce chaperon est dépendant de l'ATP et participe à la prévention de l'agrégation des protéines qui ont perdu leur conformation tridimensionnelle en les orientant vers le protéasome pour être dégradées. HSP70 joue aussi un rôle important dans la régulation de l'apoptose et participe en situation de stress à l'assemblage et la translocation des ribosomes (224).

Les protéines dénaturées sont apportées à HSP70 par le co-chaperon HSP40 et se fixent à la séquence PBD (peptide binding domain) qui est formée d'un feuillet β et d'une hélice α . Cette structure permet à HSP70 de se refermer sur son substrat lors de l'hydrolyse de l'ATP. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP entraîne la libération du substrat par ouverture de la molécule d'HSP70 (Figure 27, (225)). Une fois libéré, le substrat est soit totalement renaturé et pourra par conséquent remplir sa fonction classique, soit sa conformation n'est toujours pas adéquate et il fera à nouveau un cycle, soit il pourra être chaperonné par d'autres chaperons comme HSP90, soit il sera dégradé par le protéasome.

HSP70 a une fonction anti-apoptotique très importante en étant capable de s'associer avec un grand nombre de molécules impliquées dans les voies apoptotiques. De plus, cette protéine est fortement surexprimée dans les cellules cancéreuses, les protégeant ainsi de l'apoptose. L'inhibition d'HSP70 offre donc une stratégie intéressante pour améliorer les traitements anti-cancéreux. Contrairement à HSP90, il n'existait pas jusqu'à très récemment d'inhibiteurs spécifiques de cette molécule. Notre équipe a développé plusieurs inhibiteurs d'HSP70. Le premier nommé ADD70 (AIF Derived Decoy for HSP70) est un mutant de délétion de la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) qui neutralise HSP70 en se fixant dessus. Cette molécule offre aux cellules cancéreuses, une bonne sensibilisation à la mort induite par des agents de chimiothérapie, mais sa grande taille limite son utilisation en clinique. Pour pallier à ce problème, notre équipe a développé des aptamères peptidiques capables de fixer spécifiquement HSP70 et de sensibiliser fortement les cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. Actuellement, ces aptamères sont aussi utilisés pour trouver des molécules chimiques capables d'inhiber HSP70. Une molécule pharmacologique, le gefitinib, a également été identifié comme un inhibiteur de l'expression d'HSP70 (226). Cependant, des études plus récentes démontrent un rôle protecteur d'HSP70 sur la fibrogenèse. Les auteurs

ont ainsi développé plusieurs méthodes de surexpression d'HSP70 en utilisant, par exemple, des souris transgéniques exprimant HSP70, l'hyperthermie ou des agents pharmacologiques tels que la geranylgeranylacetone (GGA).

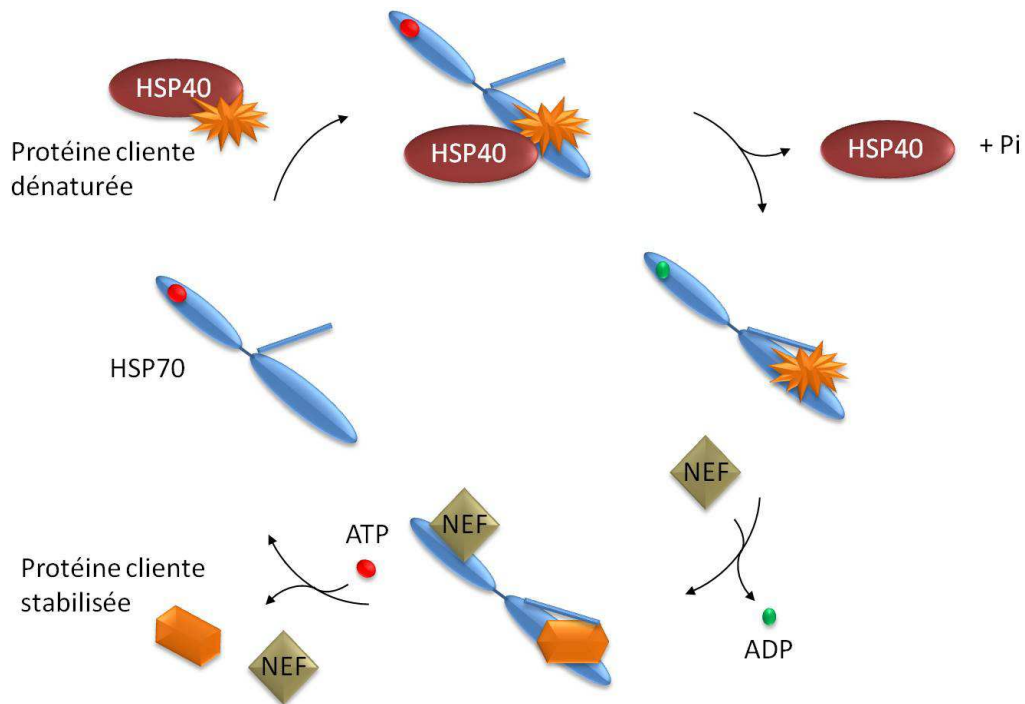


Figure 27 : Représentation schématique du mode d'action d'HSP70

HSP40 délivre la protéine dénaturée à HSP70 déjà liée à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement de conformation d'HSP70 qui se « referme » sur son substrat pour le stabiliser. Des facteurs d'échanges nucléotidiques (NEF) permettront la dissociation de l'ADP. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permettra « l'ouverture » d'HSP70 et la libération du substrat stabilisé (d'après Hennessy *et al.*, 2005 (227)).

En 2007, Wakisaka *et al.* ont démontré, *in vitro* sur des fibroblastes cardiaques et *in vivo* chez le rat, que le choc thermique empêchait la fibrose cardiaque induite par l'angiotensine-II grâce à l'induction d'HSP70. La fibrose cardiaque est connue pour être causée par une augmentation de l'activité des kinases ERK et l'activation des MEK1/2 menant à la phosphorylation de ERK1/ERK2 (228). L'angiotensine II active la cascade MEK-ERK provoquant la prolifération et l'activation des fibroblastes et favorisant la fibrose cardiaque (229). Le choc thermique, et la surexpression d'HSP70 concomitante, conduit à l'atténuation des signaux causés par l'angiotensine-II régulant la phosphorylation de ERK1/ERK2 et inhibant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, empêchant ainsi l'expression d' α -SMA, la sécrétion de TGF- β 1 et la synthèse de composants de la MEC (230).

Devant le besoin urgent de trouver des agents thérapeutiques contre les processus de la fibrose, la littérature décrit de nouvelles molécules susceptibles d'améliorer les troubles

fibrotiques. La geranylgeranylacetone (GGA) est un agent chimique ayant été rapporté pour induire l'expression d'HSP70 *in vitro* et *in vivo* conduisant à l'amélioration de la fibrose de plusieurs organes comme les poumons et les reins (231-233). La GGA est, en effet, capable de réduire significativement les dommages tissulaires dans les poumons et la fibrose rénale avec un dépôt limité de composants de la MEC. *In vivo*, le traitement à la GGA induisant une surexpression d'HSP70 empêchait également la différenciation des myofibroblastes et l'EMT suivie par une diminution du nombre de cellules positives à l' α -SMA (231, 232). Dans les poumons et la fibrose rénale, la surexpression d'HSP70, en accord avec son rôle cytoprotecteur, empêchait l'apoptose épithéliale qui est l'un des principaux événements déclencheurs de la fibrogenèse. Dans une étude réalisée en 2009, basée sur l'induction d'HSP70 par la GGA dans un modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine, les auteurs ont démontré une diminution du nombre de cellules inflammatoires recrutées. En effet, le niveau d'expression de la protéine MIP-2, la chimiokine la plus spécifique pour le recrutement des neutrophiles, était considérablement plus faible chez les souris traitées à la GGA après induction de la fibrose pulmonaire. De plus, la surexpression d'HSP70 chez la souris protégeait les cellules épithéliales de l'apoptose et de l'inflammation induite par la bléomycine entraînant une baisse de la fibrose (232).

En 2010, Tanaka *et al.* ont montré que des souris transgéniques surexprimant HSP70 étaient protégées de l'induction de l'inflammation et des lésions fibreuses induites par la bléomycine. Ils allaient plus loin en montrant que cela était probablement dû au fait que, chez les souris transgéniques, la production de TGF- β 1 et l'expression de cytokines pro-inflammatoires étaient plus faibles que chez les souris sauvages (WT, Wild Type) après administration de bléomycine. *In vitro*, l'inhibition d'HSP70 favorisait l'induction de l'EMT par le TGF- β 1 mais n'avait pas d'effet sur l'activation des fibroblastes (231). En 2011, La même équipe montrait que l'administration intratrachéale de Gefitinib inhibait l'expression pulmonaire d'HSP70 et exacerbait la fibrose induite par la bléomycine (226).

Dans un modèle de fibrose rénale, Zhou *et al.* proposent un mécanisme d'action d'HSP70 sur la voie du TGF- β expliquant son effet protecteur sur la fibrose. Les auteurs montraient que l'induction *in vivo* d'HSP70 par la GGA et la surexpression d'un plasmide d'HSP70 *in vitro* inhibait la phosphorylation et la translocation nucléaire de Smad3 abrogeant ainsi le processus d'EMT et la fibrose (Figure 28). Les auteurs vont même plus loin en surexprimant un mutant d'HSP70 dont le « peptide binding domain » est manquant. La surexpression de ce mutant n'avait aucun effet sur l'EMT induite par le TGF- β , montrant la nécessité de la liaison

Smad3/HSP70 via le peptide domaine pour l'effet protecteur d'HSP70 sur les processus de la fibrogénèse (233).

En outre, Kahloon *et al.* ont récemment mis en évidence un rôle d'une réponse auto-immune dans la FPI chez l'homme. En effet, ils ont démontré une augmentation des auto-anticorps anti-HSP70 chez les patients atteints de FPI qui a été corrélée à une baisse sévère des fonctions pulmonaires (capacité vitale forcée, CVF) et à une mortalité significativement plus élevée à un an (234). Les auteurs ont constaté que les auto-anticorps anti-HSP70 des patients atteints de FPI interféraient avec la réponse immunitaire normale et provoquaient une réaction pro-inflammatoire dans les poumons. En effet, ces anti-HSP70 activaient les monocytes et les lymphocytes conduisant à une augmentation d'IL-8 et IL-4, deux cytokines impliquées dans la progression de la fibrose pulmonaire (234). Pour la première fois, une réponse auto-immune contre HSP70 était corréliée au pronostic de la FPI. Ces résultats suggèrent que l'étude de la réponse auto-immune contre les auto-anticorps anti-HSP70 pourrait donner des informations cliniques utiles pour les patients atteints de FPI, et pourraient aider à la compréhension de l'évolution de la maladie (234, 235).

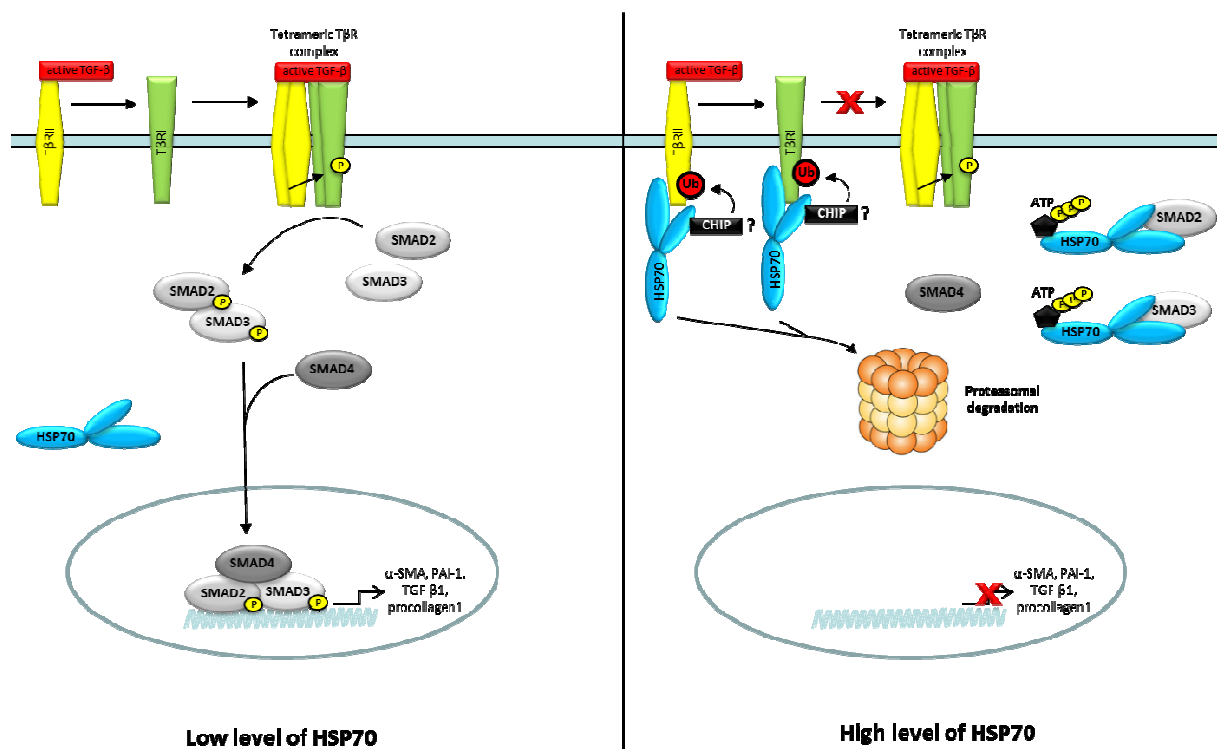


Figure 28 : L'induction d'HSP70 perturbe la voie du TGF- β 1

Gauche: En cas de faible niveau d'HSP70, la voie du TGF- β 1 n'est pas affectée. A droite: HSP70 est capable de se lier à Smad2 et Smad3 limitant leur phosphorylation et leur translocation nucléaire entravant la signalisation du TGF- β 1. HSP70 est également capable de se lier à T β RI et au T β RII pour induire leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome. Même si le mécanisme n'est pas entièrement compris, les auteurs suggèrent le rôle de la E3-ubiquitine ligase CHIP dans ce processus.

6- HSP110

Les HSP de haut poids moléculaire constituent un groupe hétérogène de protéines de stress appartenant à la superfamille HSP70 (236). Divers HSP de 110kDa sont existantes chez les mammifères : HSPA4, HSPA4L, HSP105 et HSP110 sont des protéines cytosoliques alors que GRP175 est liée au réticulum endoplasmique. HSP105 et HSP110 sont des protéines chaperones inducibles contrairement à HSP4A et HSPA4L. Ces protéines de stress sont en grande partie conservées de la levure à l'homme (237).

Leur structure, très proche de celle d'HSP70, se compose essentiellement d'un domaine de liaison des peptides (PBD) et d'un domaine de liaison nucléotidique pour lier l'ATP. Les HSP110 peuvent empêcher l'agrégation de protéines *in vitro* (238) et certaines études montrent qu'elles jouent un rôle dans le repliement des protéines dans les cellules de mammifères (239). Cependant, leur activité de chaperone ne semble pas être leur fonction principale puisqu'elles ont surtout un rôle de facteur d'échange de nucléotides pour HSP70 (Figure 29). En effet, Hatayama *et al.* ont montré que HSP110 pouvait interagir avec HSP70 (240). Dans ce complexe, HSP110 se révèle être un facteur important pour l'activité chaperonne d'HSP70 en agissant comme facteur d'échange d'ATP (241).

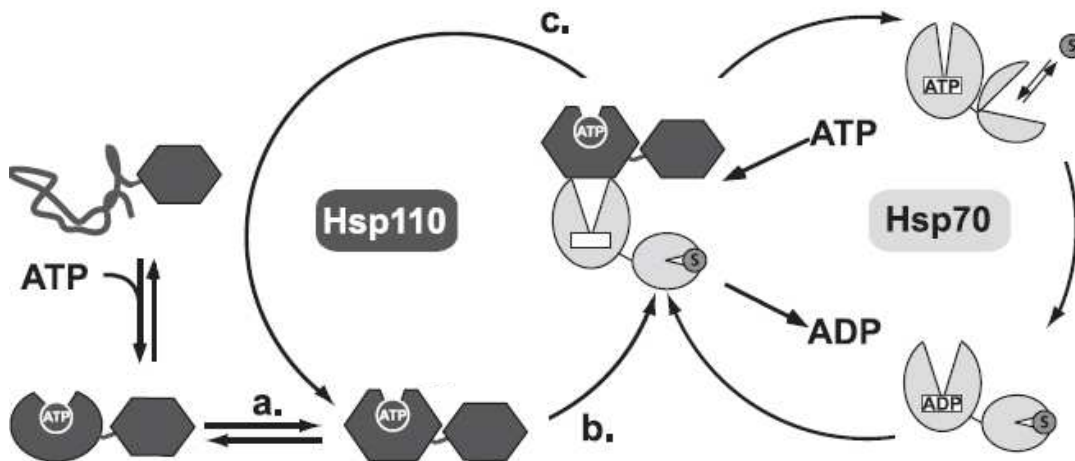


Figure 29 : Représentation schématique du mode d'action d'HSP110

(a) La fixation de l'ATP sur HSP110 (gris foncé) induit un changement de conformation qui rend la protéine plus stable et plus compétente pour s'associer à HSP70 (gris clair). (b) Hsp110 maintient HSP70 dans une conformation avec une faible affinité pour l'ADP induisant son relargage. (c) La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP à HSP70 conduit à la dissociation du complexe et initie un nouveau cycle d'HSP70 (d'après Andreasson *et al.*, 2008 (241)).

HSP110 semble être impliquée dans de nombreuses maladies humaines. Cependant, son rôle dans la fibrose reste mal décrit. En utilisant un modèle murin de surpression cardiaque, Mohamed *et al.* ont souligné le rôle de HSPA4 dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque. Dans leur modèle, l'expression de HSPA4 était augmentée et le manque d'expression de HSPA4 chez des souris déficientes pour cette protéine (HSPA4^{-/-}) aggravait la fibrose cardiaque avec une augmentation de la fibrose interstitielle et une expression accrue du collagène III et du TGF- β 1 (242). Ce phénomène était associé à l'activation de plusieurs voies de signalisations impliquées dans le développement de l'hypertrophie cardiaque comme la voie gp130/STAT3, CaMKII et calcineurine-NFAT. Les auteurs montraient également une accumulation de protéines polyubiquitinylées dans les cellules de souris HSPA4^{-/-} suggérant que la fibrose cardiaque observée chez ces animaux provenait d'une accumulation de protéines mal repliées résultant d'une activité chaperone affaiblie en absence d'HSPA4 (242).

7- HSP47

HSP47 représente la HSP la plus étudiée dans le contexte de la fibrogenèse du fait de son rôle dans la biosynthèse du collagène. C'est une glycoprotéine retenue au sein du réticulum endoplasmique (RE) grâce à une séquence de rétention RDEL, située en C-terminal. Ce chaperon qui ne nécessite pas d'ATP est aujourd'hui la seule HSP possédant un substrat spécifique : le collagène. Elle est indispensable pour sa biosynthèse, sa formation et sa sécrétion. Ainsi l'expression d'HSP47 est toujours corrélée avec celle du collagène et est totalement exclue des cellules ne produisant pas de collagène (243, 244). HSP47 agit à différentes étapes de la maturation du collagène : en empêchant l'agrégation et la dégradation des chaînes de procollagène néo-formée (244), en assistant la formation et stabilisant la triple hélice de procollagène et en facilitant sa sécrétion (243, 245, 246).

Pour ces raisons, HSP47 est devenu à la fois un biomarqueur et une cible thérapeutique de grand intérêt dans la fibrogenèse. En effet, l'augmentation de l'expression d'HSP47 est corrélée, lors de maladies fibreuses, avec le dépôt excessif de collagène dans le foie (247), les reins (248) et les poumons (249).

La formation du collagène mature débute au sein du RE puis se poursuit dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrété dans l'espace intracellulaire. HSP47 va se fixer aux fibres de procollagène nouvellement synthétisées lorsqu'elles arrivent dans le RE. Ce « chaperoning » a pour but d'éviter l'agrégation aléatoire des fibres de procollagène et leur dégradation dans le

RE avant d'avoir pu s'assembler en triple hélice. HSP47 va ensuite prendre en charge le transport des molécules en triple hélice vers l'appareil de Golgi. La dissociation d'HSP47 et du procollagène se fait au sein du compartiment cis-golgi par un changement de pH. Le collagène suivra sa maturation au sein de l'appareil de Golgi et HSP47, de son côté, retournera au sein du RE (Figure 30) (250).

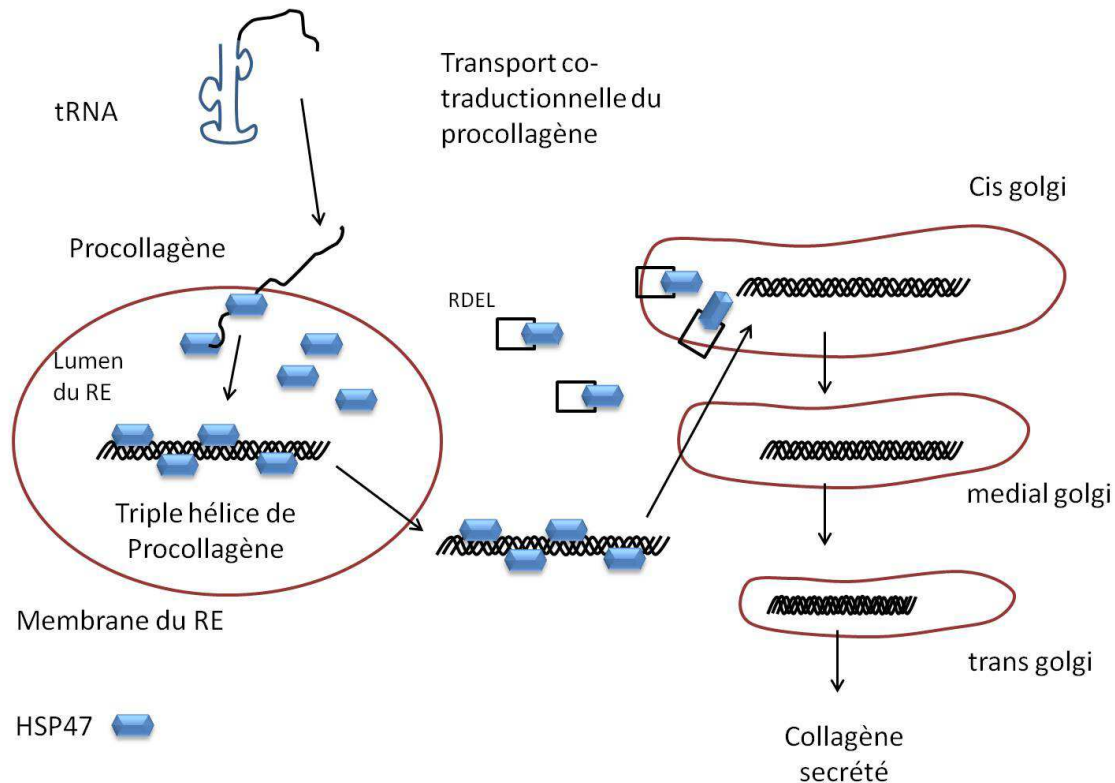


Figure 30 : Rôle d'HSP47 dans la synthèse et la maturation du collagène

HSP47 va prendre en charge les polypeptides de collagène nouvellement synthétisés afin qu'ils ne s'agrègent pas et pour faciliter la formation de la triple hélice. HSP47 amènera ensuite cette triple hélice de procollagène au sein de l'appareil de golgi avant qu'elle puisse subir toutes les modifications post-traductionnelles nécessaires à son bon fonctionnement (d'après Mala & Rose, 2010 (250)).

Le dépôt excessif de collagène étant la caractéristique principale de la fibrose, HSP47 a largement été utilisée comme marqueur des lésions fibreuses et de la progression de la maladie. Chez le rat, l'expression de l'ARNm d'HSP47 est corrélée à celle de l'ARNm des collagènes I et II dans des modèles de fibrose du foie (247). Des niveaux protéiques élevés d'HSP47 ont également été retrouvés dans des fibroses rénales et péritonéales une nouvelle fois en corrélation avec le dépôt de collagène et l'aggravation de la pathologie (251-253).

Au niveau pulmonaire, une étude menée chez la souris révèle une augmentation d'HSP47 au niveau des cellules exprimant l' α -SMA et la vimentine (myofibroblastes) après induction de la fibrose par la bléomycine (254). Cependant, l'expression d'HSP47 n'est pas limitée aux

myofibroblastes puisqu'une autre étude montre également une surexpression d'HSP47 dans les pneumocytes de type II (AECII) et les macrophages au niveau des zones atteintes de fibrose (255). Ces résultats confirment que ces cellules sont capables de synthétiser du procollagène en condition de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et qu'elles jouent donc un rôle primordial dans la fibrogenèse.

La corrélation entre HSP47 et le collagène a également été confirmée dans les myofibroblastes et les AECII chez les patients atteints de fibrose pulmonaire (256).

Outre son rôle de biomarqueur des zones fibreuses, HSP47 a été plus récemment étudiée en temps que cible thérapeutique importante. Différentes équipes de recherche ont ainsi mis au point des stratégies pour maîtriser la surexpression d'HSP47 lors de la fibrose. L'inhibition d'HSP47 a pris une réelle importance pour limiter et prévenir les événements fibrotiques *in vivo*. En 2008, Xia *et al.* ont conçu un système de diffusion d'un SiRNA d'HSP47 utilisant des microsphères de gélatine cationiques dans un modèle de fibrose rénale. Cette méthode de distribution améliorait et prolongeait l'effet inhibiteur du SiRNA HSP47 comparé à l'administration classique d'un SiRNA (14 jours au lieu de 7). Les auteurs de cet article ont démontré que l'inhibition d'HSP47 par cette méthode réduisait l'expression des collagènes I, III et IV limitant considérablement les dommages rénaux associés (257). Une stratégie similaire a été utilisée plus récemment dans un modèle de fibrose péritonéale dans lequel l'inhibition de l'expression d'HSP47 abrogeait complètement l'expression du collagène, du TGF- β 1 et l'infiltration des macrophages (258).

Au niveau pulmonaire, Hagiwara *et al.* ont étudié le rôle d'HSP47 dans trois modèles de fibrose chez le rat (induite par le paraquat, la bléomycine et le LPS). Quel que soit le modèle utilisé, l'inhibition d'HSP47 réduisait de manière significative les dommages pulmonaires et le dépôt de collagène et améliorait considérablement les fonctions des poumons (259-261).

De manière surprenante, malgré le grand nombre de publications mettant en évidence le rôle d'HSP47 dans le processus de fibrose, peu d'études proposent un mécanisme d'action. Une étude réalisée en 2007 montre un rôle potentiel des neutrophiles dans la surexpression d'HSP47. En effet, les auteurs suggèrent que les α -défensines libérées par les neutrophiles lors de leur recrutement au sein du site de lésion tissulaire sont capables d'activer la voie de signalisation MAPK des cellules épithéliales voisines induisant l'augmentation de l'expression d'HSP47 (262). De plus, dans un modèle de fibrose rénale utilisant des cellules épithéliales tubulaires proximales humaines stimulées avec du TGF- β 1, Xiao *et al.* ont

démontré que des inhibiteurs des voies ERK, MAPK et JNK pouvaient bloquer l'expression d'HSP47 induite par le TGF- β 1. Ainsi, l'inhibition de ces voies supprimait l'expression de protéines de la MEC ainsi que PAI-1 et TGF- β 1 limitant la fibrogenèse. Les auteurs suggéraient que lors de la fibrose rénale, le TGF- β 1 induisait l'expression d'HSP47 via les voies de signalisations ERK, JNK et MAPK favorisant la synthèse de collagène (263). Cependant, le TGF- β 1 n'est pas la seule cytokine capable d'induire HSP47. L'IL1 β peut également induire, seul ou en association avec le TGF- β 1, l'expression d'HSP47 au niveau de l'ARNm et de la protéine (264). Lors d'une étude réalisée en 2002, Sasaki *et al.* montraient que le TGF- β 1 et l'IL1 β étaient capables de favoriser la localisation nucléaire d'HSF1 et d'améliorer sa trimérisation conduisant à une augmentation de la liaison d'HSF1 sur l'élément de réponse spécifique du gène codant HSP47. Ainsi, le TGF- β 1 et IL1 β pourraient promouvoir l'expression d'HSP47. Les auteurs supposent qu'HSP47 pourrait être une bonne cible pour prévenir la fibrose puisque le TGF β 1 et l'IL1 β , deux molécules importantes dans fibrogenèse, sont capables d'induire sa surexpression (264).

8- Les petites protéines de stress (sHSP)

Les protéines de choc thermique de faible masse moléculaire (entre 15 et 30 kDa), ou small HSP (sHSP) forment une famille ubiquitaire et abondante. Les protéines de cette famille partagent des homologues de séquence et des propriétés biochimiques telles que la phosphorylation et l'oligomérisation. Elles ne nécessitent pas d'ATP pour leur activité et, comme les autres HSP, sont des chaperons moléculaires et protègent les cellules de l'agrégation protéique (265). Contrairement aux autres HSP, elles ne sont pas très conservées entre les espèces. Elles possèdent cependant toutes un domaine récurrent, le domaine α -crystallin nommé ainsi car il présente de très forte homologie avec les protéines α -crystallines, composantes abondantes du cristallin. Cette séquence, composée de 90 résidus amino-acides, garde une analogie supérieure à 50% entre les espèces (266). Au sein de cette famille HSP27, α A-crystallin et α B-crystallin sont les protéines les plus étudiées.

α - HSP27

HSP27 est la sHSP la plus étudiée et exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires à des stades spécifiques du développement ou de la différenciation cellulaire. Son expression

basale est faible mais augmente fortement en cas de stress. Elle est constitutivement localisée dans le cytosol (267) mais en cas de choc thermique elle se relocalise presque immédiatement dans le noyau ou autour de celui-ci (268). Elle est composée d'un motif WDPF situé en N-terminal qui est nécessaire à la formation de grands oligomères. Le domaine C-terminal quant à lui est impliqué dans la stabilisation de ces grands complexes oligomériques. HSP27 est en effet une protéine en équilibre entre un état dimérique et un état oligomérique (Figure 31). L'oligomérisation est un processus dynamique régulé par le statut de phosphorylation de la protéine (269). A l'état phosphorylé, HSP27 se trouve sous forme de dimère et à l'état déphosphorylé elle se trouve sous forme de grands oligomères pouvant former des structures de poids moléculaires allant jusqu'à 800kDa (270, 271).

L'activité d'HSP27 est différente de celle d'HSP90 et d'HSP70 qui ont la capacité de favoriser le repliement (refolding) des protéines dénaturées. HSP27 n'a pas cette capacité, mais elle peut « piéger » très rapidement les protéines dénaturées avant qu'elles ne s'agrègent de manière irréversible et deviennent délétères pour la cellule. Après cette étape, si les protéines ainsi piégées par HSP27 peuvent être repliées, elles pourront être prises en charge par les protéines HSP90 et HSP70 (265). Par contre, si les protéines piégées sont dénaturées de façon irréversible, elles seront orientées vers le protéasome. Cette propriété de chaperon est attribuée uniquement aux grands oligomères.

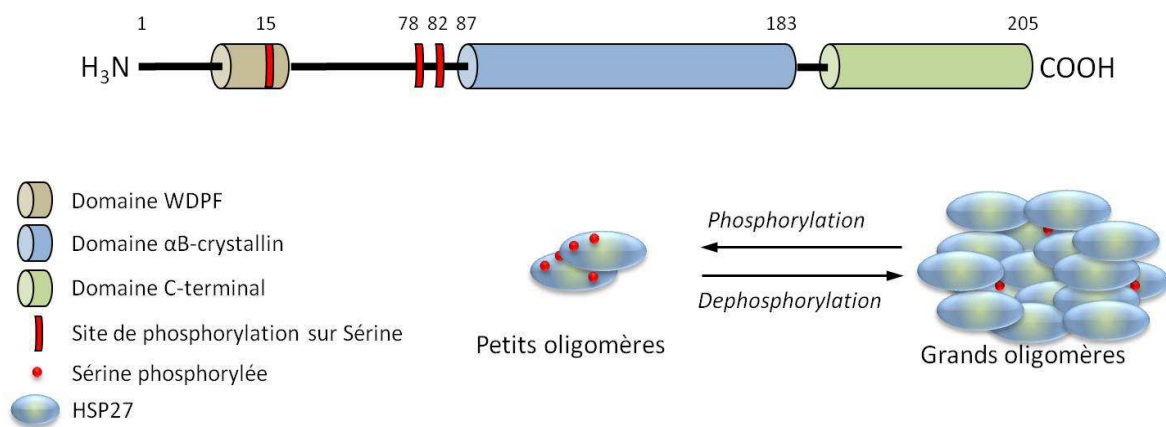


Figure 31 : Structure et organisation d'HSP27

HSP27 est en équilibre entre un état dimérique et oligomérique en fonction de sa phosphorylation. Selon son organisation HSP27 aura différentes fonctions au sein des cellules.

HSP27 peut être phosphorylée sur trois résidus serines situés en position 15, 78, 82. Cette phosphorylation est régulée par MK2 (MAPKAP Kinase 2) elle-même activée par p38MAPK (272). Cette voie de signalisation est impliquée dans plusieurs processus cellulaires incluant les changements de morphologie et la mobilité des cellules. Ainsi, cette voie est impliquée

dans la régulation de la dynamique des filaments d'actine. En effet, HSP27 sous sa forme non phosphorylée agit comme un inhibiteur de la polymérisation de l'actine en se fixant sur la partie terminale de celle-ci. Sous sa forme phosphorylée, elle va se détacher de l'actine permettant ainsi à cette dernière de se polymériser (273).

Notre équipe a également montré qu'HSP27, sous forme de petits oligomères, pouvait se lier à l'ubiquitine et favoriser, lors d'un stress, l'ubiquitination de certaines protéines et ainsi leur dégradation par le protéasome. Ces études ont notamment permis de montrer qu'HSP27 entraînait la dégradation d'I κ B α , l'inhibiteur du facteur de survie NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) permettant ainsi la relocalisation dans le noyau et l'augmentation de l'activité de ce dernier. Ceci aura pour conséquence une augmentation de la transcription de ces gènes cibles comme Bcl-2, Bcl-X_L et les IAP (inhibitor of Apoptosis Protein) en entraînant la survie cellulaire (274).

HSP27 est aussi très étudiée pour son implication dans le cancer. En effet, elle est fortement surexprimée dans les cellules cancéreuses, les protégeant de l'apoptose et favorisant ainsi leur prolifération (275). De plus, HSP27 semble accroître le potentiel métastatique des cellules cancéreuses probablement par ses capacités à se lier aux protéines du cytosquelette (276-278). Cliniquement, dans un grand nombre de cancers, tels que le cancer du sein, de l'ovaire, de l'endomètre, du colon, les ostéosarcomes et les leucémies, un taux élevé d'HSP27 a été observé (279, 280). De plus, il a été démontré qu'HSP27 pouvait induire une résistance à certains médicaments anticancéreux. Choi *et al.* montraient que l'expression d'HSP27 était directement liée à la résistance des cellules de cancers colorectaux à l'Irinotecan. En inhibant l'expression d'HSP27, ils diminuaient la résistance des cellules au traitement à l'Irinotecan (281). Plus récemment, Zhuang *et al.* ont montré que l'inhibition d'HSP27 sensibilisait les cellules A549 à l'induction de l'apoptose par TRAIL (Tumor necrosis factor-alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand) (282).

Peu d'études ont été réalisées sur le rôle d'HSP27 dans la fibrose pulmonaire. Cependant la présence d'une surexpression d'HSP27 dans les poumons de patients porteurs de FPI a été mise en avant. Cette surexpression d'HSP27 a été observée dans les cellules bronchiques se situant autour des foyers de fibroblastes (283). Une autre étude montrait qu'HSP27 ainsi que d'autres protéines impliquées dans la migration cellulaire étaient exprimées dans les cellules épithéliales se trouvant en périphérie de ces foyers fibroblastiques. Les auteurs pensaient que

la prolifération et la migration des cellules épithéliales jouaient un rôle dans le remodelage subi par le poumon lors d'une FPI (284). Deux autres articles montraient l'implication d'HSP27 dans l'EMT en dehors du poumon. Le premier montrait qu'HSP27 était surexprimée *in vitro* dans l'EMT des cellules mésothéliales de péritoine et qu'elle était en revanche diminuée *in vivo* dans l'EMT chronique de la fibrose péritonéale induite par la dialyse. La surexpression d'HSP27 *in vitro* protégeait de l'apoptose induite par les fluides de dialyse péritonéale (285). Dans la seconde étude, les auteurs suspectaient l'implication d'HSP27 dans la fibrose rénale via son rôle dans l'EMT. Ils montraient qu'HSP27 était surexprimée au cours de la fibrose rénale et qu'elle co-localisait avec le TGF- β 1, l' α -SMA et l'E-cadhérine. *In vitro* les auteurs montraient qu'HSP27 était surexprimée au cours de l'EMT induite par le TGF- β 1. Ils étudiaient ensuite le rôle d'HSP27 dans l'EMT, en la surexprimant au sein de cellules épithéliales rénales de rat, et trouvaient qu'elle induisait l'expression de l'E-cadhérine et inhibait l'expression du facteur de transcription Snail, protégeant ainsi de l'EMT. Les auteurs concluaient sur le fait qu'HSP27 était impliquée dans le processus de fibrose rénale en ayant un rôle protecteur et que sa surexpression devrait pouvoir ralentir le processus fibrosant en inhibant l'EMT (286).

Très récemment, notre équipe a largement étudié le rôle d'HSP27 dans la fibrose pulmonaire. En effet, nous avons mis en évidence un rôle d'HSP27 dans l'EMT *in vitro* des cellules épithéliales pulmonaires et mésothéliales pleurales, ainsi qu'une surexpression de cette petite protéine de stress au niveau des foyers fibroblastiques *in vivo* chez les patients atteints de FPI. La surexpression d'HSP27 induisait une transformation des cellules qui acquéraient un phénotype myofibroblastique avec l'expression d' α -SMA et la baisse de l'expression de l'E-cadhérine. De plus, l'inhibition *in vivo* d'HSP27 chez le rat à l'aide d'oligonucléotides antisens (OGX-427) protégeait les animaux de la fibrose induite par l'administration intrapleurale d'AdTGF- β 1. En plus de l'inhibition de la fibrose, la répression d'HSP27 empêchait également la migration des cellules mésothéliales pleurales transformées en myofibroblastes à l'intérieur du parenchyme pulmonaire, comme c'est généralement le cas en présence de TGF- β 1.

Nous avons montré qu'HSP27 avait un rôle protecteur sur le facteur de transcription indispensable à l'induction de l'EMT, Snail (Figure 32). En effet, HSP27 protège Snail de la dégradation par le protéasome conduisant à son accumulation nucléaire et à l'activation de ses gènes cibles induisant l'EMT. Ainsi, l'inhibition d'HSP27 *in vivo* induisait la dégradation de Snail inhibant l'EMT et faisant d'HSP27 une nouvelle cible thérapeutique pour la FPI (173).

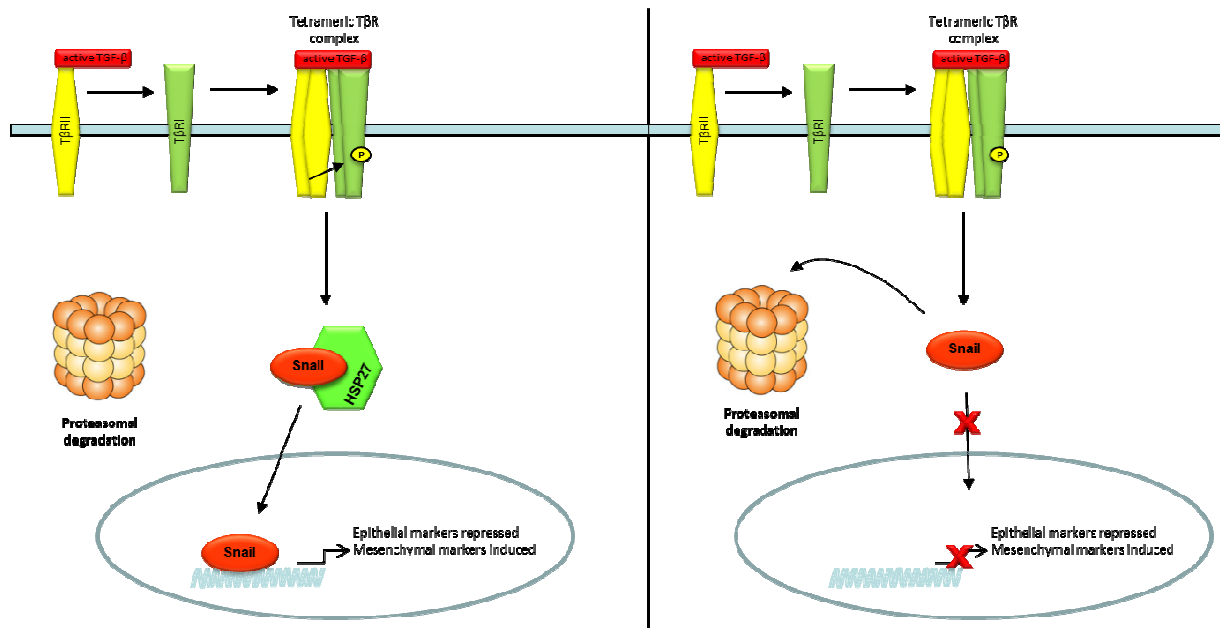


Figure 32 : HSP27 stabilise le facteur de transcription Snail et favorise l'EMT

Gauche: HSP27 est capable de se lier à Snail pour empêcher sa dégradation par le protéasome. Après l'activation de la voie de signalisation du TGF-β1, Snail devient nucléaire et induit la transcription des gènes de l'EMT. Droite: En cas d'inhibition d'HSP27, la dégradation de Snail par le protéasome est renforcée inhibant le processus d'EMT et favorisant la prévention de la fibrose.

b- αB-crystallin

Il existe deux protéines α-crystallin abondamment présentes dans le cristallin de l'œil, αA- et αB-crystallin. Elles sont très importantes pour le maintien de la transparence du cristallin et leurs mutations peuvent être la cause de nombreux troubles oculaires comme la cataracte. αA- et αB-crystallin ont environ 60% d'identité de séquence et partagent de nombreuses propriétés aux sein des cellules. Cependant, il existe des différences entre ces deux protéines. Alors que son homologue αA-crystallin est exprimée exclusivement dans le cristallin de l'oeil, αB-crystallin est fortement inductible en conditions de stress dans de nombreux autres organes tels que le cerveau, le coeur, les muscles lisses et les poumons (287). Comme HSP27, αB-crystallin possède un rôle de chaperon et est capable de lier les parties hydrophobes de surface des protéines mal repliées empêchant leur agrégation et protégeant l'intégrité cellulaire (288). HSP27 et αB-crystallin sont deux protéines très proches et il a été montré qu'elles étaient co-localisées dans de nombreux organes en conditions normales ou pathologiques. Certaines publications rapportent même un rôle synergique de ces deux sHSP qui sont capables d'interagir l'une avec l'autre (289). Une étude réalisée en 2001 a démontré qu'HSP27 empêchait les modifications structurelles et l'agrégation d'αB-crystallin induites par le choc

thermique et ainsi pourrait avoir un rôle sur sa stabilisation (290). Il a également été montré qu' α B-crystallin jouait un rôle physiologique dans de nombreux processus indépendants du choc thermique, telles que la croissance et la différenciation cellulaire, l'apoptose, la tumorigenèse, la transduction du signal et enfin, la modulation des protéines du cytosquelette comme les filaments intermédiaires (21).

L'interaction d' α B-crystallin avec les FI constitue un de ses rôles essentiels (291-293). En effet, α B-crystallin est connue pour interagir avec les composants des FI permettant ainsi le maintien de leur homéostasie. L'importance de ces interactions est démontrée par les dommages causés lors de mutations d' α B-crystallin sur l'architecture cytosquelettique cellulaire qui conduisent parfois à des pathologies sévères chez l'homme.

Par exemple, α B-crystallin est connu pour interagir avec la desmine inhibant ainsi son assemblage et son agrégation (294). Il a été montré que les mutations d' α B-crystallin pouvaient conduire à des troubles musculaires sévères (295) comme la DRM (desmin-related myopathy), une maladie héréditaire caractérisée par l'agrégation de la desmine au niveau des muscles squelettiques et du cœur (296). Cette pathologie entraîne des faiblesses musculaires du cou, des membres, de la face et du muscle cardiaque causant des cardiomyopathies. Si de nombreuses mutations du gène de la desmine ont été identifiées dans cette maladie (296), plusieurs mutations d' α B-crystallin semblent également en cause. En effet, la mutation ponctuelle R120G retrouvée chez l'homme entraîne la modification de la structure et de l'activité d' α B-crystallin conduisant à une forme mutée d' α B-crystallin avec une plus forte affinité pour la desmine que la protéine sauvage. Ainsi, de nombreux complexes α B-crystallin/desmine se forment au sein des cellules causant une forte agrégation de la desmine comme observée lors de la DRM. Ces mutations entraînent une accumulation anormale des agrégats de desmine qui résistent au renouvellement normal par la machinerie du protéasome modifiant ainsi les propriétés mécaniques des FI dans plusieurs types de cellules.

De même, de nombreuses études ont montré qu' α B-crystallin était capable d'interagir avec la GFAP (glial fibrillary acidic protein) et la vimentine, deux éléments des FI, et pouvait inhiber leur assemblage augmentant le « pool » de GFAP soluble (291, 294). Lors de la « maladie d'Alexander » (AxD), une pathologie neurodégénérative, des agrégats appelés « fibres de Rosenthal » se forment empêchant l'interaction normale entre α B-crystallin et GFAP au niveau des astrocytes. Il en résulte une accumulation exacerbée d'agrégats de GFAP associée à une augmentation de la présence d' α B-crystallin (297) et d'une séquestration d' α B-

crystallin et d'HSP27 dans les « fibres de Rosenthal ». Il a également été montré que les mutations d' α B-crystallin, R120G notamment, inhibaient l'action du protéasome causant l'accumulation de GFAP et de « fibres des Rosenthal » au sein des astrocytes causant la pathologie (297).

Les interactions α B-crystallin/FI sont également essentielles au niveau de l'œil. Il a été montré qu' α B-crystallin pouvait interagir avec la vimentine augmentant sa stabilisation. Cependant, les mutations d' α B-crystallin (R120G) conduisent à l'agrégation de la vimentine (298). Les parties hydrophobes de la protéine α B-crystallin mutée sont exposées à la surface conduisant à la fois à son auto-agrégation ainsi qu'à l'agrégation de la vimentine. L'accumulation de ces agrégats rendent le cristallin de l'œil opaque caractérisant la cataracte (298).

Le rôle d' α B-crystallin sur les muscles squelettiques et cardiaque a été également mis en évidence chez la souris par Brady *et al.* en 2001 grâce à l'étude de souris déficientes pour le gène codant α B-crystallin (souris α B-KO) (299). De manière surprenante, contrairement aux souris déficientes pour α A-crystallin, le structure du cristallin des souris α B-KO étaient normale ce qui suggère que α A-crystallin est plus important dans le développement et le maintien de la transparence du cristallin qu' α B-crystallin. Bien que le cristallin ne semble pas affecté par l'absence d' α B-crystallin, cette mutation entraîne un phénotype sévère chez les souris âgées qui se caractérise par une posture voûtée, la perte importante de poids après 40 semaines, et la dégénérescence des cellules musculaires (Figure 33).

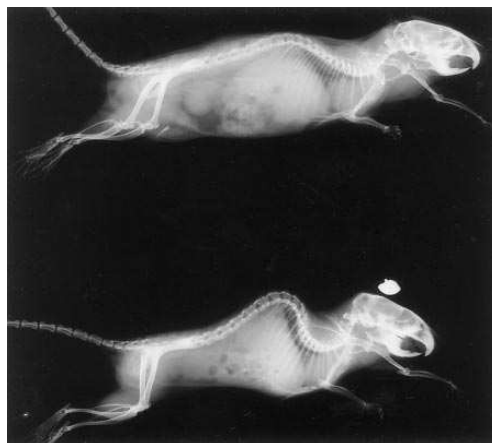


Figure 33 : Posture caractéristique des souris déficientes pour α B-crystallin.

Radiographies d'une souris âgées de 12 mois de type sauvage (en haut) et une souris α B-KO âgées de 10 mois (en bas) illustrant clairement la sévère cyphose antérieure et émaciation chez les souris déficientes au cours du vieillissement (d'après Brady *et al.*, 2001 (299)).

α B-crystallin est également exprimée à des niveaux élevés très tôt au cours du développement embryonnaire du cœur et également dans le cœur complètement formé. Cependant, le cœur des souris α B-KO semblait histologiquement normal, même à un âge avancé, et fonctionnait suffisamment chez les souris vivant dans un environnement contrôlé (299).

La fonction d' α B-crystallin est modulée par son oligomérisation et sa phosphorylation sur trois sites distincts : les sérines 19, 45 et 59. Au moins deux voies sont impliquées dans la phosphorylation d' α B-crystallin : les MK2 (MAPKAP Kinase 2) sont responsables de la phosphorylation de la sérine 59, comme pour HSP27, tandis que la sérine 45 apparaît sous le contrôle de la MAPKinase p42/p44. La kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 19 est toujours inconnue.

Les oligomères formés par les sHSP sont dynamiques et ont un caractère polydispersé : ils subissent des échanges constants de sous-unités, et leur taille et leur structure changent à l'intérieur de la cellule, par exemple suivant leur phosphorylation ou suivant le pH. Ainsi, la plasticité des oligomères est une caractéristique essentielle des sHSP, mais cela a considérablement retardé l'élucidation de leur structure par cristallographie. Cependant, des études très récentes combinant des techniques de résonance magnétique nucléaire en phase solide (solid-state NMR en anglais) et de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, Small Angle X-ray Scattering en anglais) ont pu mettre en évidence les structures du domaine α -crystallin et de la forme entière d' α B-crystallin (300, 301). L'organisation oligomérique d' α B-crystallin n'est pas encore totalement connue mais les recherches récentes donnent de nombreux éléments nécessaires à la compréhension de la structure quaternaire de cette sHSP. Le domaine α -crystallin joue un rôle central dans la fonction d' α B-crystallin et est constitué de 8 feuillets β . Les feuillets β_6 et β_7 du domaine α -crystallin permettent la formation d'homodimères anti-parallèles (Figure 34).

Outre le domaine α -crystallin, la région C-terminale d' α B-crystallin joue un rôle crucial dans son oligomérisation. En effet, après la formation de dimères, le motif conservé de trois résidus alternant des résidus isoleucines ou valine (motif IXI/V) est capable de lier les feuillets β_4/β_8 du domaine α -crystallin d'autres monomères formant ainsi des liaisons inter-dimériques (Figure 34). Enfin, le rôle de la région N-terminale reste encore peu connu mais des monomères d' α B-crystallin dont cette région est tronquée forment des oligomères plus petits et moins stables que des monomères entiers (302). Du fait de la conservation du domaine α -crystallin parmi les sHSP, il a été avancé que des hétéro-oligomères pouvaient se former notamment entre α B-crystallin et HSP27 (303).

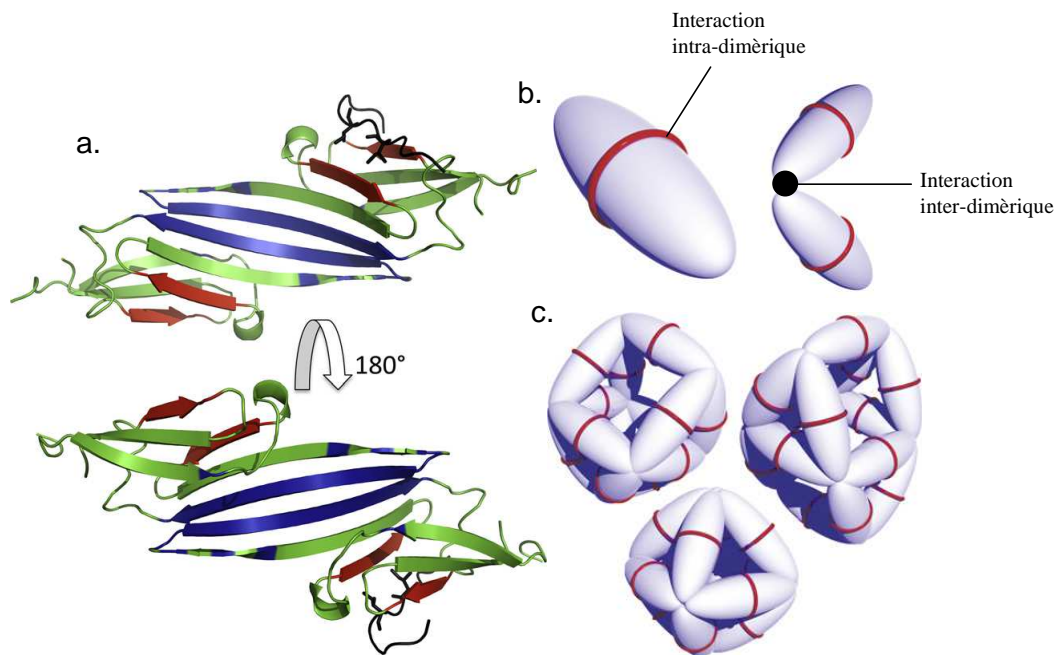


Figure 34 : Structure et organisation oligomérique d' α B-crystallin

(a.) Structure RMN du domaine α -crystallin et de l'extrémité C-terminal d' α B-crystallin. Les régions impliquées dans les contacts intra-dimériques sont représentées en bleu (feuillelet β 6/ β 7). Les feuillets β 4/ β 8 impliqués dans les interactions inter-dimériques sont représentés en marron. Le motif IXI/V de la région C-terminale est représenté en noir. (b.) Les dimères d' α B-crystallin peuvent être représentés comme des ellipsoïdes qui sont stabilisés par une interface intra-dimérique, et qui s'assemblent en oligomères via des interactions inter-dimériques. (c.) Organisation quaternaire d' α B-crystallin : les dimères s'assemblent en un ensemble d'oligomères globulaires couvrant au moins 30 sous-unités. (302, 304)

α B-crystallin est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment l'apoptose. Plusieurs études ont démontré que la surexpression d' α B-crystallin avait un effet protecteur contre un large panel de stimuli apoptotiques alors que son inhibition sensibilise grandement les cellules à la mort programmée (305-307).

L'effet anti-apoptotique d' α B-crystallin a été démontré dans de nombreux types cellulaires et semble, dans la plupart d'entre eux, mettre en jeu l'inhibition de la caspase-3, protéine effectrice essentielle du processus d'apoptose (305, 307-309). En effet, l'addition d' α B-crystallin recombinant à des extraits cellulaires empêchait l'activation de la caspase-3 par le cytochrome c ou la caspase-8, étape cruciale du processus. Cette sHSP interagit avec la procaspase-3 inhibant ainsi son clivage et donc son activation. Cet effet d' α B-crystallin est déterminant pour expliquer sa fonction anti-apoptotique. Morisson *et al.* ont démontré sur des cardiomyocytes que la phosphorylation d' α B-crystallin sur la serine 59 semble nécessaire et suffisante pour assurer une protection maximale contre l'apoptose (309).

α B-crystallin est également capable de se lier à des protéines pro-apoptotiques tels que Bax, Bcl-Xs (310) et p53 (311) pour empêcher leur translocation dans la mitochondrie inhibant, ainsi, l'apoptose.

Il a été montré qu' α B-crystallin pouvait protéger les cellules de la mort induite par les inhibiteurs du protéasome. L'inhibition du protéasome induit l'accumulation de protéines mal repliées qui sont toxiques pour les cellules. En réponse aux inhibiteurs du protéasome et d'autres conditions stressantes, α B-crystallin se relocalise, comme HSP27, au niveau du cytosquelette et se lie aux microtubules via les protéines associées aux microtubules (MAP). Ainsi, les protéines intracellulaires endommagées sont séquestrées dans les microtubules et ne peuvent être toxiques pour la cellule (312).

Les fonctions anti-apoptotiques d' α B-crystallin sont donc dépendantes essentiellement de sa capacité à bloquer l'activation de la caspase-3 et à protéger l'intégrité des microfilaments. Ces fonctions semblent être modulées par sa phosphorylation et sa redistribution cellulaire.

Une autre fonction récemment identifiée d' α B-crystallin est sa capacité à faciliter la dégradation des protéines spécifiques par le système ubiquitine/protéasome, et donc à jouer un rôle dans le « triage des protéines » (313). Le système d'ubiquitination des protéines pour la dégradation par le protéasome 26S, une protéase multicatalytique composée d'une sous-unité 20S catalytiques et deux sous-unités 19S régulatrices (314), est essentiel pour le bon assemblage/désassemblage des complexes de protéines pour prévenir les interactions indésirables et leur agrégation.

AB-crystallin a été montré pour interagir avec l'une des 14 sous-unités du protéasome 20S (315). Cependant, cette interaction ne semble pas moduler l'activité du protéasome. Lorsque les sérines 19 et 45 d' α B-crystallin sont phosphorylées, les protéines peuvent interagir avec FBX4, qui est un composant de l'ubiquitine-ligase SCF (SKP1/CUL1/F-box) qui ubiquitine les protéines clientes pour les adresser au protéasome (316). Le complexe α B-crystallin/FBX4 régit l'ubiquitination spécifique de divers substrats induisant leur dégradation.

Au niveau pulmonaire, α B-crystallin est surexprimée dans de nombreuses pathologies comme le cancer (317) et les maladies pulmonaires obstructives chroniques (COPD, chronic obstructive pulmonary disease en anglais) (318). Cependant, son rôle dans la fibrose reste peu documenté.

Dans un modèle de fibrose du foie, il a été montré, *in vitro* et *in vivo*, qu' α B-crystallin était surexprimé rapidement après l'activation des HSCs (hepatic stellate cells) avec une

localisation cytoplasmique puis nucléaire en condition de choc thermique. α B-crystallin était totalement absent des HSCs non activés suggérant son rôle dans l'activation de ces cellules, étape clé de la fibrose hépatique (319, 320). Rezzani *et al.* ont également montré une surexpression d' α B-crystallin dans un modèle de fibrose vasculaire induite par la cyclosporine A (CsA). La CsA a une toxicité directe sur la structure et les arrangements spatiaux du cytosquelette et sur l'expression de la vimentine et de la desmine. Les auteurs suggèrent donc que l'expression d' α B-crystallin est induite de manière à protéger les cellules des effets toxiques de ce remodelage du cytosquelette et protégeant de la fibrose vasculaire (321). De manière intéressante, différentes études révèlent que l'expression d' α B-crystallin peut être induite par le TGF- β 1 (322, 323) et un article publié en 2013 par Huang *et al.* démontre un rôle de cette sHSP dans le processus d'EMT (324). Les auteurs montrent qu' α B-crystallin forme un complexe avec la protéine 14-3-3 ζ , la protégeant de la dégradation par la protéasome. Ceci se traduit par une augmentation du « pool » de protéine 14-3-3 ζ dans la cellule conduisant à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 (Figure 35). Ainsi, α B-crystallin permet l'activation de la cascade de phosphorylation ERK induisant l'activation du facteur de transcription Slug, inducteur de l'EMT (324). Ce processus, mis en évidence dans cet article dans un modèle de carcinome hépatique pourrait avoir une importance particulière dans le fibrogenèse puisque l'EMT est également un processus clé de la fibrose pulmonaire.

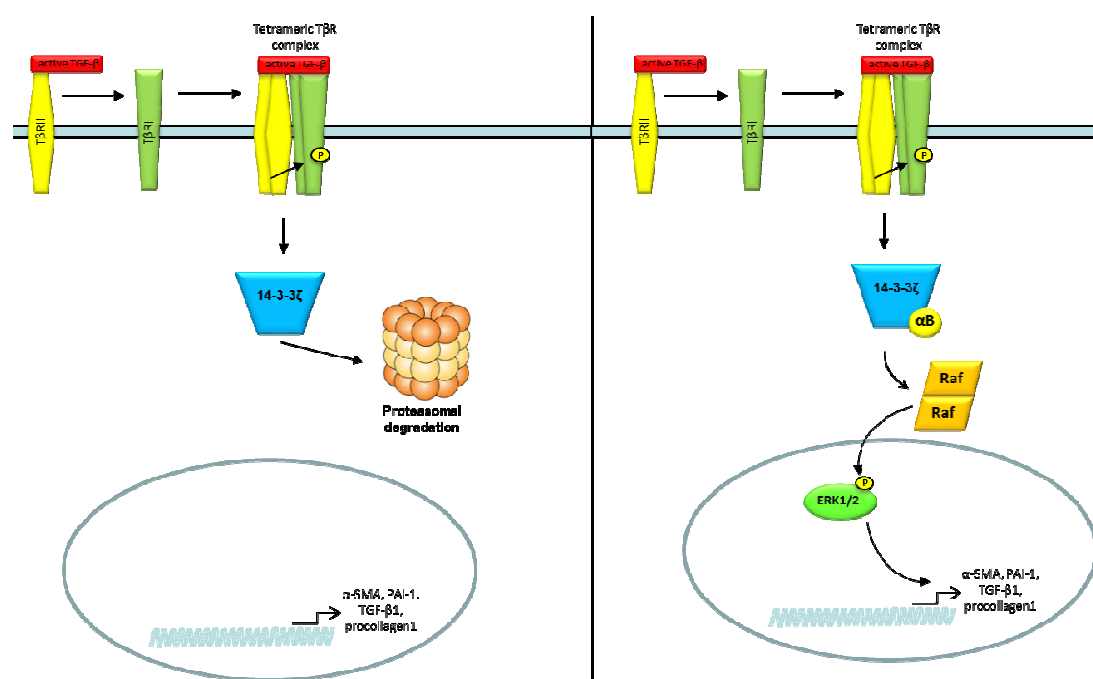


Figure 35 : α B-crystallin favorise l'EMT par la voie ERK

Gauche: En l'absence d' α B-crystallin la protéine 14-3-3 ζ est détruite par le protéasome. Droite: α B-crystallin interagit avec la protéine 14-3-3 ζ permettant la dimérisation de Raf et la phosphorylation de ERK activant les gènes de l'EMT.

V- Approches thérapeutiques actuelles de la FPI

Malgré la controverse autour du rôle de l'inflammation dans le processus de fibrose pulmonaire, les traitements proposés étaient jusqu'alors pour la plupart des anti-inflammatoires notamment les corticostéroïdes (tel que la prédnisone) ou des immunosuppresseurs (tel que l'Azathioprine). Cependant, ces traitements ont montré une efficacité très limitée pour lutter contre la FPI et aucun bénéfice clair pour les patients n'a pu être démontré par les nombreux essais cliniques effectués sur ces composants (325). Très récemment, l'essai PANTHER (326) a évalué l'efficacité de la combinaison de la prédnisone, l'Azathioprine et la N- acétylcystéine (NAC) sur des patients atteints de FPI avec une atteinte légère ou modérée de leurs fonctions pulmonaires. Lors de cet essai trois groupes étaient testés : un groupe recevant uniquement la NAC, un groupe recevant la combinaison prédnisone, azathioprine, NAC et un groupe Placebo. Cette étude comparait 77 patients recevant la combinaison ou la NAC seule et 78 patients recevant le placebo sur une période prévue de 60 semaines. Cependant, un contrôle intermédiaire des données par le comité de suivi a recommandé l'arrêt de l'étude pour le groupe recevant la combinaison (après 32 semaines). Cette décision était fondée sur la découverte que, comparativement au placebo, le traitement par la combinaison de trois médicaments conduisait à une augmentation significative de la mortalité (11% contre 1%), des hospitalisations (29% contre 8%) et d'événements indésirables graves (31% contre 9%), et ne montrait pas d'amélioration des fonctions pulmonaires des patients (326). L'étude sur le groupe NAC vs. Placebo est encore en cours.

2- Pirfenidone

La pirfenidone est un composé dérivé de la pyridine qui présente des propriétés anti-fibrotiques, anti-inflammatoires et antioxydantes et représente donc une molécule d'intérêt pour le traitement de la FPI. En effet, la pirfenidone est capable d'inhiber la prolifération des myofibroblastes et de réduire la synthèse de collagène associée *in vitro* ainsi que d'abroger l'induction d'HSP47 par le TGF- β 1 (327, 328). *In vivo*, elle peut être utilisée de manière prophylactique ou thérapeutique et, dans les deux cas, elle atténue la fibrose induite par la bléomycine (329) en association avec une réduction de taux de TGF- β chez la souris.

Ces effets anti-inflammatoires se manifestent par l'inhibition du TNF- α , une cytokine connue pour son rôle dans l'induction des processus fibrosants (330). Cependant, le

mécanisme d'action de la pirfenidone reste encore peu clair. Choi *et al.* ont montré récemment qu'elle pouvait interférer avec la voie du TGF- β 1 en bloquant la translocation nucléaire de Smad4 inhibant ainsi la réponse pro-fibrosante causée par le TGF- β 1 (331).

Devant ces résultats prometteurs sur les modèles animaux, la pirfenidone a fait l'objet de nombreux essais cliniques pour la FPI. Un des plus récent, réalisé au Japon, démontre une réduction significative du déclin des capacités pulmonaires (Capacité vitale forcée, CVF) chez les patients recevant la pirfenidone en comparaison à ceux recevant le placebo (332) sur 275 patients sur une période de 52 semaines. Cependant, cet essai clinique reste très contesté sur sa réalisation puisqu'en 2010, Collard rapporte que les auteurs ont changé les critères cliniques observés en cours d'étude et que des données semblent manquantes (333).

En 2011, le programme CAPACITY (334) a évalué les résultats de deux autres études sur la pirfenidone (essai numero 004 et 006). L'essai 004 a étudié 435 patients répartis en trois groupes : pirfenidone 2,403 mg/jour, pirfenidone 1.197 mg/jour et placebo. L'essai 006 a étudié 344 patients répartis en deux groupes : pirfenidone 2.403 mg/jour et placebo. Dans l'étude 004, la pirfenidone réduisait significativement le déclin de la capacité vitale forcée (CVF) avec une réduction moyenne de 8% à 72 semaines dans le groupe recevant la pirfenidone (2,403 mg/jour) et une réduction de 12,4% à 72 semaines dans le groupe placebo. Cependant, dans l'étude 006, le changement de la CVF à 72 semaines n'était pas significatif entre le groupe traité et la groupe placebo (334).

Malgré la controverse dont font l'objet certains essais cliniques, la pirfenidone représente un composé d'intérêt dans la recherche de nouvelles thérapies contre la FPI.

Il est actuellement le seul médicament ayant l'Autorisation de mise sur le marché (AMM) en France contre la FPI. Il est prescrit pour réduire la vitesse d'aggravation de la maladie chez les patients souffrant de fibrose pulmonaire légère à modérée.

4- N-acétylcystéine (NAC)

Dans les conditions normales, les poumons sont protégés des agressions dues aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) par des antioxydants tels que le glutathion. Cependant dans le cas de la FPI la génération excessive de ROS peut surpasser les défenses cellulaires. En effet, il a été démontré que les taux de glutathion extra- et intracellulaires étaient réduits en cas de fibrose pulmonaire (335, 336). En plus de leur action néfaste directe sur les macromolécules

et l'ADN des cellules épithéliales, les ROS influencent également les processus profibrosants. Par exemple, les myofibroblastes provenant de poumons atteints de FPI génèrent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui peut servir de signal paracrine pour l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales voisines (337).

La NAC est un composé dérivé de la cystéine capable d'activer la synthèse du glutathion *in vitro* et *in vivo*.

Dans une étude préliminaire réalisée sur 18 patients, l'ajout de NAC au traitement actuel (corticostéroïdes ± immunomodulateurs) a révélé une amélioration des fonctions pulmonaires des patients traités (338). Dans l'essai IFIGENIA, l'utilisation de la NAC a ensuite été explorée sur 155 patients répartis en deux groupes : NAC vs. Placebo en combinaison avec la prednisone et l'azathioprine (339). A 12 mois, l'utilisation de la NAC ralentissait le déclin de la fonction respiratoire des patients atteints de FPI sans amélioration de la survie. Cependant, cette étude a eu un fort taux d'abandon et, en 12 mois, 30% des patients étaient décédés ou ont été perdus au suivi.

Actuellement l'intérêt de l'utilisation de la NAC seule est à nouveau étudié dans la deuxième partie de l'essai PANTHER qui est en cours (326). Mais, à ce jour, il existe trop peu de données pour recommander la NAC en monothérapie contre la FPI.

5- TGF- β

Il est aujourd'hui très clair que le TGF- β est la cytokine clé du processus de fibrose. Il n'est donc pas surprenant que les recherches cliniques actuelles se concentrent sur l'inhibition de son activation et de ces voies de signalisation. Des anticorps inhibiteurs des trois isoformes du TGF- β sont actuellement en développement et seront utilisés lors d'essais cliniques contre la FPI. Un essai clinique de phase I a été réalisé en Angleterre avec l'un de ces anticorps neutralisant, le GC1008. Les premiers résultats de phase I avaient montré une absence de toxicité.

D'autres composants sont également susceptibles d'être l'objet de futurs essais comme le SB-525334, un inhibiteur du récepteur au TGF- β , T β RI. L'action de ce composé sur l'atténuation de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (340) et son efficacité à bloquer la progression de la fibrose induite par la surexpression du TGF- β 1 (105) ont déjà été démontrées dans des modèles animaux.

Cependant le blocage direct du TGF- β pourrait avoir de nombreux effets indésirables tant cette cytokine est impliquée dans d'innombrables processus cellulaires. Une des clés pour résoudre ce problème pourrait être l'inhibition de l'activation excessive du TGF- β lors du processus fibrosant. Cependant les approches pour répondre à cette question restent difficiles puisque l'activation du TGF- β est contrôlée à différents niveaux par les composants de la MEC, le peptide LAP et les intégrines comme nous l'avons décrit précédemment. Dans cette optique, l'inhibition de l'intégrine $\alpha\beta_6$ par un anticorps neutralisant semble capable de limiter la fibrose pulmonaire (341). Récemment, un anticorps monoclonal humanisé, le STX-100, a été évalué lors d'un essai clinique de phase I et un essai clinique de phase II est actuellement prévu aux USA.

Ainsi, devant l'échec ou le faible bénéfice apporté par les thérapies actuelles de nombreuses nouvelles molécules suscitent l'intérêt des chercheurs et font l'objet de nouveaux essais cliniques. Malgré des résultats souvent prometteurs sur les modèles animaux, la majorité de ces nouveaux traitements sont plus controversés quant à leur efficacité sur la FPI chez l'homme.

VI- Objectifs de la thèse

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a pour objectif de tenter d'avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu au cours du processus de fibrogenèse pulmonaire et de tenter d'apporter des solutions nouvelles pour lutter contre la FPI qui est pour le moment incurable. Nous avons considéré le problème sous deux angles différents :

- Etude d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle, αB -crystallin. Nous avons étudié en détail l'implication de cette sHSP au cours de la fibrose pulmonaire et nous avons élucidé son mécanisme d'action afin de mettre en évidence son potentiel rôle de biomarqueur et de cible thérapeutique pour la FPI.
- Etude de l'implication d' αB -crystallin au niveau de la fibrose pleurale et pleuro-pulmonaire. Outre son rôle sur le poumon nous avons étudié les mécanismes mettant en jeu αB -crystallin au niveau de la cellule mésothéliale et son implication dans l'initiation de la fibrose pulmonaire.

METHODES ET RESULTATS

La petite protéine de stress α B-crystallin est un acteur essentiel régulant la localisation de Smad4 : implication dans la fibrose pulmonaire

La première partie de cette thèse n'a pas encore été publiée. Ce travail est actuellement en deuxième soumission au « Journal of pathology » après révision.

Le but de cette étude a été de mettre en évidence un rôle de la petite protéine de stress α B-crystallin dans la fibrogenèse pulmonaire.

Après avoir montré qu' α B-crystallin était surexprimée dans les poumons de patients atteints de FPI, nous avons utilisé trois modèles différents de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'AdTGF- β 1 ou l'AdIL1- β . α B-crystallin était surexprimée en condition de fibrose dans nos modèles animaux. Nous avons montré que les souris KO pour α B-crystallin étaient protégées de la fibrose pulmonaire avec une plus faible accumulation de collagène que les souris contrôles. La voie du TGF- β 1 était déficiente chez les souris KO.

In vitro, sur des cellules épithéliales pulmonaires primaires (AECII), des fibroblastes primaires, ainsi que des lignées cellulaires (A549 et MRC5), nous avons mis en évidence un rôle d' α B-crystallin sur la localisation de la protéine Smad4, responsable de la translocation des Smad2 et 3 nécessaire à la voie du TGF- β 1 Smad-dépendante. α B-crystallin facilite la voie du TGF- β 1 en entraînant la séquestration nucléaire de Smad4 grâce à son rôle sur le complexe Smad4/TIF1 γ lui-même responsable de la monoubiquitination de Smad4 et de sa localisation cellulaire.

Ce travail est présenté dans les annexes à la page 187 dans la forme qui a été soumise au « Journal of pathology ».

I- Méthodes

1- Traitements des animaux

La lignée de souris KO pour le gène d' α B-crystallin (NIH, Bethesda, Maryland, USA) a été élevée à l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Dijon. Pour contrôle, les souris SV129 (fond génétique identique) âgées de 10 semaines provenaient de Charles River, Saint Germain sur-l'Arbresle, France, et ont été placées dans des conditions sans pathogène. La nourriture et l'eau des rongeurs ont été fournies *ad libitum*. Les animaux ont été traités conformément aux lignes directrices du Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France). Toutes les expériences ont été approuvées par le Comité « d'Ethique de l'Université de Bourgogne » (Bourgogne, France). Les procédures ont été exécutées sous anesthésie par inhalation d'isoflurane (TEM, Lormont, France).

Les adénovecteurs nous ont été donnés par le Dr Jack Gauldie. AdTGF exprime le TGF- β 1 actif (160), AdIL1 exprime l'IL-1 β (78) et l'AdDL (adénovecteur contrôle) est dépourvu de vecteur.

a- Injections

Les injections intratrachéales uniques ont été réalisées via une canule 22G introduite dans la trachée sans chirurgie (Figure 36). Les animaux recevaient à J0, soit 50 μ L de bléomycine 0,07 U (blenoxane; Bristol-Myers-Squibb, Montréal, QC, Canada), de l'AdTGF ou de l'AdIL1 (1.10^9 pfu/ml) diluée dans du NaCl 0,9%, soit du NaCl 0.9% seul ou l'AdDL (1.10^9 pfu/ml) comme contrôle.

b- Sacrifices, liquides de lavages et prélèvement des poumons

Les souris ont été euthanasiées 7 ou 21 jours après l'injection par section de l'aorte abdominale et par une légère incision à travers le diaphragme. Le liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) était récolté à l'aide d'une canule placée dans la trachée. Les poumons étaient enlevés et les LBA étaient effectués en injectant par la canule 600 μ l de NaCl 0,9%. La quantité de liquide récupérée variait entre 200 et 400 μ l. Les LBA étaient centrifugés (2500 rpm, 15 min) et les surnageants étaient stockés à -80°C. Les culots étaient repris dans 500 μ l

de PBS. Un comptage cellulaire total était effectué puis 250 μ l étaient placés dans une Cytospin (300 rpm, 2 min). Les lames ainsi récupérées étaient colorées au GIEMSA pour évaluation du taux de macrophages, de lymphocytes et de neutrophiles par un comptage différentiel. Pour les études histologiques, les poumons étaient ensuite insufflés au RCL2 (fixateur) et placés dans du RCL2 pendant 24h puis étaient découpés afin d'être mis en paraffine et ultérieurement sur lames. Pour les études protéiques, après avoir effectué un LBA et avoir nettoyé les poumons du sang qu'ils contenaient par injection intracardiaque de 10 ml de NaCl, les poumons étaient immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis placés à -80°C.



Figure 36 : Injection intratrachéale

Après anesthésie à l'isofluorane, la souris est allongée sur le dos. L'injection est réalisée grâce à une canule placée dans la trachée de l'animal.

2- Histologie

a- Tissus humains

Les échantillons de tissus pulmonaires ont été obtenus par biopsie pulmonaire ouverte. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Professeur Crestani, INSERM U700, Paris. La FPI des patients a été diagnostiquée selon les critères américains de la «Thoracic Society/European Respiratory Society consensus» (6), suivant les caractéristiques cliniques, radiographiques et histopathologiques caractéristiques (n = 6). Des échantillons de tissus pulmonaires contrôles de patients non atteints de FPI ont été obtenus à partir de sujets fumeurs ayant subi une chirurgie thoracique pour un cancer localisé du poumon (n = 4). Le comité d'éthique local (Comité de protection des personnes, Ile de France 1) a approuvé l'étude, et les patients ont donné leur consentement éclairé avant la chirurgie du poumon.

Des sections de tissu pulmonaire humain fixées en paraformaldehyde et incluses en paraffine ont été prétraitées dans un tampon citrate pH 6 pendant 40 minutes pour la récupération des antigènes. Les sections ont ensuite été incubées avec un anticorps monoclonal anti- α B-crystallin (1B6.1-3G4, Enzo Life Sciences) et les cellules positives ont été révélées en

utilisant le kit de phosphatase alcaline ABC-Vectastain (Vector Laboratories). Un anticorps IgG1 de souris a été utilisé pour tester la spécificité de la coloration.

b- Immunohistochimie (IHC)

Pour les marquages immunohistochimiques nous avons utilisé des coupes de poumons de souris que nous avons traitées à la bléomycine et des coupes de poumons de rats traitées au AdTGF- β 1 dont nous disposions dans le laboratoire. Ces coupes ont été déparaffinées par différents bains : trois bains de 5 minutes dans du xylène, deux fois 5 minutes dans de l'éthanol 100°, 3 minutes dans de l'éthanol 95° puis 3 minutes dans de l'éthanol 70°. Les lames étaient ensuite rincées deux fois 3 minutes à l'eau courante puis deux fois 3 minutes au PBS. Les peroxydases endogènes étaient ensuite inhibées par un bain de 20 minutes dans du PBS-H₂O₂ (75 ml PBS + 1125 μ l H₂O₂ 30%). Après deux lavages de 3 minutes au PBS, les coupes de poumons étaient cerclées au Dakopen. Les lames étaient ensuite saturées pendant 15 minutes à la BSA 5%. 300 μ l d'anticorps primaire dilué dans de la BSA 5% étaient déposés et les lames étaient placées dans une chambre humide une nuit à 4°C. L'anticorps utilisé était anti- α B-crystallin, SPA-223, stressgen, Rabbit polyclonal, dilué au 1/250^{ème}. Après deux lavages de 3 minutes au PBS, les lames étaient mises dans l'anticorps secondaire (300 μ l dilué au 1/250^{ème} dans de la BSA 5%) pendant 45 minutes à température ambiante (Jackson immunoresearch laboratories, Suffolk, UK). Les lames étaient lavées deux fois 3 minutes au PBS et une fois 3 minutes dans du PBS-BSA 5%. Puis elles étaient révélées par une solution de révélation (250 μ l AEC, 1 μ l H₂O₂ 30%, 4750 μ l tampon acétate 0.1 M pH 4.9). Une contre coloration à l'hématoxyline (4 sec) était réalisée après un lavage à l'eau courante. Les lames étaient stockées à -4°C avant observation au microscope (Eclipse E600 microscope, Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Les photographies étaient prises (caméra couleur 3 CCD, Sony, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) et analysées par un logiciel (Archimed Instruments, Evry, France).

Pour les marquages immunohistochimiques fluorescents une étape de 20 minutes dans du noir soudan était réalisée à la place de l'inhibition des peroxydases endogènes afin d'éviter l'autofluorescence des coupes de poumons. Ces lames immunohistofluorescentes étaient observées à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un apotome (Carl Zeiss MicroImaging, Inc. Thornwood, New York).

3- Quantification du collagène

Au cours de notre étude, nous avons quantifié le collagène, élément clé de la fibrose, selon deux méthodes différentes. La première était réalisée sur des coupes de poumons colorées par du Rouge Sirius, marquant spécifiquement le collagène (histomorphométrie). La deuxième était effectuée directement sur les broyats de poumons à l'aide d'un kit de quantification par dosage colorimétrique : le kit Sircol.

a- Histomorphométrie (Rouge Sirius)

La quantité de collagène était analysée sur des lames marquées au rouge Sirius (marquage réalisé par la plateforme d'histologie de la Faculté de Médecine de Dijon, Cellimap). Les lames étaient observées sous lumière polarisée et dix champs aléatoires étaient 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 dans le parenchyme pulmonaire était mesurée grâce à des cercles posés aléatoirement sur les photographies des lames (20 cercles par champs, Figure 37). Ces cercles, placés à l'intérieur du parenchyme pulmonaire, avaient un diamètre constant (640 nm). La quantité de collagène contenue dans les cercles était exprimée en pourcentage d'émission. Les bronches, les vaisseaux sanguins et la plèvre étaient exclus de cette quantification.

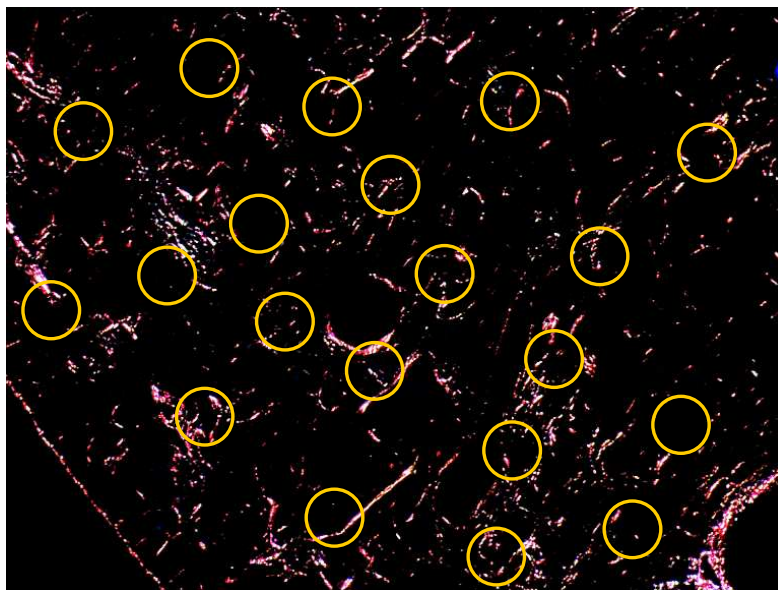


Figure 37 : Représentation des mesures histomorphométriques

Sous lumière polarisée, le rouge Sirius marquant le collagène apparaît. Chaque cercle placé aléatoirement mesure l'intensité lumineuse correspondant à la quantité de collagène présente à cet endroit précis.

b- Sircol

Le dosage du collagène des poumons a été réalisé à l'aide du kit Sircol (Biocolor LTD., Northern Ireland, UK). Cette méthode permet de doser le collagène soluble provenant de tissus, cartilages ou fluides animaux. Les poumons des souris étaient broyés dans 1 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, NaCl 2M, EDTA 1mM Tween 0.01%, cocktail d'inhibiteurs de protéases, pH 7.4) puis laissés sur roue à 4°C pendant la nuit. Pour chaque poumon, 50 µl d'extrait protéique étaient dilués dans 50 µl de tampon de lyse. 500 µl de « Reagent Dye » étaient ajoutés à chaque échantillon et à la gamme de collagène fournie avec le kit. Les tubes étaient agités sur roue à 4°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min, les surnageants étaient éliminés et les culots rincés avec 750 µl de « Cold Acid Salt Wash Reagent ». Après un second rinçage, un culot de collagène était formé au fond de chaque tube. Ce culot était repris dans 250 µl d'Alkali Reagent. On laissait reposer sur glace en vortexant régulièrement les tubes jusqu'à dissolution complète du culot. 200 µl de chaque échantillon et de la gamme étaient déposés sur une plaque 96 puits et l'absorbance était lue à 555 nm pour déterminer la concentration de chaque échantillon en collagène.

4- Quantification du TGF-β1

La quantité de TGF-β1, cytokine clé de la fibrogenèse, a été évaluée dans les LBA des animaux traités à la bléomycine, l'AdTGF ou l'AdIL1 à l'aide de kit ELISA commerciaux (R&D Systems, Lille, France). Ces dosages ont été réalisés suivant les recommandations du fabricant. La sensibilité de ce dosage est de 7 pg/ml.

5- Culture cellulaire

Des cellules épithéliales pulmonaires (A549, ATCC) et des fibroblastes pulmonaires (MRC5, ATCC) ont été cultivés en monocouche dans 5% de CO₂ à 37°C dans du milieu Ham's F10 et DMEM respectivement (Lonza, Paris, France), supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (FBS, Lonza). Les cellules ont étéensemencées à 40% de confluence un jour avant le début des traitements, puis stimulées avec du TGF-β1 recombinant humain (rTGF-β1, R & D Systems, Minneapolis, MN) dans un milieu complet à 10 ng /ml.

Culture des cellules primaires épithéliales de type II (AECII) de souris :

Les cellules alvéolaires de type II de souris ont été isolées comme décrit précédemment (342). Brièvement, les souris (n=7 pour chaque groupe WT et KO) ont été euthanasiées par surdose d'anesthésique et sacrifiées par sectionnement de l'aorte abdominale. Les poumons ont été perfusés pour enlever le sang, gonflés à la dispase (BD Biosciences, France) pendant 45 min, et broyés manuellement. La suspension obtenue a été filtrée sur des filtres de 100 -, 40 -, et 20 um et incubée pendant 2 h sur des boîtes cultures de 100 mm recouvertes d'anticorps anti-CD45 et anti-CD16/32 (BD Biosciences) pour éliminer les leucocytes. Les cellules alvéolaires de type 2 ont été récupérées à partir du surnageant par centrifugation et cultivées sur Matrigel (BD Biosciences) dans du milieu BEGM (Lonza, France) complété avec 50 unités de pénicilline par millilitre, 50 pg de streptomycine par millilitre, et 5% de sérum de veau fœtal. Trois jours après l'isolement cellulaire, les cellules alvéolaires de type 2 ont été cultivées en absence ou en présence de 10 ng/ml de rTGF- β (R&D Systems, France) pour 6h.

Culture des fibroblastes primaires de souris :

Les fibroblastes de souris ont été isolés comme décrit précédemment (343, 344). Brièvement, les souris (n=7 pour chaque groupe WT et KO) ont été euthanasiées par surdose d'anesthésique et sacrifiées par sectionnement de l'aorte abdominale. Les poumons ont été perfusés pour enlever le sang. Les poumons ont été coupés en petits morceaux placés dans une boîte de Pétri sans milieu pendant 45 minutes à 37°C pour les laisser adhérer. Du milieu DMEM + 10% de sérum, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine a été ajouté et après 5 à 7 jours des cellules mésenchymateuses ont commencé à se développer sur la boîte de Pétri. Des cellules à passage deux ont été utilisées pour les expériences.

6- ARN interference et transfection

Les SiRNA α B-crystallin ont été achetés chez Applied Biosystem (Courtaboeuf, France). Les séquences sens et antisens étaient respectivement: 5 'AGUCUUGUGACUAGUGCUG-tt-3' et 5'CAGCACUAGUCAVAAGACU-tt-3 '. Les SiRNA (50 nM) ont été transfectés avec de l'INTERFERin (Polyplus, Illkirch, France) selon les recommandations du fabricant. Six heures après transfection, le milieu a été changé pour éviter la toxicité et les cellules ont été traitées avec rTGF- β 1.

Pour surexprimer α B-crystallin, un plasmide pcDNA6 codant l' α B-crystallin humaine a été utilisé. Les transfections ont été réalisées dans de l'OptiMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise,

France) et les réactifs de transfection Nanojuice (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) ont été utilisés selon les recommandations du fabricant.

7- Fractionnement cellulaire

Afin d'étudier la localisation cytoplasmique et nucléaire de certaines protéines cibles en fonction de nos traitements (SiRNA, surexpression, rTGF- β 1), nous avons réalisé des extractions fractionnées des protéines cellulaires. Pour cela, nous avons utilisé le kit de fractionnement cellulaire « NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction kit » (Pierce - thermo scientific, Rockford, IL) suivant les instructions du fabricant.

Lors de ces expériences, nous avons également utilisé la leptomycine B (LMB, Invivogen, San Diego, USA) pour inhiber l'export nucléaire (20 ng/ml pour 1 heure).

8- Western blotting

30 à 50 μ g d'extraits protéiques (selon la protéine à analyser) étaient déposés sur un gel de polyacrylamide de concentration allant, pour nos études, de 8 à 12% (selon la masse moléculaire de la protéine d'intérêt) après ajout de tampon de charge (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, β -mercapto-éthanol 5%, SDS 2.3%, Glycérol 10%, bleu de bromophénol 0.01%) et dénaturation à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines étaient alors séparées selon leur poids moléculaire sous l'action d'un champ électrique de 110 Volts dans un tampon de migration (glycine 200 mM, SDS 0.01%, Tris 25 mM).

Les protéines étaient ensuite transférées pendant 1 heure et 30 minutes sur une membrane de type PVDF (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France), activée préalablement dans un bain d'éthanol, à 47 Volts dans un tampon de transfert (Tris 50 mM, acide borique 50mM). Les membranes étaient alors saturées pendant 45 minutes à température ambiante dans du TPBS (PBS, Tween-20 0.1%) contenant 8% de lait en poudre écrémé puis incubées toute la nuit à 4°C sous agitation douce avec un anticorps primaire spécifique.

Après 3 lavages de 10 minutes au TPBS, les membranes étaient incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin, Jackson Immunoresearch Laboratories) dilué au 1/5000^{ème} dans du TPBS contenant 5% de lait écrémé.

Après 3 nouveaux lavages de 10 min au TPBS, les membranes étaient incubées 1 minute avec un réactif chemiluminescent (solution ECL, Santa-Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelyne, France) puis mises en contact avec un film autoradiographique spécifique du signal ECL (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences) dans une cassette de type Hypercassette™ (Amersham Biosciences). Après 30 secondes à 15 minutes d'exposition, les films étaient révélés par des solutions de révélation puis de fixation (Kodak, Paris, France).

Anticorps utilisés : α B-crystallin (mouse clone 1B6.1-3G4 et rabbit polyclonal, enzo life science), c-myc (rabbit polyclonal, thermo scientific), importin 8 (rabbit polyclonal, abcam), Smad4 (rabbit clone H-552, santa cruz biotechnology), TIF1 γ (Mouse clone 16G9, abcam), Ubiquitin (mouse clone P4D1, santa cruz biotechnology), PAI-1/SERPINE1 (mouse clone 3A120, thermo scientific), E-cadherin (rabbit clone 24E10, cell signaling), HSP47 (mouse clone M16.10A1, enzo life science), smad2 (rabbit clone 86F7, cell signaling), Phospho-Smad2 (Ser 465/467, rabbit polyclonal, cell signaling), Smad3 (rabbit polyclonal, thermo scientific), Phospho-Smad3 (Ser 423/425, rabbit clone C25A9, cell signaling), Smad7 (rabbit polyclonal, thermo scientific), α -SMA (mouse clone CGA7, santa cruz biotechnology). HSC70 (mouse clone B-6, santa cruz biotechnology) servait de contrôle de dépôt. HSP60 (goat polyclonal, enzo life science) servait de contrôle de dépôt cytoplasmique et PARP-1 (mouse clone F-2, santa cruz biotechnology) servait de contrôle de dépôt nucléaire pour le fractionnement cellulaire.

9- Co-immunoprécipitation

Les co-immunoprécipitations étaient réalisées grâce au kit Exactacruz™ (Santa-Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelyne, France). 50 μ l d'IP-matrix (billes enrobées de protéines A/G) étaient introduits dans des tubes eppendorfs 1.5 ml puis 6 μ l d'anticorps spécifiques de la protéine à précipiter ou d'anticorps contrôles étaient ajoutés (volumes donnés par le fournisseur). Le volume était complété à 500 μ l par du PBS. Le mélange était placé sur roue à 4°C pendant 2h pour que les anticorps se fixent aux billes.

Anticorps utilisés : α B-crystallin (mouse clone 1B6.1-3G4, enzo life science), TIF1 γ (Mouse clone 16G9, abcam), Ubiquitin (mouse clone P4D1, santa cruz biotechnology), Smad4 (rabbit clone H-552, santa cruz biotechnology), Smad3 (rabbit polyclonal, thermo scientific).

Les tubes étaient ensuite centrifugés à 13 200 rpm pendant 30 secondes pour culotter les anticorps accrochés aux billes. Les billes étaient lavées par 500 μ l de PBS et centrifugées à

nouveau à 13 200 rpm 30 secondes. Après deux lavages effectués, 1 mg de protéine (lysate cellulaire total ou extraits fractionnés cyto/noyau) était ajouté sur les billes. Le volume était complété à 500 µl par du tampon de lyse NP40 (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 0.01%, cocktail d'inhibiteurs de protéases). Le mélange était placé sur roue à 4°C pendant la nuit pour que les anticorps préalablement fixés aux billes puissent capturer les protéines et les complexes protéiques d'intérêts. Trois lavages au PBS étaient ensuite réalisés comme décrit précédemment. Après les lavages, 50 µl de tampon de charge (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, β-mercapto-éthanol 5%, SDS 2.3%, Glycérol 10%, bleu de bromophénol 0.01%) étaient ajoutés à chaque tube puis les échantillons étaient dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Après centrifugation à 13 200 rpm 5 minutes (pour culotter les billes et ne garder que les protéines immunoprécipitées ainsi que les protéines interagissant avec ces dernières) les échantillons étaient déposés sur un gel d'acrylamide où les protéines étaient alors séparées selon leurs poids moléculaires sous l'action d'un champ électrique (Western Blotting).

10- RTq-PCR

Les ARN totaux des cellules ont été extraits à l'aide de TRIzol (1 ml, Invitrogen) puis du chloroforme (200µl). Les ARN ont été précipités avec de l'isopropanol (1 ml) et resuspendus dans de l'H₂O RNAase-free. La reverse-transcription a été effectuée sur les ARN totaux en utilisant le kit M-MLV (Promega, Charbonnières, France). Brièvement, les ARN sont mélangés avec des random primers et chauffés 5 minutes à 70°C pour l'hybridation. La reverse-transcriptase et un cocktail de dNTP sont ajoutés et chauffés 60 minutes à 37°C puis 10 minutes à 65°C. La RTq-PCR a été réalisée sur les ADNc ainsi obtenus en utilisant le « SYBR green master mix » (Promega). Les séquences d'amorce humaines sens et antisens ont été les suivantes : αB-crystallin, 5'-CACCCAGCTGGTTTGACACT-3' et 5'-TTCCTCTGGGGAGAAGTGCT-3'; α-SMA, 5'-TGGTCGGTATGGGTCAGAAAG-3' et 5'-TCAGGGTCAGGATACCTCTCTTG-3'; E-cadherin, 5'-ACAGCCCCGCCTTATGATT-3' et 5'-CTTCGGAACCGCTTCCTTCA- 3'; PAI-1, 5'-CGTGGTTTTCTCACCTATGG-3' et 5'-CTGGGTTTTCTCCTCCTGTTGTC-3'; et TGF-β1, 5'-CTGCTGTGGCTACTGGTGTC-3' et 5'-CTTCACCAGCTCCATGTTCGAT-3'. Les séquences d'amorce murines sens et antisens ont été les suivantes: αB-crystallin, 5'-AGGGAAGTGGCTGTTGAGAAG-3' et 5'-GCCTCTTCGACCAGTTCTTCG-3'; TGF-β1, 5'-CGTGGCTTCTAGTGCTGACGC-3' et 5'-CCATGTTCGATGGTCTTGCAGGT-3';

PAI-1, 5'-GGCCGTGGAACAAGAATGAGAT-3' et 5'-GCTTGAAGAAGTGGGGCATGAAG-3'; Snai2, 5'-AAACATTTCAACGCCTCCA-3' et 5'-CGAGGTGAGGATCTCTGGTT-3'.

11- Immunofluorescence

Les cellules étaient implantées sur des lamelles en verre dans des plaques 24 puits et traitées au rTGF- β 1. Après traitement, les cellules étaient lavées rapidement dans du PBS puis fixées par du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après un lavage au PBS, elles étaient perméabilisées par une solution de PBS et de triton 0.1% pendant 3 minutes à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les échantillons étaient saturés 20 minutes par une solution de PBS-BSA 5% à température ambiante. Les cellules étaient ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans une solution de PBS-BSA 1% toute la nuit à 4°C dans une chambre humide.

Anticorps utilisés: Smad4 (rabbit clone EP618Y, Abcam), α B-crystallin (mouse clone 1B6.1-3G4, enzo life science).

Les lames étaient alors lavées 3 fois au PBS et incubées 45 minutes à température ambiante avec les anticorps secondaires (Alexa Fluor 488 nm, longueur d'onde d'excitation : 488 nm, longueur d'onde maximale : 519 nm, Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France et Alexa Fluor 594 nm, longueur d'onde d'excitation : 590 nm, longueur d'onde maximale : 617 nm, Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dilué au 1/1000^{ème} dans une solution de PBS contenant 1% de BSA. Après 3 lavages au PBS, les lamelles étaient déposées sur des lames Frost + sur du milieu de montage contenant du DAPI (ProLong® Gold antifade reagent, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les lames étaient ensuite observées par microscopie à fluorescence (Carl Zeiss MicroImaging, Inc. Thornwood, New York).

12- Analyses statistiques

Les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney grâce au logiciel Statview. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Tous les résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences différentes.

II- Résultats

1- α B-crystallin est surexprimée au cours du processus de fibrose pulmonaire

Afin de montrer l'implication potentielle d' α B-crystallin dans la fibrogenèse pulmonaire, nous avons cherché si elle était surexprimée en condition de fibrose chez l'homme et dans des modèles animaux. L'examen histologique des poumons de patients atteints de FPI a montré qu' α B-crystallin était relativement abondante dans les zones de fibrose (Figure 38). En effet, les cellules épithéliales hyperplastiques situées autour des foyers fibroblastiques exprimaient fortement α B-crystallin (Figure 38). Les myofibroblastes au sein même des foyers fibroblastiques étaient également positivement marqués pour cette sHSP. En revanche, α B-crystallin était à peine détectable dans le parenchyme pulmonaire chez les patients non atteints de FPI. Par la suite, afin de confirmer cette observation, différents modèles de fibrose pulmonaire chez le rongeur ont été utilisés.

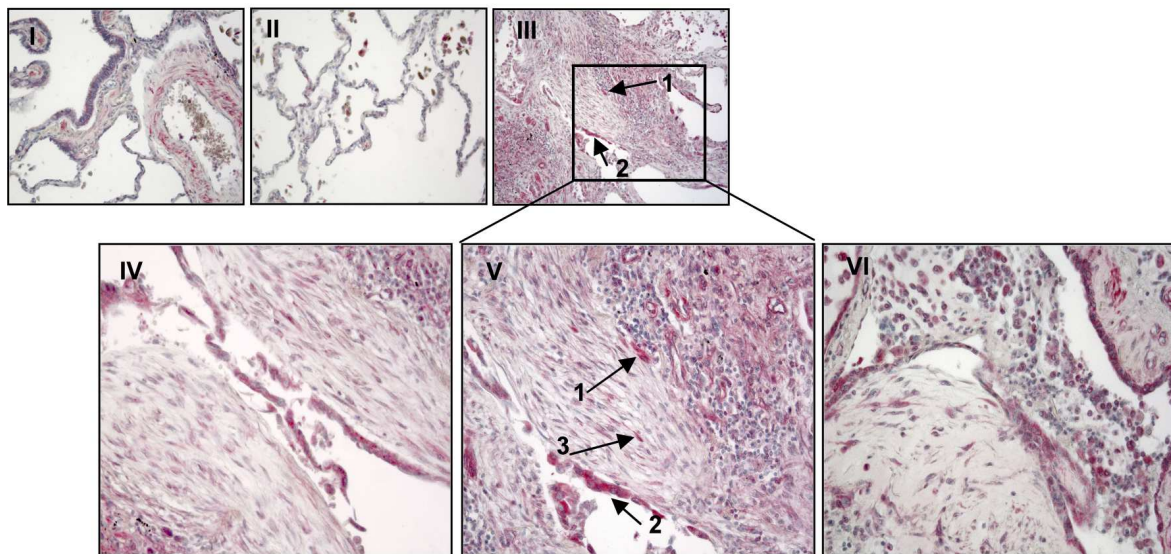


Figure 38 : α B-crystallin est exprimée dans le tissu pulmonaire fibrotique chez les patients atteints de FPI

Immunohistochimie d' α B-crystallin. I et II- Coupes de poumons de patients non atteints de FPI (n = 4), III, IV, V, et VI- coupes de poumons fibreux chez des patients atteints de IPF (n = 6). Les cellules épithéliales alvéolaires (flèches 1 et 2) et les myofibroblastes (flèche 3) sont positives pour le marquage α B-crystallin. Grossissement 200x (I, II et III) et 400x (IV, V et VI). I, II et IV, V, VI : photos de patients contrôles et atteints de FPI différents.

Comme précédemment décrit, l'administration intratrachéale de bléomycine chez la souris est un modèle animal classique de fibrose qui reproduit les lésions pulmonaires aiguës observées chez les patients. En parallèle de la formation de la fibrose, la bléomycine induisait également une augmentation significative de l'expression d' α B-crystallin (Figure 39A).

Les rats ayant reçu un adénovirus codant pour le TGF- β 1 (AdTGF) par injection intratrachéale développent une fibrose au niveau du parenchyme pulmonaire. Un marquage immunohistochimique de coupes de poumons montrait qu' α B-crystallin était fortement exprimée chez les animaux ayant été soumis à l'AdTGF (Figure 39B). En revanche, pratiquement aucune expression d' α B-crystallin n'était observée chez les animaux témoins ayant reçu un adénovirus vide (AdDL) et ne développant pas de fibrose.

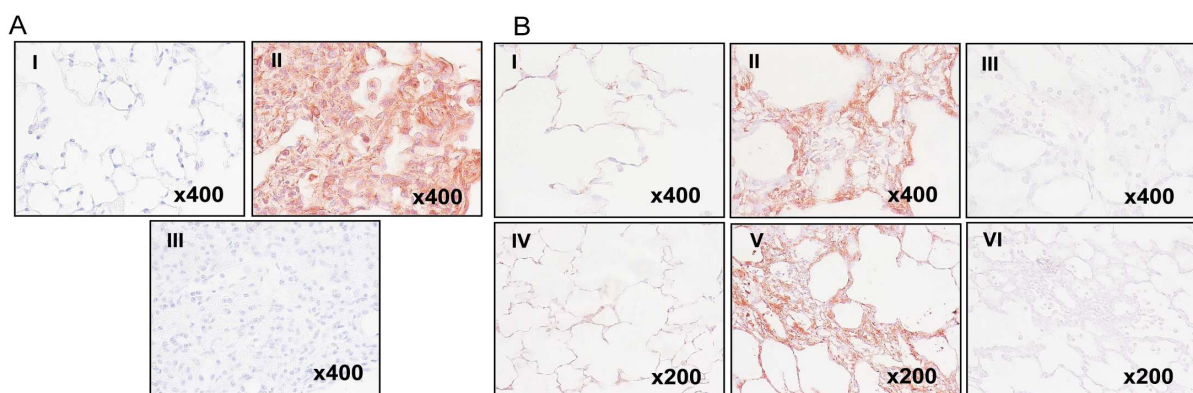


Figure 39 : α B-crystallin est surexprimée dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire

A) Immunohistochimie d' α B-crystallin sur des coupes de poumons de souris recevant soit du NaCl (I) soit de la bléomycine (II) par injection intratrachéale. Une image représentative (400x, n = 6) obtenue à J21 après le traitement est présentée. III) Contrôle négatif utilisant un anticorps non relevant (400x).

B) Immunohistochimie d' α B-crystallin sur des tissus pulmonaires de rats ayant reçu soit un adénovirus contrôle (AdDL, I et IV) soit un adénovirus codant le TGF- β 1 (AdTGF, II et V) par administration intratrachéale. Une image représentative obtenue à J21 après l'administration de l'adénovirus est présentée (panneau supérieur 400x et panneau inférieur 200x, n = 6). III et VI) Contrôle négatif utilisant un anticorps non relevant (200x et 400x).

2- Les souris déficientes pour α B-crystallin ont une structure pulmonaire normale au cours du vieillissement

Dans une étude datant de 2001, Brady *et al.* ont décrit le phénotype des souris α B-crystallin KO. Comme nous l'avons déjà évoqué, ces souris présentaient des troubles mineurs du cristallin ainsi que des problèmes au niveau des muscles squelettiques au cours du vieillissement (299). Cependant, même si α B-crystallin est fortement exprimée dans le cœur (287), ces souris avaient une structure cardiaque normale tout au long de leur vie. Dans notre

étude, nous avons étudié l'architecture du poumon chez les souris KO pour α B-crystallin (α B-KO). Nous avons d'abord confirmé que les souris α B-KO n'exprimaient pas la protéine ni dans les tissus cardiaques ni au niveau des poumons, contrairement aux animaux de type sauvage (WT, Figure 40A). L'examen histologique des poumons des souris α B-KO n'a pas révélé de changements morphologiques au cours du vieillissement par rapport aux souris WT (Figure 40B). En effet, aucun signe de fibrose ni d'emphysème (élargissement des alvéoles pulmonaires) n'a été observé chez les souris WT et KO âgées de 8, 16 et 48 semaines.

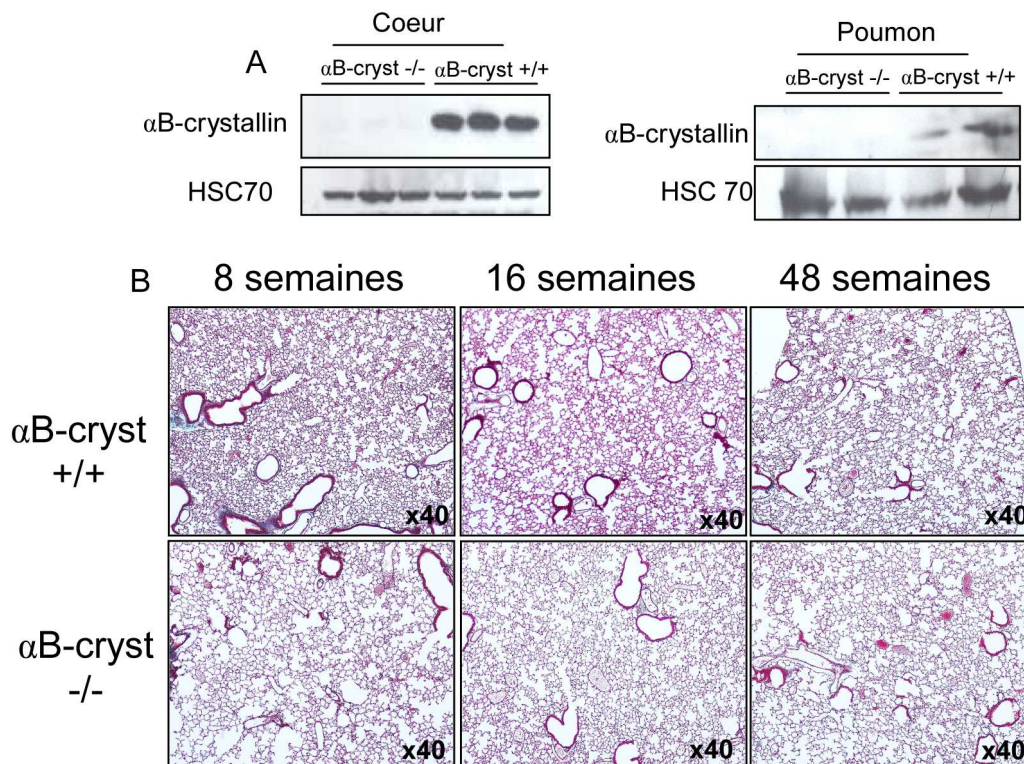


Figure 40 : Le manque d' α B-crystallin n'affecte pas la structure pulmonaire au cours du vieillissement

A) L'expression d' α B-crystallin était analysée par Western blot sur des extraits protéiques cardiaques (gauche) et sur des extraits totaux de poumons (droite) provenant de souris SV129 WT et KO non traitées. HSC70 servait de contrôle de dépôt.

B) Coupes de poumons de souris SV129 KO pour α B-crystallin (panneau inférieur) ou WT (panneau supérieur) non traitées, âgées de 8, 16 et 48 semaines. Coloration au trichrome de Masson (x25), des images représentatives sont présentées (n = 8/groupe).

Des mesures histomorphométriques et un dosage du collagène grâce au Sircol ne montrent aucune différence dans l'accumulation de collagène entre les souris WT et KO au cours du vieillissement. Suivant les deux méthodes, le taux total de collagène augmentait avec l'âge dans les deux groupes de souris, comme nous pouvions le prévoir (Figure 41). Suite à ces

expériences, nous avons conclu que le manque d' α B-crystallin n'affectait pas spontanément la structure pulmonaire chez les souris au cours du vieillissement.

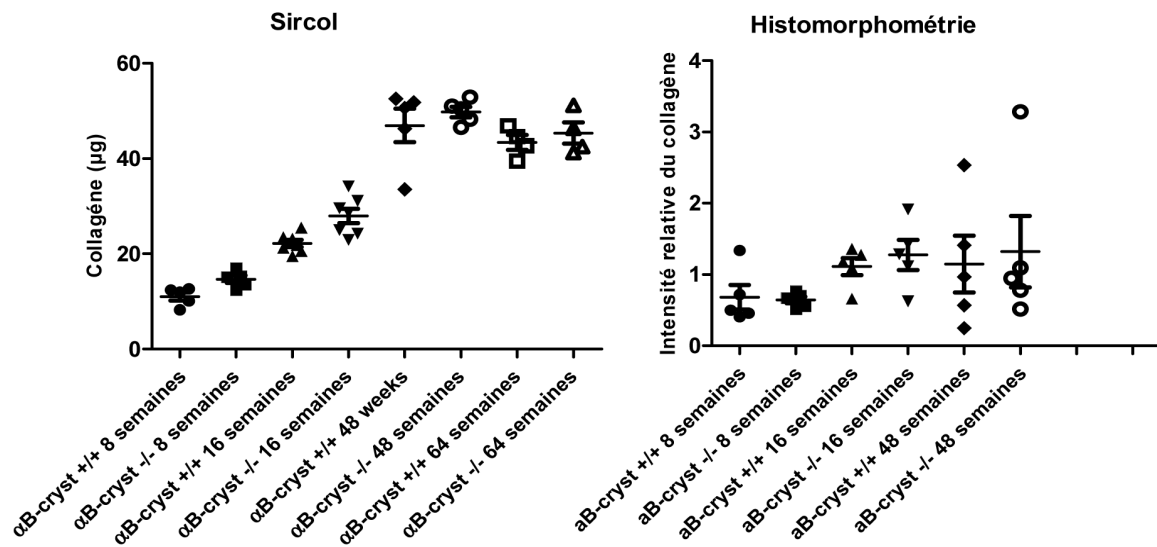


Figure 41 : Le manque d' α B-crystallin n'affecte pas le taux de collagène dans les poumons en conditions normales

Quantification du collagène en utilisant un dosage Sircol (à gauche) ou des mesures histomorphométriques (à droite) sur des poumons de souris WT et KO non traitées, âgées de 8, 16 et 48 semaines. Moyenne \pm SEM, n = 6/groupe pour le Sircol, n = 5/groupe pour l'histomorphométrie.

3- L'absence d' α B-crystallin limite la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine *in vivo*

La phase précoce du modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est caractérisée par une importante inflammation. En effet, sept jours après l'administration intratrachéale de bléomycine, le nombre total de cellules dans le LBA augmentait significativement, comparé aux LBA des souris contrôles recevant du NaCl, avec un pourcentage accru de lymphocytes et de neutrophiles. Cependant, l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires était similaire entre les souris WT et KO (Figure 42A-B). Ces résultats suggèrent que l'absence d' α B-crystallin n'avait aucun impact sur l'inflammation induite par la bléomycine dans ce modèle.

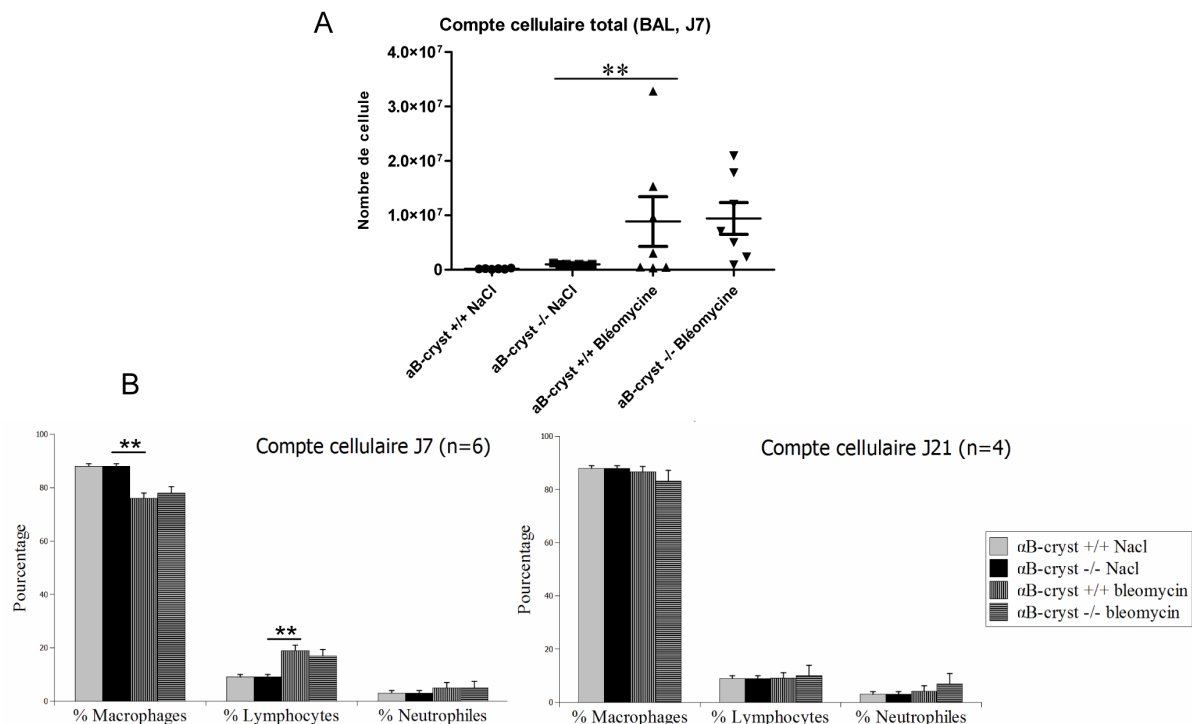


Figure 42 : L'absence d' α B-crystallin n'affecte pas l'inflammation induite par la bléomycine

A) Les LBA ont été prélevés chez des souris KO et WT traitées à la bléomycine ou au NaCl et les cellules ont été comptées sur des lames Kova. Moyenne \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, $n = 7$ /groupe.

B) Les cytoplines des LBA ont été marqués par une coloration GIEMSA et une formule leucocytaire a été réalisée à J7 (à gauche) et J21 (à droite). Moyenne \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, $n = 6$ /groupe.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, α B-crystallin a des capacités anti-apoptotiques connues (305-307) et les processus apoptotiques peuvent avoir une importance majeure dans l'initiation de la fibrose. Afin d'évaluer l'impact de l'absence d' α B-crystallin chez les KO sur l'apoptose induite par la bléomycine, des marquages TUNEL (marquage de la mort cellulaire) sur les coupes de poumon de souris WT et KO ont été effectués. Dans notre modèle, la quantité de cellules apoptotiques retrouvée dans les poumons a été significativement augmentée après injection de bléomycine mais sans aucune différence entre les souris KO et WT (Figure 43).

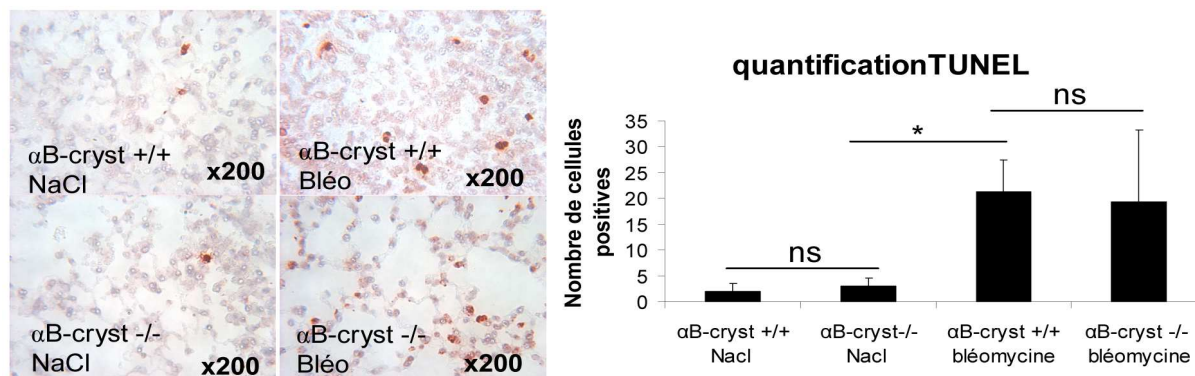


Figure 43 : L'absence d' α B-crystallin n'affecte pas l'apoptose induite par la bléomycine

La quantité de cellules apoptotiques a été calculée chez les poumons de souris après traitement à la bléomycine. Marquage TUNEL (x100). Des photos représentatives sont présentées (n = 5). Le panneau de gauche représente le nombre de cellules positives au marquage TUNEL. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$, n = 5 par groupe.

Bien que l'absence d' α B-crystallin n'affecte pas l'inflammation ni l'apoptose induite par la bléomycine, les sections de poumons des animaux traités ont montré que les souris déficientes pour α B-crystallin étaient protégées de la fibrose induite par la bléomycine. En effet, 21 jours après l'injection de bléomycine, les souris WT développaient comme attendu, une fibrose pulmonaire sévère caractérisée par une forte accumulation de collagène détruisant la structure alvéolaire des poumons. Au contraire, les souris KO développaient une fibrose plus limitée avec une accumulation moindre de collagène et une architecture des alvéoles en partie conservée (Figure 44). Les souris WT et KO recevant du NaCl avaient une structure pulmonaire normale tout au long de l'expérience.

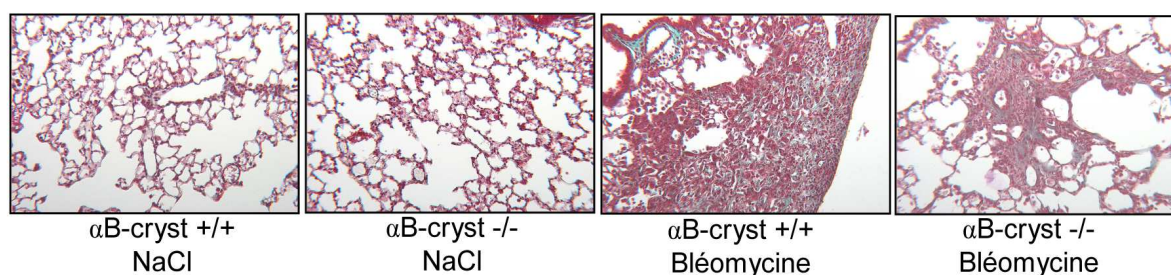


Figure 44 : Les souris déficientes pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose induite par la bléomycine

Coupes de poumons de souris WT et KO à J21 après administration intratrachéale de bléomycine. Coloration trichrome de Masson (x100, n=8).

Le dosage Sircol montrait que le traitement par la bléomycine augmentait la quantité de collagène d'un facteur 3 chez les souris WT, alors qu'elle n'augmentait que de 1,3 fois chez

les souris KO (Figure 45A) par rapport à leurs témoins respectifs (NaCl). Ce résultat a été confirmé par les mesures histomorphométriques qui démontraient que la quantité de collagène augmentait de 5 fois chez les souris WT alors qu'elle n'augmentait que de 2 fois chez les souris KO par rapport à leurs témoins respectifs (Figure 45A).

De manière intéressante, à J7 après l'injection bléomycine, le taux de protéine HSP47 était élevé chez les souris WT et KO probablement en corrélation avec l'augmentation de la production de collagène. Cependant, à J21 le niveau d'HSP47 chez les souris WT restait élevé alors que chez les souris déficientes en α B-crystallin HSP47 n'était plus surexprimé (Figure 45B). Ce résultat est en corrélation avec la quantité plus faible de collagène observée chez les souris KO à J21 (Figure 45A).

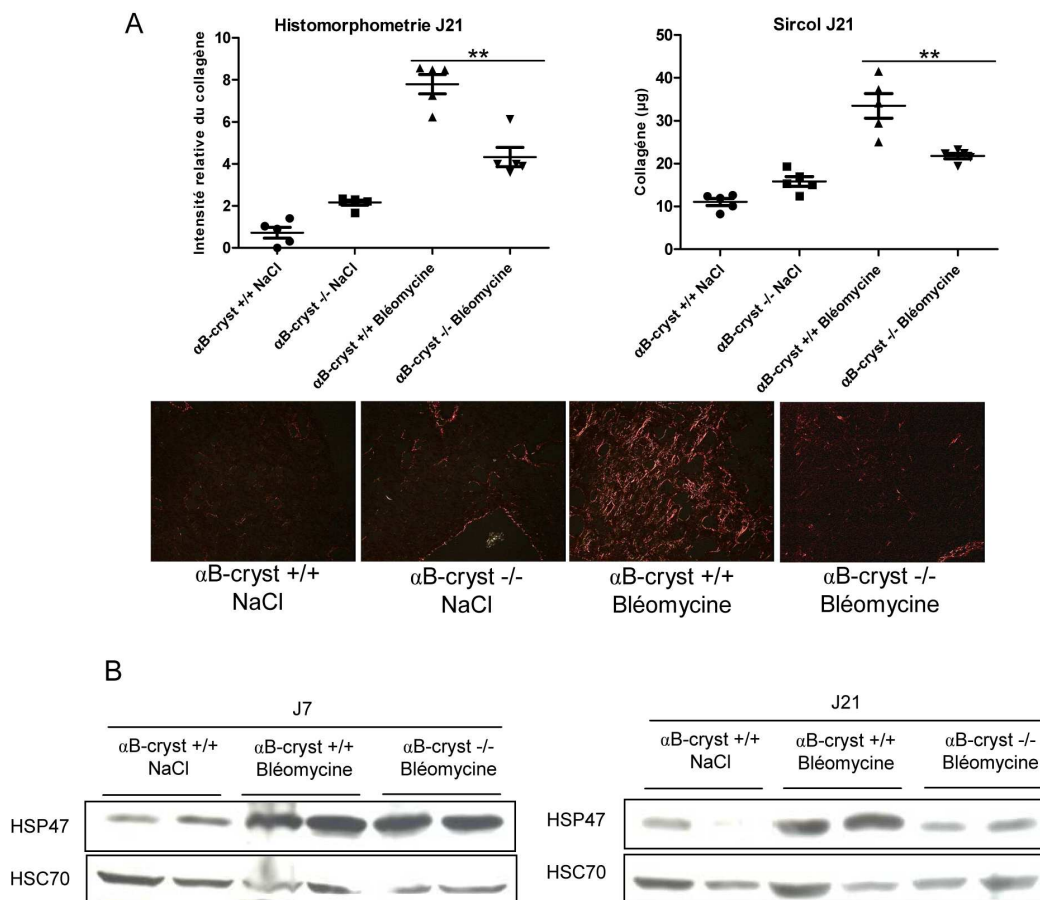


Figure 45 : L'accumulation de collagène induite par la bléomycine est plus faible chez les souris déficientes pour α B-crystallin

A) Quantification du collagène par le Sircol (à droite) et des mesures histomorphométriques (à gauche) sur des poumons de souris WT et KO à J21. Moyenne \pm SEM, $**p \leq 0.01$, $n=6$ /groupe. Photographies en lumière polarisées de coupes de poumons marquées au rouge Sirius (panel bas). Des images représentatives sont présentées ($n=6$).

B) Expression d'HSP47 analysée par Western blot à partir d'extraits de poumons totaux de souris WT et KO à J7 et J21. HSC70 servait de contrôle de charge.

En outre, un test ELISA montrait que le niveau de TGF- β 1 dans les LBA de souris WT était significativement augmenté 21 jours après l'injection de bléomycine. Cependant, cette surexpression de TGF- β 1 était significativement plus faible (2 fois) chez les souris KO (Figure 46). Nous pensons que ce déficit d'expression du TGF- β 1 induit par la bléomycine était lié à la limitation de la fibrose observée en l'absence de α B-crystallin.

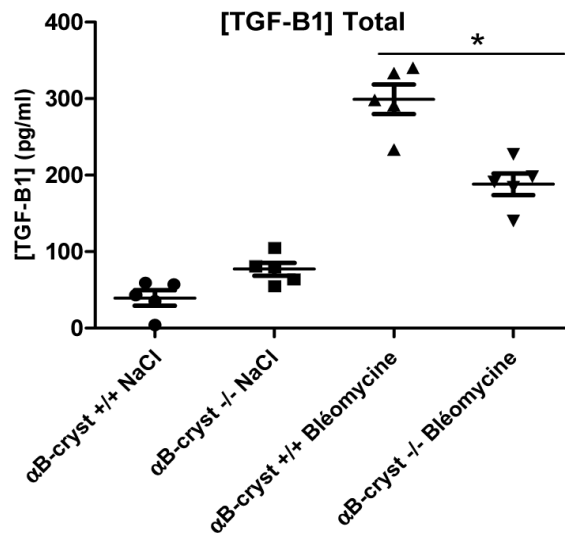


Figure 46 : Le taux de TGF- β 1 est plus faible dans les LBA des souris déficientes pour α B-crystallin

Le taux de TGF- β 1 total était mesuré par un test ELISA sur les LBA de souris WT et KO à J21. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0.05$, $n=6$ /groupe.

4- α B-crystallin est également impliquée dans la fibrose pulmonaire induite par une cytokine pro-inflammatoire, IL-1 β

Nous avons ensuite cherché à confirmer l'effet anti-fibrotique résultant de l'absence d' α B-crystallin chez les souris KO en utilisant un autre modèle *in vivo* de fibrose pulmonaire. Les souris WT et les souris α B-KO recevaient un adénovirus codant la protéine IL-1 β (AdIL1) par voie intratrachéale. Ce modèle bien connu induit une fibrose pulmonaire impliquant une inflammation initiale et une augmentation ultérieure de l'expression du TGF- β 1 (78).

La quantification du collagène grâce à un dosage Sircol et des mesures histomorphométriques montrait que la surexpression transitoire d'IL-1 β induisait une fibrose nettement moins sévère dans les poumons de souris KO par rapport aux souris WT à J18 (Figure 47).

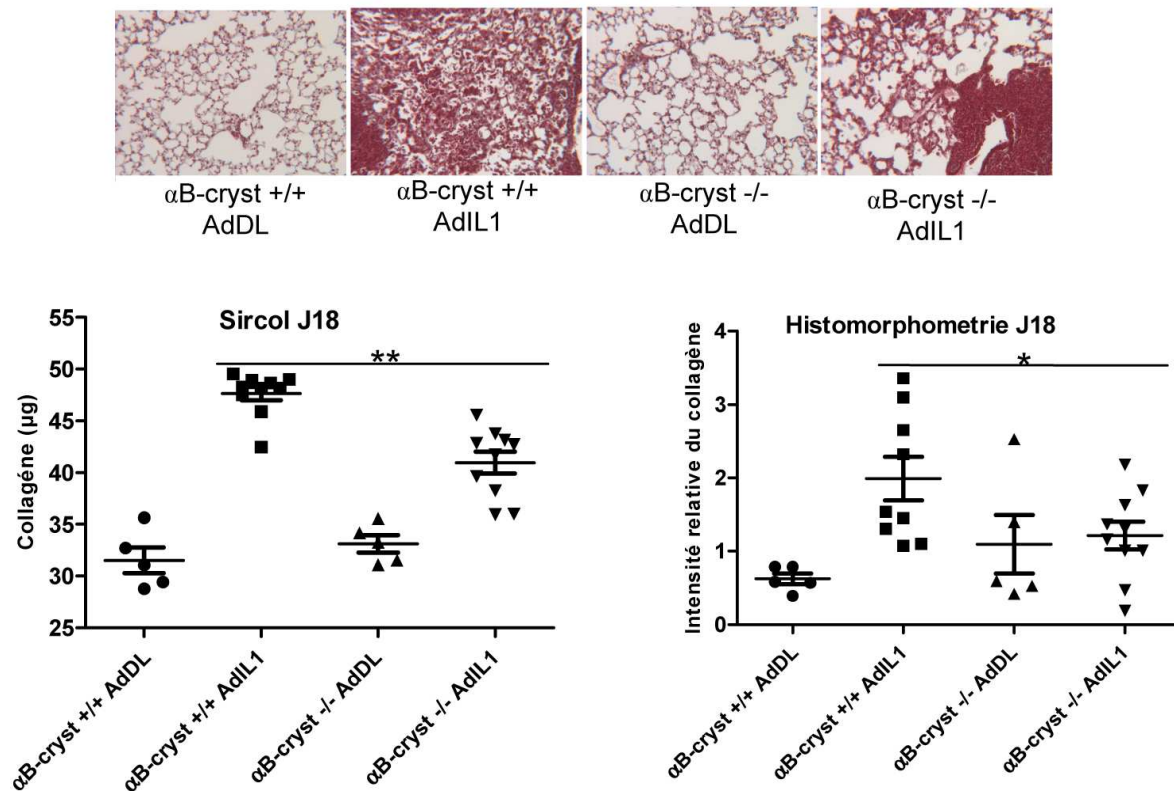


Figure 47 : Les souris déficientes pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose induite par l'AdIL1

Coupes de poumons de souris WT et KO à J18 après administration intratrachéale d'AdIL1. Coloration trichrome de Masson (x100, panel haut, n=10). Quantification du collagène par le Sircol et des mesures histomorphométriques sur des poumons de souris WT et KO à J18 (panel bas). Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0.05$ et ** $p \leq 0.01$, n=8/groupe.

En outre, la surexpression transitoire d'IL-1 β , *in vivo*, induisait une augmentation de l'expression du TGF- β 1 au niveau de l'ARN (figure 48A) et au niveau protéique (Figure 48B-C) dans les poumons de souris WT. Cette expression du TGF- β 1 induite par l'IL-1 β était significativement plus faible chez les souris KO (Figure 48A-C).

Ces résultats suggèrent que les souris KO pour α B-crystallin présentent une voie de signalisation du TGF- β 1 déficiente qui pourrait les protéger de la fibrose induite par un phénomène inflammatoire précoce (induit par AdIL1 β ou la bléomycine).

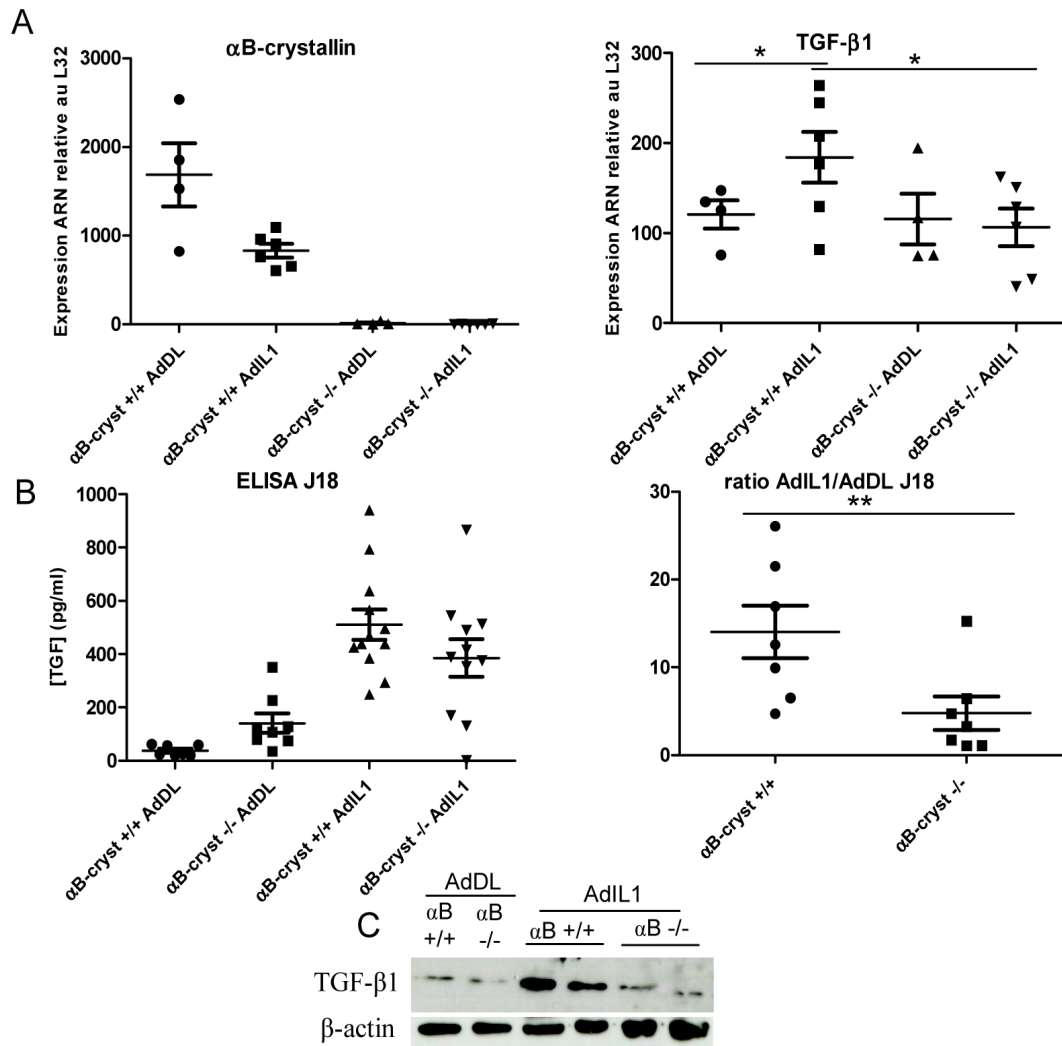


Figure 48 : Les souris déficientes pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose induite par l'AdIL1

A) Les taux d'ARN du TGF β 1 et d' α B-crystallin ont été analysés par rt-PCR dans des poumons de souris WT et KO recevant de l'AdIL1 ou de l'AdDL comme contrôle (J6). Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0.05$, $n=8$ /groupe.

B) Le taux de TGF- β 1 total était mesuré par un test ELISA sur les LBA de souris WT et KO à J18. Moyenne \pm SEM, ** $p \leq 0.01$, $n=8$ /groupe.

C) Le taux de TGF- β 1 était analysé par Western blot sur les poumons de souris WT et KO ayant reçu de l'AdIL1 ou de l'AdDL à J18. La β -actine servait de contrôle de charge.

5- α B-crystallin régule l'expression du TGF- β 1 et de ses gènes cibles *in vivo* et *in vitro*.

Afin de comprendre pourquoi l'expression du TGF- β 1 ainsi que la fibrose en résultant étaient limitées chez les souris α B-KO, nous avons étudié le rôle α B-crystallin sur la voie TGF- β 1. Pour mettre en évidence spécifiquement un rôle potentiel d' α B-crystallin sur la voie du TGF-

$\beta 1$ *in vivo*, notre modèle murin basé sur l'injection intratrachéale d'adénovirus codant pour le gène TGF- $\beta 1$ chez les souris KO et WT (AdTGF) a été utilisé.

Un test ELISA et une analyse par rt-PCR des ARN totaux de poumons ont montré que les souris WT et KO sont capables d'exprimer l'AdTGF de manière similaire. En effet, le taux d'expression du TGF- $\beta 1$ humain exogène (venant des adénovirus) était identique chez les souris WT et KO au niveau protéique et ARN (Figure 49A-B). Cependant, l'absence d' αB -crystallin chez les souris KO perturbait l'expression de l'ARN du TGF- $\beta 1$ endogènes ainsi que celle de PAI-1, une protéine régulée par la voie TGF- $\beta 1$ (345, 346), Figure 49B). Il est intéressant de noter que l'expression d' αB -crystallin était significativement augmentée en présence de TGF- $\beta 1$ chez les souris WT (Figure 49B).

En outre, *in vivo*, la surexpression transitoire du TGF- $\beta 1$ induisait une forte augmentation de l'expression du procollagène chez les souris WT mais pas chez les souris KO pour αB -crystallin (Figure 49B).

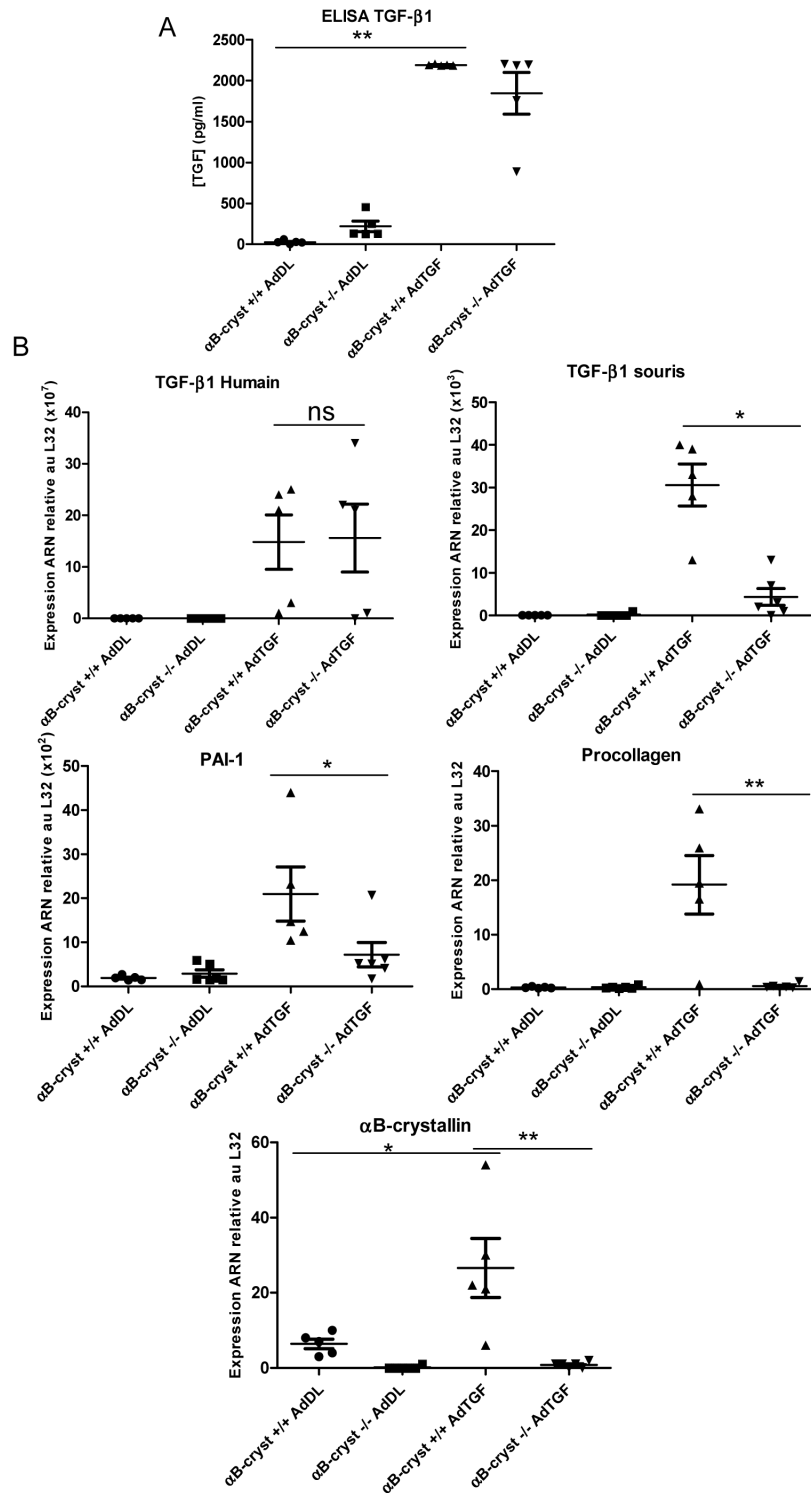


Figure 49 : Les souris α B-KO présentent une voie de signalisation du TGF- β 1 déficiente

A) Le TGF- β 1 total a été mesuré par un test ELISA qui détecte à la fois le TGF- β 1 humain et celui de rongeurs. Les mesures ont été effectuées sur les LBA de souris WT et KO, 7 jours après administration intratrachéale d'AdTGF ou d'AdDL. Moyenne \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, $n = 6$ /groupe.

B) Les niveaux d'ARN du TGF- β 1 humain, TGF- β 1 de souris, PAI-1, procollagen et α B-crystallin ont été analysés par PCR quantitative sur les tissus pulmonaires de souris WT et KO, 7 jours après administration intratrachéale d'AdTGF- β 1 ou d'AdDL. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$, $n = 6$ /groupe.

Nous avons ensuite étudié le rôle d' α B-crystallin sur les gènes cibles du TGF- β 1 *in vitro*. Comme les cellules alvéolaires épithéliales hyperplasiques semblaient surexprimer fortement α B-crystallin dans les poumons de patients atteints de FPI (Figure 38), nos expériences ont été conduites sur des cellules épithéliales pulmonaires. Nous avons d'abord démontré dans les cellules A549, que le traitement au TGF- β 1 recombinant (rTGF- β 1) induisait une augmentation de l'expression d' α B-crystallin à 12 heures d'exposition (Figure 50).

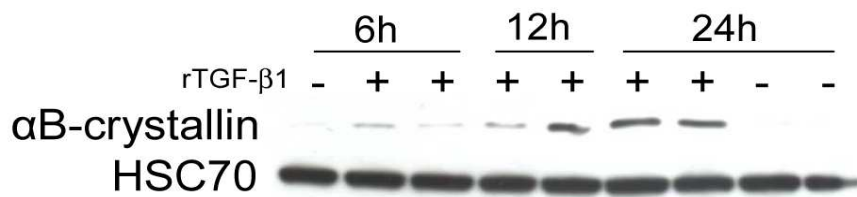


Figure 50 : α B-crystallin est surexprimée par un traitement au rTGF- β 1

Des cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 ont été soit traitées avec du rTGF- β 1 (10 ng/ml) soit laissées sans traitement. L'expression d' α B-crystallin a été analysée par Western blot. HSC70 a servi de contrôle de charge.

Grâce à l'inhibition d' α B-crystallin sur les cellules A549 par des SiRNA, nous avons constaté que l'inhibition de l'expression d' α B-crystallin diminuait considérablement l'expression des gènes PAI-1 (52 fois) et TGF- β 1 (7 fois, Figure 51A), ce qui suggère un effet direct d' α B-crystallin sur la boucle d'auto-activation du TGF- β 1. En outre, la capacité connue du TGF- β 1 à inhiber l'E-cadhérine dans les cellules épithéliales (144) était contrée par l'inhibition d' α B-crystallin (figure 51A). De plus, la surexpression d' α B-crystallin dans les cellules A549 augmentait considérablement l'expression du TGF- β 1 et de PAI-1 (Figure 51B). La surexpression d' α B-crystallin augmentait également l'expression d' α -SMA (Figure 51B), comme habituellement observé en présence de rTGF- β 1 (144). Des résultats similaires ont également été trouvés au niveau protéique (Figure 51C).

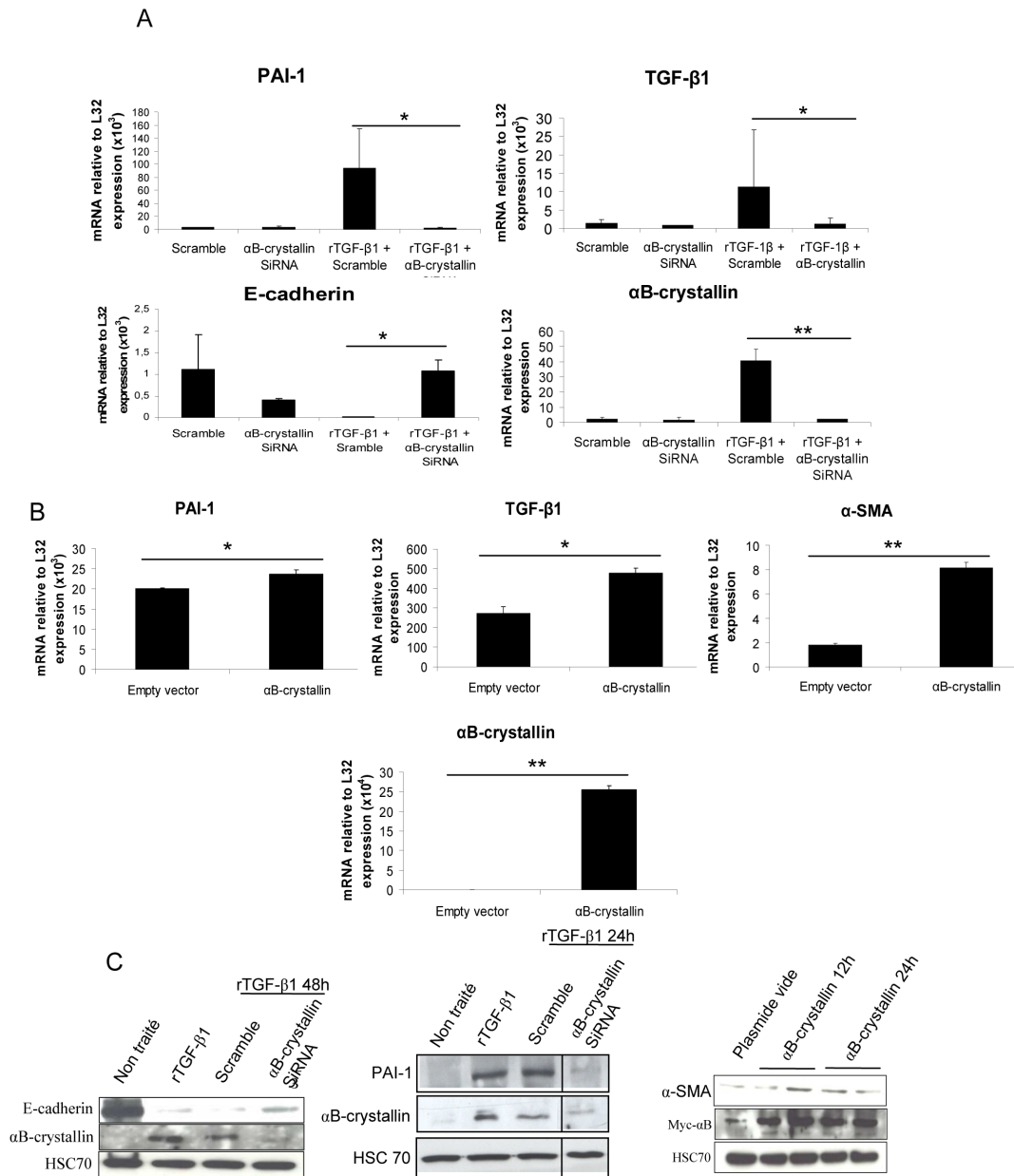


Figure 51 : αB-crystallin régule l'expression des gènes cibles du TGF-β1 dans les cellules A549

A) Les expressions des gènes αB-crystallin, TGF-β1, E-cadhérine et PAI-1 ont été analysées par PCR quantitative après traitement au rTGF-β1 des cellules A549 transfectées avec soit un siRNA scramble (contrôle) soit un siRNA spécifique pour αB-crystallin (24h, 10 ng/ml) . Moyenne ± SEM, * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$, $n = 3$ /groupe.

B) Les niveaux d'ARN des gènes TGF-β1, α-SMA et PAI-1 ont été analysés par PCR quantitative sur les cellules A549 transfectées par un vecteur vide ou un plasmide codant pour αB-crystallin (24h). Moyenne ± SEM, * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$, $n = 3$ /groupe.

C) Les expressions de l'E-cadhérine, PAI-1, et αB-crystallin ont été analysées par western blot après traitement au rTGF-β1 (24h ou 48h, 10ng/ml) dans les cellules A549 transfectées avec soit un siRNA scramble (contrôle) soit un siRNA spécifique pour αB-crystallin. HSC70 a servi de contrôle de charge (panel haut).

Les expressions de α-SMA et αB-crystallin ont été analysées par western blot dans les cellules A549 transfectées avec soit un vecteur vide (contrôle) soit un vecteur αB-crystallin. HSC70 a servi de contrôle de charge.

Pour confirmer ces résultats dans un modèle plus physiologique, des cellules primaires épithéliales de type II (AEC II), isolées à partir de souris WT et KO stimulées ou non avec du rTGF- β 1, ont été utilisées. Comme attendu, le rTGF- β 1 induisait l'expression, chez les AECII WT, du TGF- β 1, de l' α -SMA, de PAI-1 et du facteur de transcription impliqué dans l'EMT, Snai2 (Slug, Figure 52). En revanche, les expressions de ces mêmes gènes étaient considérablement réduites en l'absence d' α B-crystallin dans les AEC II KO (Figure 52).

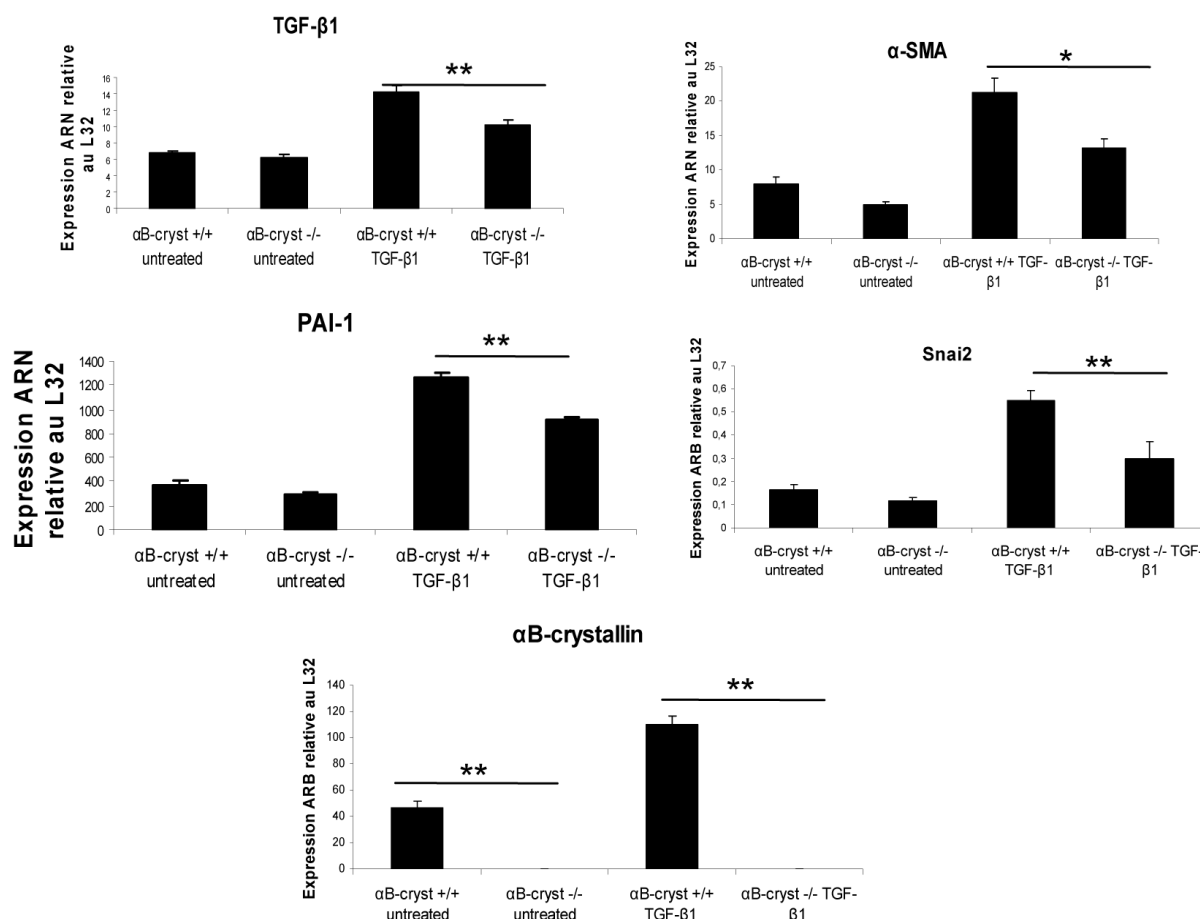


Figure 52 : α B-crystallin régule l'expression des gènes cibles du TGF- β 1 dans les cellules épithéliales primaires

Les expressions des gènes α B-crystallin, TGF- β 1, α -SMA, PAI-1 et Snai2 ont été analysées par PCR quantitative sur des AECII non traitées ou traitées avec du rTGF- β 1 (6h, 10 ng/ml). Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$, $n = 7$ /groupe.

De manière intéressante, dans des fibroblastes primaires issus de souris WT et KO cultivées en présence ou en absence de rTGF- β 1, le manque d' α B-crystallin diminuait significativement l'expression du TGF- β , de l' α -SMA, de PAI-1, mais aussi de procollagène 1 (Figure 53).

Nous concluons de ces résultats, qu' α B-crystallin pourrait favoriser la voie de signalisation du TGF- β 1 expliquant ainsi son implication dans la fibrose pulmonaire.

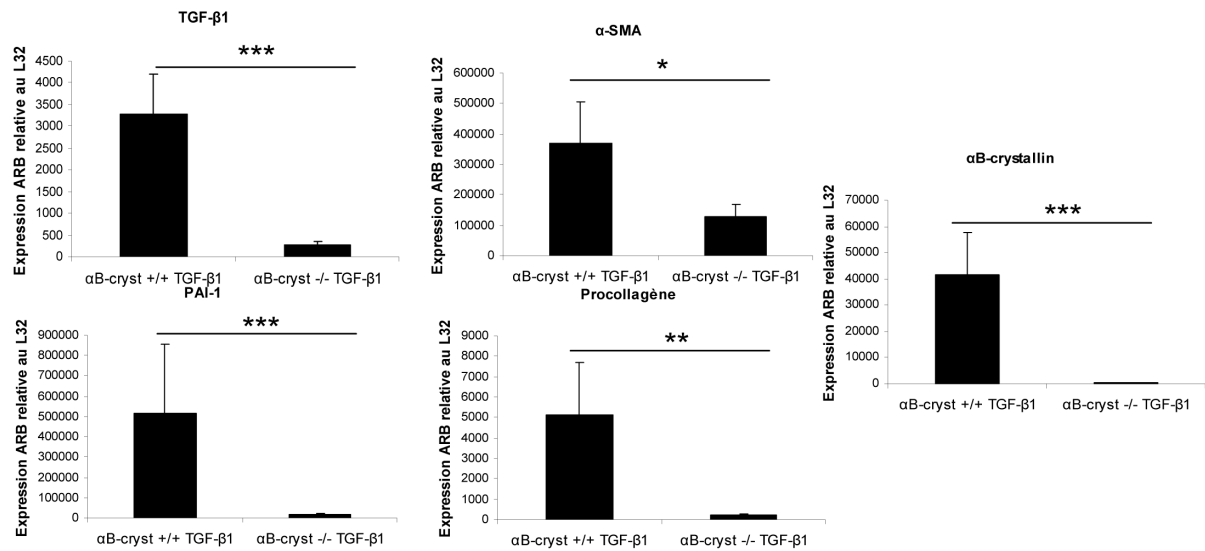


Figure 53 : α B-crystallin régule l'expression des gènes cibles du TGF- β 1 dans les fibroblastes primaires

Les expressions des gènes α B-crystallin, TGF- β 1, α -SMA, PAI-1 et procollagène ont été analysées par PCR quantitative sur les fibroblastes primaires de souris WT et KO après traitement au rTGF- β 1 (24h). Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$, $n = 8$ /groupe.

6- α B-crystallin module la localisation cellulaire de Smad4

Après avoir démontré le rôle d' α B-crystallin sur la voie du TGF- β 1, son action plus spécifique sur la principale voie de signalisation du TGF- β 1, la voie des Smad, a été étudiée. Dans un premier temps, l'inhibition d' α B-crystallin sur l'expression de protéines Smad2, Smad3, Smad4 et Smad7, 12 heures après traitement au rTGF- β 1 dans les cellules A549 n'avait aucun effet (Figure 54A).

Comme nous l'avons déjà évoqué, la voie de signalisation du TGF- β 1 est médiée par une cascade de phosphorylation rapide des protéines efficaces Smad2 et Smad3. Toutefois, l'inhibition d' α B-crystallin à l'aide d'un siRNA ne modifiait pas la phosphorylation de Smad3 ni Smad2, 15 minutes après traitement au rTGF- β 1 (Figure 54B).

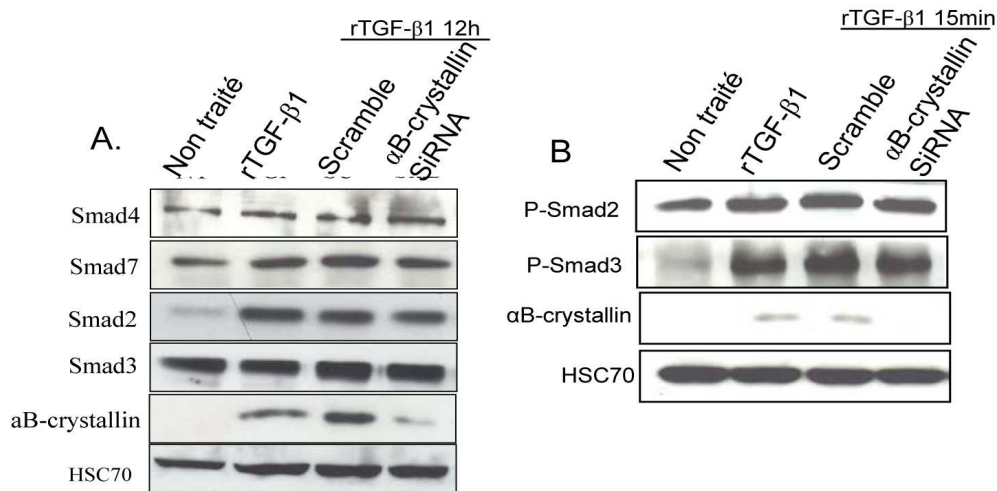


Figure 54 : L'inhibition d' α B-crystallin ne modifie pas l'expression des protéines Smad

A) Les expressions d' α B-crystallin, Smad7, Smad4, Smad3 et Smad2 ont été analysées par western blot après traitement au rTGF- β 1 (12h, 10 ng/ml) dans les cellules A549 transfectées avec soit avec un siRNA scramble soit un siRNA spécifique pour α B-crystallin. HSC70 a servi de contrôle de charge.

B) Les expressions de α B-crystallin, P-Smad3 et P-Smad2 ont été analysées par western blot après traitement au rTGF- β 1 (15 min, 10 ng/ml) dans les cellules A549 transfectées avec soit avec un siRNA scramble soit un siRNA spécifique pour α B-crystallin. HSC70 a servi de contrôle de charge.

Nous avons donc ensuite évalué les interactions entre les protéines Smad et α B-crystallin. Smad4 (Figure 55A), mais pas Smad3 (Figure 55B), était capable de co-immunoprécipiter avec α B-crystallin. Cette interaction, déjà observée au niveau basal, était plus prononcée après stimulation au rTGF- β 1 (Figure 55A).

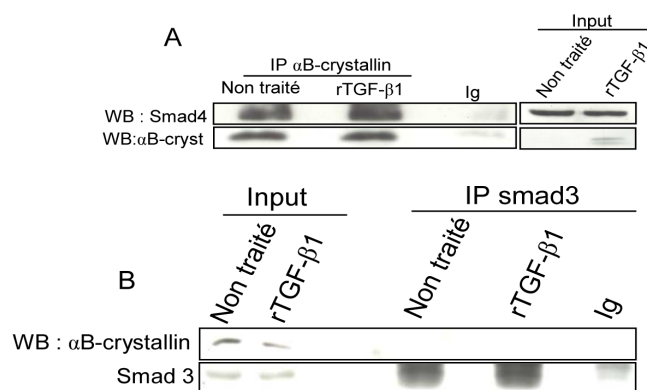


Figure 55 : α B-crystallin interagit avec Smad4 mais pas Smad3

A) Immunoprécipitation (IP) d' α B-crystallin dans les cellules A549 après traitement au rTGF- β 1 suivie par une immunodétection de Smad4. Contrôle Ig : un anticorps non-relevant a été utilisé. Input : extraits de cellules non immunoprécipitées.

B) Immunoprécipitation (IP) de Smad3 dans les cellules A549 après traitement au rTGF- β 1 suivie par une immunodétection d' α B-crystallin. Contrôle Ig : un anticorps non-relevant a été utilisé. Input : extraits de cellules non immunoprécipitées.

La translocation nucléocytoplasmique dynamique de Smad4 est essentielle dans la gestion du transport nucléaire des autres Smad (347). Par conséquent, nous avons examiné si α B-crystallin affectait la localisation cellulaire de Smad4. Les protéines des fractions cytosoliques et nucléaires des cellules A549 transfectées avec soit un siRNA scramble (contrôle) soit un siRNA spécifique pour α B-crystallin et traitées avec rTGF- β 1 ont été analysées séparément. De manière intéressante, 12 heures et 24 heures après le traitement au rTGF- β 1, l'inhibition d' α B-crystallin conduisait à une diminution significative du « pool » de Smad4 nucléaire en corrélation avec une augmentation du « pool » cytosolique de Smad4 (Figure 56A). D'autre part, la surexpression d' α B-crystallin favorisait la localisation nucléaire de Smad4 (Figure 56B).

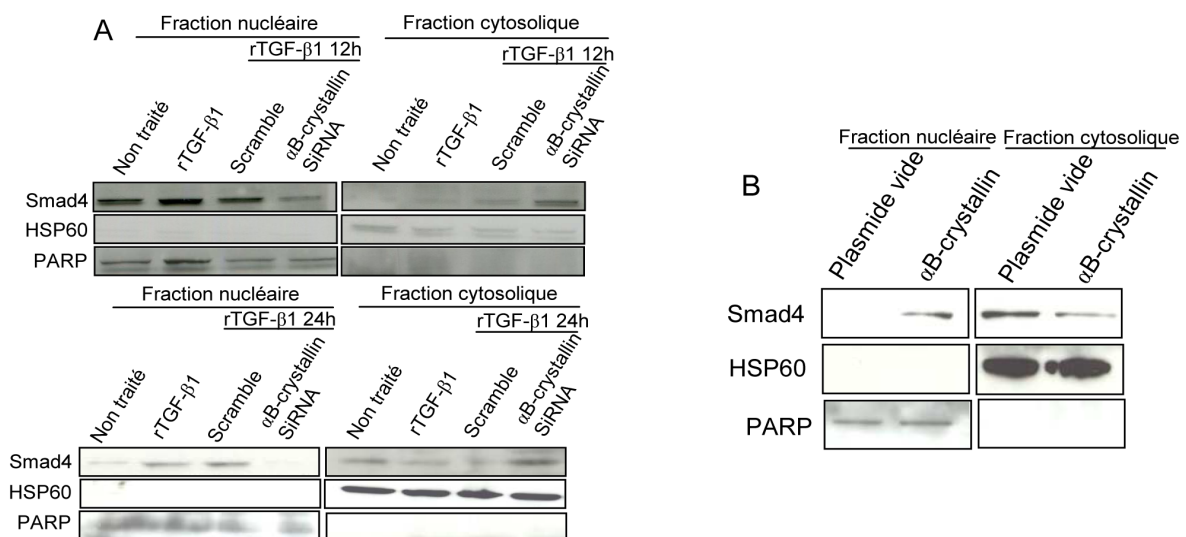


Figure 56 : α B-crystallin module la localisation cellulaire de Smad4

A) Les populations nucléaires et cytoplasmiques de Smad4 étaient déterminées par fractionnement cellulaire des cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle) et/ou traitées avec du rTGF- β 1 (10ng/ml, 12h et 24h). La protéine PARP1 nucléaire et la protéine HSP60 mitochondriale étaient utilisées comme contrôles pour la pureté des extraits.

B) Les populations nucléaires et cytoplasmiques de Smad4 étaient déterminées par western blot après fractionnement cellulaire des cellules A549 transfectées par un vecteur α B-crystallin ou un vecteur vide (contrôle).

L'impact d' α B-crystallin sur la localisation de Smad4 a ensuite été confirmé par immunofluorescence (Figure 57).

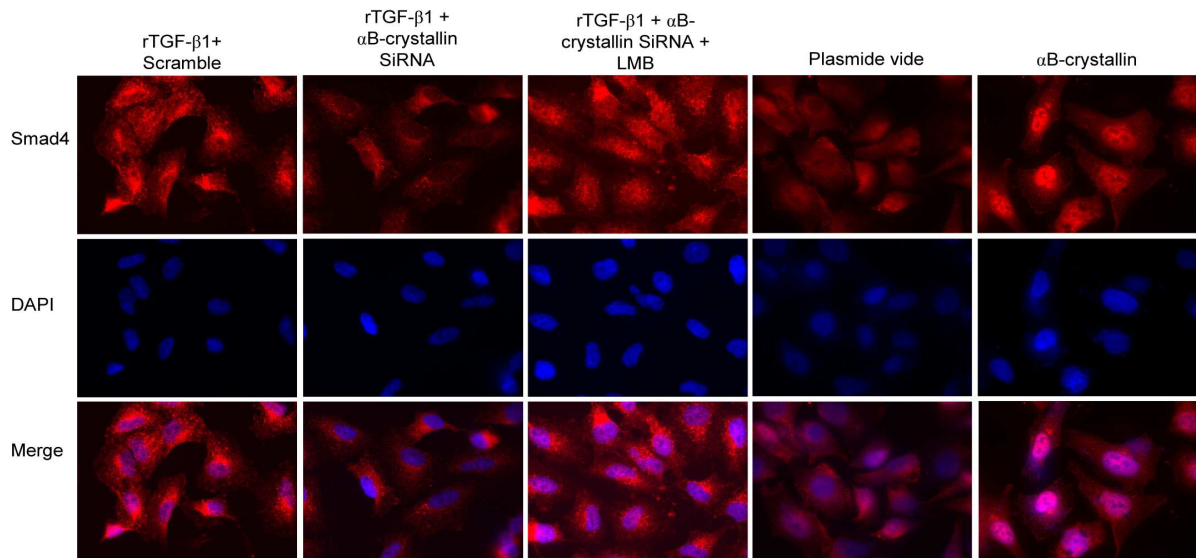


Figure 57 : α B-crystallin module la localisation cellulaire de Smad4 (immunofluorescence)

La présence nucléaire et cytoplasmique de Smad4 était confirmée par immunofluorescence dans des cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle) et traitée avec rTGF- β 1 ou, des cellules transfectées par un vecteur α B-crystallin ou un vecteur vide (contrôle). Des images représentatives sont présentées (n = 4).

Comme dans les cellules où α B-crystallin avait été inhibée Smad4 disparaissait du noyau et s'accumulait dans le cytosol ; nous avons supposé que l'absence d' α B-crystallin pourrait favoriser l'export nucléaire de Smad4.

Conformément à notre hypothèse, l'analyse par western blot ne révélait aucun changement dans le niveau d'expression protéique de l'Importine 8, la protéine responsable de l'import nucléaire de Smad4 (348) après inhibition d' α B-crystallin (Figure 58).

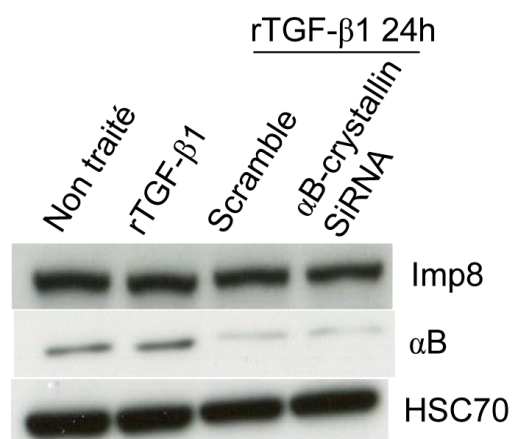


Figure 58 : L'inhibition d' α B-crystallin n'affectait l'expression de l'Importine 8.

L'expression d' α B-crystallin et Importine 8 étaient analysée par western blot après traitement au rTGF- β 1 (24h, 10ng/ml) dans les cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle). HSC70 servait de contrôle de charge.

L'export nucléaire de Smad4 est régulé par l'exportin1/CRM1 (118, 349). L'inhibition de cet export nucléaire de Smad4 dans nos cellules avec la leptomycine B (LMB), un inhibiteur de CRM1, conduisait à une restauration de la population nucléaire de Smad4 dans les cellules déplétées en α B-crystallin (Figure 59A). Des résultats similaires ont été observés dans les fibroblastes primaires, où Smad4 était trouvé dans les noyaux des fibroblastes WT mais était à peine détectable dans le noyau des fibroblastes issus de souris KO (Figure 59B). Le traitement par la LMB restaurait la localisation nucléaire de Smad4 dans les fibroblastes dépourvus d' α B-crystallin. Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition d' α B-crystallin diminue les niveaux nucléaires de Smad4 en favorisant son export nucléaire.

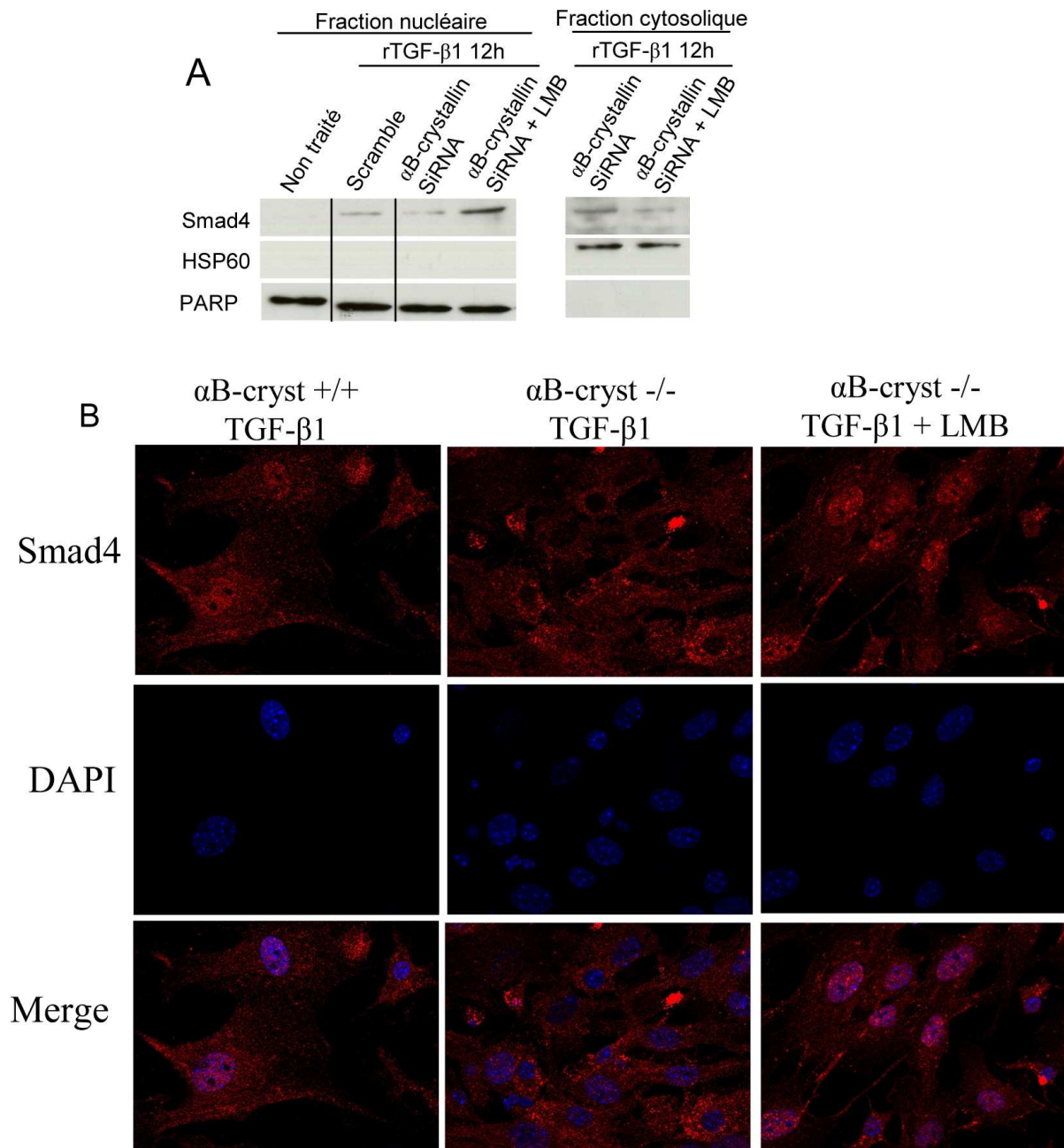


Figure 59 : α B-crystallin module l'export nucléaire de Smad4

A) Les populations nucléaires et cytoplasmiques de Smad4 étaient déterminées par fractionnement cellulaire dans les cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle) et traitée avec du rTGF- β 1 (10ng/ml, 12h). Lorsque cela est indiqué, la LMB (20 nM, 1h) était utilisée pour inhiber l'export nucléaire.

B) La présence nucléaire et cytoplasmique de Smad4 était confirmée par immunofluorescence dans des fibroblastes primaires issus des souris WT et KO traités avec du rTGF- β 1. Des images représentatives sont présentées (n = 6).

De plus, l'inhibition d' α B-crystallin diminuait l'activité transcriptionnelle de Smad4 en limitant sa fixation sur les promoteurs spécifiques des Smad (CAGA box). A l'inverse, la surexpression d' α B-crystallin favorisait l'activation des promoteurs spécifiques des Smad (Figure 60). Ainsi, la favorisation de la localisation nucléaire de Smad4 par la surexpression d' α B-crystallin était corrélée à une plus forte activité transcriptionnelle des Smad.

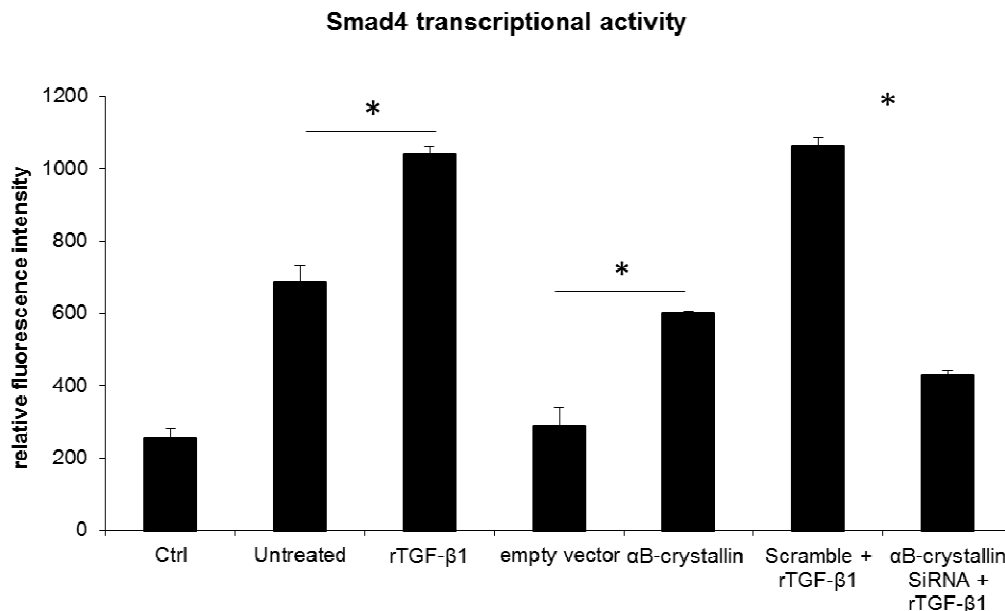


Figure 60 : α B-crystallin module l'activité transcriptionnelle des Smad.

Les cellules ont été transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble, ou transfectées par un vecteur α B-crystallin ou un vecteur vide. Les cellules ont été traitées au rTGF- β 1 quand indiqué. Les cellules ont ensuite été transfectées avec un plasmide rapporteur contenant la séquence promotrice des Smad (CAGA box) en amont du gène de la GFP. La fluorescence des cellules a ensuite été analysée par cytométrie en flux.

7- α B-crystallin régule la mono-ubiquitination de Smad4 via TIF1 γ

La localisation cellulaire de Smad4 est régulée par sa mono-ubiquitination. En effet, dans le noyau, la E3-ubiquitine ligase TIF1 γ permet la fixation d'un résidu ubiquitine sur la protéine Smad4 la séparant ainsi de Smad2 et Smad3 et favorisant son export nucléaire.

Une interaction entre α B-crystallin et TIF1 γ en présence de rTGF- β 1 (Figure 61) a été démontrée par co-immunoprécipitation. Cette interaction était spécifique à TIF1 γ puisque la deubiquitinase de Smad4, FAM/USP9x, n'interagissait pas avec α B-crystallin (Figure 61).

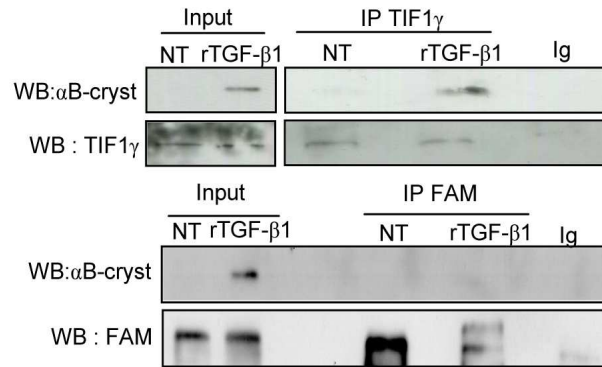


Figure 61 : α B-crystallin interagit avec la E3-ubiquitine ligase TIF1 γ

Immunoprécipitation (IP) de TIF1 γ (panneau supérieur) ou FAM/USP9x (panneau inférieur) dans les cellules A549 traitées avec de rTGF- β 1 (12h) suivie par une immunodétection d' α B-crystallin. Contrôle Ig: un anticorps non-relevant a été utilisé. Input: extraits de cellules non immunoprécipités.

De plus, Le traitement avec le rTGF- β 1 inhibait la mono-ubiquitination de Smad4, donc inhibait son export nucléaire dans les cellules A549 exprimant α B-crystallin. Au contraire, la mono-ubiquitination de Smad4 était conservée, favorisant son export nucléaire après stimulation au rTGF- β 1 dans les cellules déplétées en α B-crystallin (Figure 62). Ce résultat est en accord avec nos précédents résultats montrant que l'inhibition d' α B-crystallin augmentait l'export nucléaire de Smad. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse selon laquelle α B-crystallin interagirait avec TIF1 γ et bloquerait le transfert de l'ubiquitine sur Smad4.

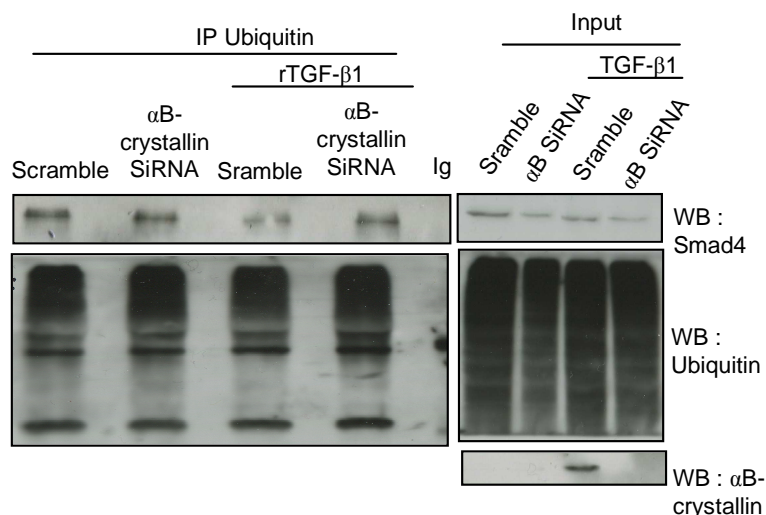


Figure 62 : La mono-ubiquitination de Smad4 est conservée en cas d'inhibition d' α B-crystallin

IP des protéines ubiquitinées dans les cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle) suivie par une immunodétection de Smad4. Contrôle Ig: un anticorps non-relevant a été utilisé. Input: extraits de cellules non immunoprécipités

En outre, la surexpression d' α B-crystallin dans les cellules A549 était associée à une diminution de l'expression de TIF1 γ au niveau protéique mais pas au niveau de l'ARN (Figure 63A). Par conséquent, l'interaction entre Smad4 et TIF1 γ dans le noyau était réduite dans le cadre d'une surexpression d' α B-crystallin (Figure 63B).

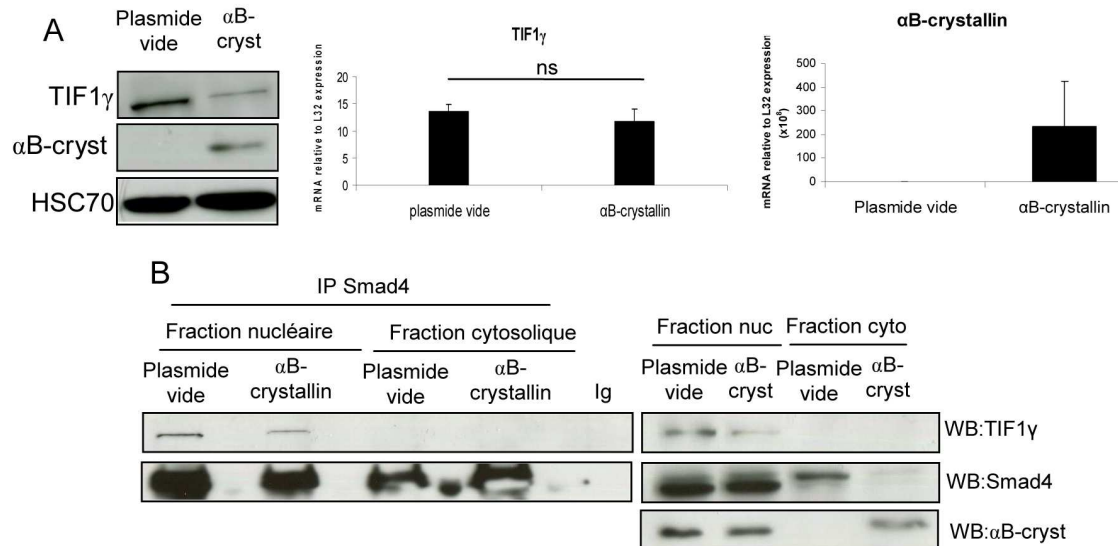


Figure 63 : La surexpression α B-crystallin induit la diminution de la protéine TIF1 γ

A) Les expressions d' α B-crystallin et TIF1 γ étaient analysées par western blot et rt-PCR, dans les cellules A549 transfectées avec un vecteur α B-crystallin ou un vecteur vide. HSC70 servait de contrôle de charge.

B) IP de Smad4 dans les cellules A549 traitées avec un vecteur codant α B-crystallin ou un vecteur vide suivie par une immunodétection de TIF1 γ . Contrôle Ig: un anticorps non-relevant a été utilisé. Input: extraits de cellules non immunoprecipités.

Cependant, la diminution de TIF1 γ induite par la surexpression d' α B-crystallin n'était pas le résultat de sa dégradation par le protéasome, puisque le niveau de TIF1 γ n'était pas restauré en présence d'inhibiteurs du protéasome comme le MG132 (Figure 64).

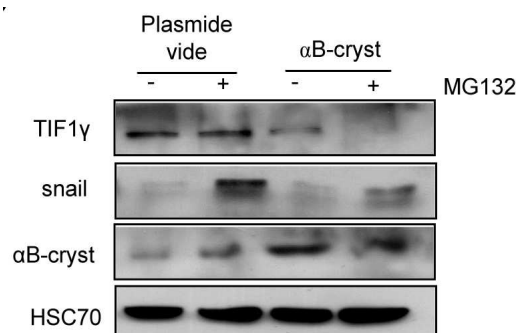


Figure 64 : La diminution de TIF1 γ induite par α B-crystallin n'implique pas le protéasome.

Les expressions d' α B-crystallin et TIF1 γ étaient analysées par western blot et rt-PCR dans les cellules A549 transfectées avec soit un vecteur α B-crystallin ou un vecteur vide et traitées ou non par le MG132, inhibiteur du protéasome. HSC70 servait de contrôle de charge.

Contrairement à l'effet observé après la surexpression d' α B-crystallin, son inhibition dans les cellules A549 augmentait le taux de protéine TIF-1 γ (Figure 65A). En outre, *in vivo* l'absence d' α B-crystallin chez les souris KO conduisait à une surexpression de TIF-1 γ dans des conditions fibrotiques (Figure 65B).

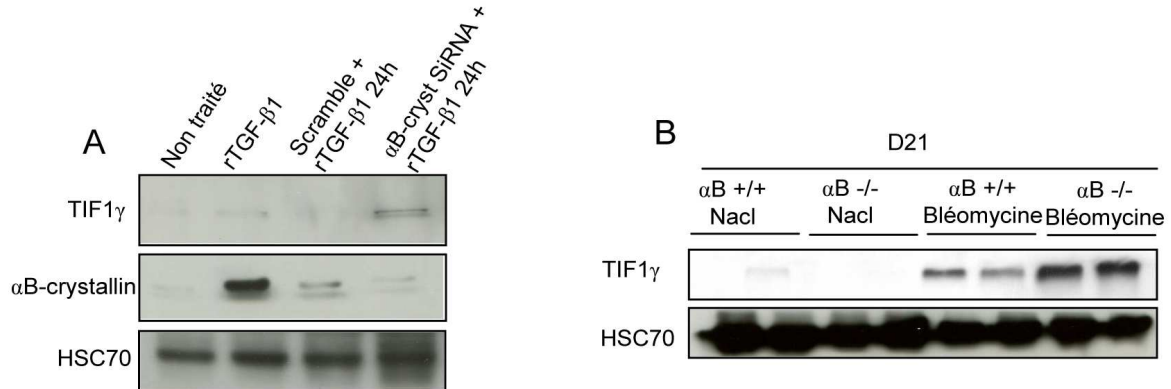


Figure 65 : L'inhibition d' α B-crystallin induit une surexpression de TIF1 γ *in vitro* et *in vivo*

A) Les expressions d' α B-crystallin et TIF1 γ dans les cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle) et traitées avec du rTGF- β 1 pendant 24 heures étaient analysées par western blot. HSC70 servait de contrôle de charge.

B) L'expression de TIF1 γ était analysée par western blot sur des extraits protéiques de poumons de souris WT et KO traitées par la bléomycine ou du NaCl (J21). HSC70 servait de contrôle de charge.

Nous avons ensuite recherché la localisation de Smad4 par immunofluorescence sur des coupes de poumons de souris WT et KO ayant reçu de la bléomycine. Dans les poumons des souris WT qui présentaient une fibrose pulmonaire sévère, Smad4 était principalement présente dans les noyaux. Au contraire, dans les poumons de souris KO où la fibrose était fortement réduite, Smad4 se trouvait surtout au niveau du cytoplasme (Figure 66).

Ces résultats démontrent qu'en l'absence d' α B-crystallin, TIF-1 γ est stabilisé, ce qui favorise la mono-ubiquitination de Smad4 et permet son export nucléaire inhibant ainsi l'activité pro-fibrotique de Smad4.

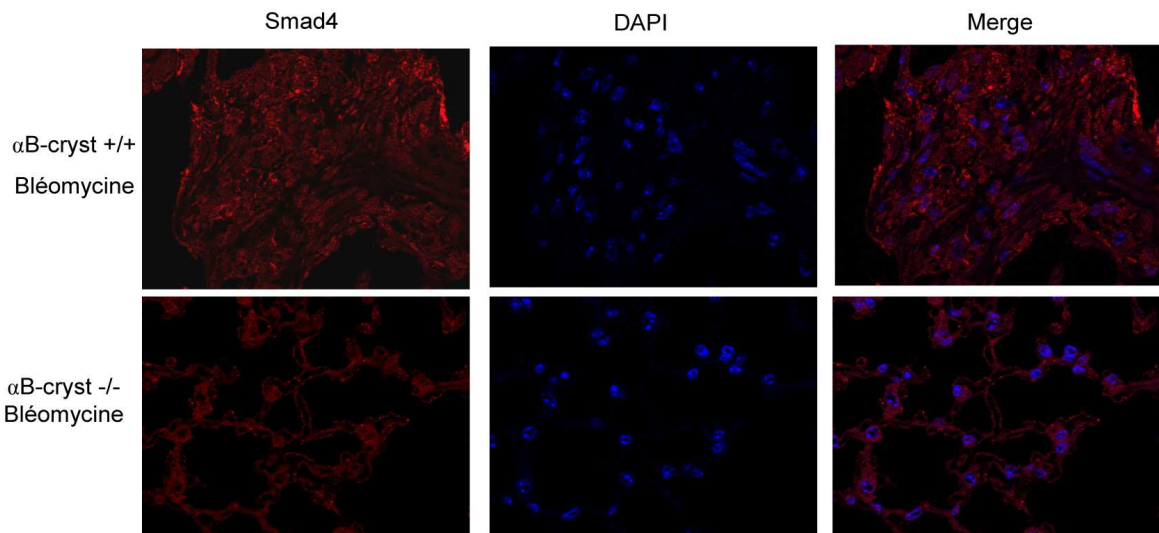


Figure 66 : In vivo Smad4 est exclue du noyau chez les souris KO pour α B-crystallin traitées à la bléomycine

La localisation nucléaire et cytoplasmique de Smad4 était confirmée par immunofluorescence sur des coupes de poumons de souris WT et KO traitées par la bléomycine (J21). Des images représentatives sont présentées (n = 5).

Nous proposons donc un modèle d'action d' α B-crystallin résumé dans ce schéma explicatif (Figure 67) :

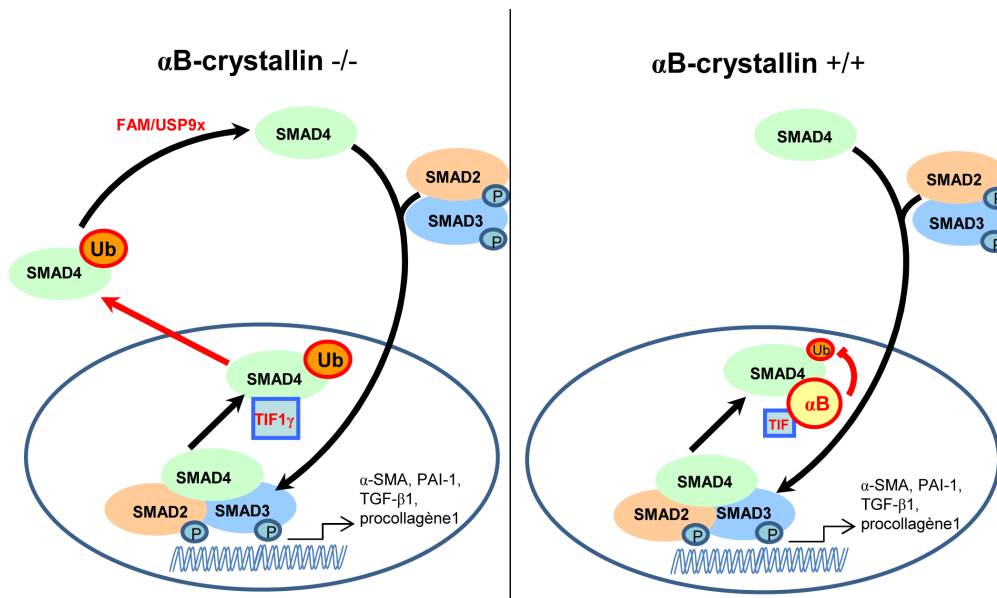


Figure 67 : Mécanisme d'action hypothétique d' α B-crystallin sur la voie du TGF- β 1 Smad4-dépendante.

Après stimulation au TGF- β 1, l'interaction entre α B-crystallin et TIF1 γ entraîne la baisse du taux de la protéine TIF1 γ et ainsi inhibe la mono-ubiquitination de Smad4. En conséquence, Smad4 reste séquestrée dans le noyau où son activité pro-fibrotique est fonctionnelle. En revanche, en l'absence d' α B-crystallin, la mono-ubiquitination de Smad4 par TIF1 γ et donc son export nucléaire sont favorisés.

Dans cette première partie, nous montrons qu' α B-crystallin joue un rôle crucial dans la voie du TGF- β 1 Smad-dépendante. En effet, α B-crystallin est capable d'interferer avec le complexe TIF1 γ /Smad4 afin d'empêcher la monoubiquitination de Smad4 par TIF1 γ et son export nucléaire. Ainsi, dans le poumon fibreux, où α B-crystallin est surexprimée probablement durant la phase d'inflammation précédant la fibrose, Smad4 reste séquestrée dans le noyau des cellules épithéliales et des fibroblastes, permettant une activation constante de la voie du TGF- β 1 dans ces cellules et favorisant la fibrogenèse. En condition de fibrose, l'absence d' α B-crystallin protège les souris KO de la fibrose en favorisant l'export nucléaire de Smad4 et inhibant ainsi la voie du TGF- β 1. Ainsi le phénomène d'EMT des cellules épithéliales et leur transformation, ainsi que celle des fibroblastes, en myofibroblastes est limitée chez les souris déficientes pour α B-crystallin qui présentent donc une accumulation de collagène diminuée par rapport aux souris sauvages après induction de fibrose par la bléomycine, l'AdTGF- β 1 et l'AdIL- β . L'inhibition d' α B-crystallin apparaît ainsi comme une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle pour lutter contre les maladies fibrosantes.

Rôle de la petite protéine de stress α B-crystallin sur la fibrose pleurale

La deuxième partie de cette thèse n'a pas encore été soumise pour publication.

Le but de ce travail était de montrer l'implication d' α B-crystallin dans la fibrose pleuro-pulmonaire. La FPI débute aux bases et à la périphérie des poumons dans les régions sous-pleurales.

Nous avons utilisé deux modèles de fibrose pleurale chez la souris par injection intra-pleurale d'adénovirus codant pour le TGF- β 1 ou de bléomycine combinée à des particules de carbone. (11). Chez les souris WT, cette fibrose ne se limitait pas à la plèvre et une accumulation de collagène a pu être confirmée dans la région sous-pleurale comme cela peut être observé dans la FPI. Les souris KO étaient protégées de la fibrose pleurale induite par les adénovirus codant pour le TGF- β 1 ou la bléomycine combinée à des particules de carbone. Dans ces modèles *in vivo*, les cellules mésothéliales subissaient une EMT et envahissaient la parenchyme pulmonaire chez les souris WT mais pas chez les souris KO.

Par notre travail nous démontrons qu' α B-crystallin, dans les cellules mésothéliales pleurales comme dans les cellules épithéliales et les fibroblastes, favorisait la localisation nucléaire de Smad4, activant ainsi la voie du TGF- β 1 et l'EMT des cellules de la plèvre. Les souris déficientes pour α B-crystallin étaient protégées de la fibrose pleurales *in vitro* et *in vivo*. α B-crystallin inhibait l'EMT des cellules pleurales les empêchant ainsi de migrer au sein du parenchyme pulmonaire comme observé lors de la FPI chez l'homme.

L'inhibition d' α B-crystallin pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre la fibrose pleurale mais également contre l'initiation et la progression de la FPI chez l'homme.

Ce travail est présenté dans les annexes à la page 222 sous la forme que nous espérons soumettre à l'*European Respiratory Journal* ou l'*American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.

I- Méthodes

Les méthodes utilisées pour cette partie de notre projet de thèse sont majoritairement identiques à la partie précédente. Dans ce paragraphe, nous détaillerons seulement les méthodes d'injection et d'induction de fibrose qui diffèrent de la partie précédente.

1- Traitement des animaux

Les souris utilisées pour ce projet étaient des souris SV129 WT et KO déjà décrites dans la partie précédente.

a- Injections d'AdTGF

L'administration intrapleurale d'AdTGF, AdDL et AdLacZ (1.10^9 pfu/animal), dans un volume de 100 μ l de NaCl 0.9%, a été réalisée par une injection intrapleurale unique dans le 6^{ème} espace intercostal latéral droit avec une aiguille 23G. Les animaux étant anesthésiés et couchés sur le flanc gauche (Figure 68).



Figure 68 : Injection intrapleurale

Après anesthésie à l'isoflurane, la souris est allongée sur le flanc gauche. L'injection est réalisée au niveau du 6^{ème} espace intercostal droit.

b- Injection de bléomycine et de noir de carbone

Notre équipe a développé un modèle de fibrose pleurale basée sur l'injection intrapleurale de bléomycine et de nanoparticules de carbone. Les nanoparticules de carbone sont présentes dans la fumée de cigarette ainsi que dans la pollution ; mais sont aussi largement utilisées dans l'industrie. Une fois inhalées, ces particules peuvent aller dans la lumière alvéolaire et migrer vers la surface pleurale (350). Chez le rongeur, la fumée de cigarette aggrave la fibrose induite de façon expérimentale (351). Dans notre modèle, nous avons pratiqué des

administrations conjointes de nanoparticules de carbone et de bléomycine. Notre équipe a montré que l'injection intrapleurale de nanoparticules de carbone combinée à une injection intrapleurale de bléomycine induisait une fibrose sévère avec une accumulation de collagène au niveau de la plèvre mais aussi dans les régions sous-pleurales (196). Nous avons également mis en évidence que les cellules mésothéliales pouvaient subir une EMT *in vivo* et *in vitro* lorsqu'elles étaient exposées conjointement à la bléomycine et aux nanoparticules de carbone. Ce travail a permis de confirmer la susceptibilité des cellules mésothéliales à participer au processus fibrosant probablement en raison de leur facilité à subir une EMT (196).

Les injections intrapleurales de bléomycine (0.04 U/animal) et de nanoparticules de carbone (32 mg/animal) étaient réalisées suivant le même protocole que l'AdTGF au niveau du 6^{ème} espace intercostal droit.

c- Sacrifices, liquides de lavages et prélèvement des poumons

Les souris étaient euthanasiées 12 ou 21 jours après l'injection, par section de l'aorte abdominale. Après une légère incision du diaphragme, 1 ml de NaCl 0.9% était injecté dans la cavité pleurale. Le liquide de lavage pleural (PLF, pleural lavage fluide) était récupéré à l'aide d'une seringue de 1 ml. Le prélèvement des LBA et des poumons était réalisé à l'aide d'une canule comme décrit dans la partie précédente.

2- Culture cellulaire

Des cellules mésothéliales pleurales (Met5A, ATCC) ont été cultivées en monocouche dans 5% de CO₂ à 37°C dans du milieu Medium 199 (Lonza, Paris, France), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Lonza). Les cellules ont étéensemencées à 40% de confluence un jour avant le début des traitements, puis stimulées avec du TGF-β1 recombinant humain (rTGF-β1, R & D Systems, Minneapolis, MN) dans un milieu complet à 10 ng/ml.

3- Test de migration

Des cellules mésothéliales pleurales (Met5A, ATCC) ont été cultivées en monocouche dans 5% de CO₂ à 37°C dans du milieu Medium 199 (Lonza, Paris, France), supplémenté avec

10% de sérum de veau fœtal (FBS, Lonza) dans des plaques 6 puits. Au temps T0 un sillon a été fait dans chaque puits à l'aide d'un cône. Les cellules étaient traitées par du TGF- β 1 pour 48h. Les cellules sont ensuite photographiées aux temps T0 et T48h pour évaluer la fermeture de la blessure.

II- Résultats

1- α B-crystallin est surexprimée au niveau de la plèvre au cours du processus de fibrose

L'examen histologique des poumons de patients atteints de FPI a montré qu' α B-crystallin était surexprimée au niveau de la plèvre chez les patients atteints de FPI. En effet, les cellules mésothéliales étaient toutes positives pour l' α B-crystallin alors que l'expression d' α B-crystallin n'était pas détectable dans la plèvre des patients contrôles non atteints de FPI (figure 69A). Pour confirmer cette observation, différents modèles de fibrose pleurale chez la souris ont été utilisés. L'administration intrapleurale d'AdTGF créait une fibrose pleurale majeure chez les souris SV129 WT. Cette fibrose était accompagnée d'une surexpression importante d' α B-crystallin au niveau des cellules mésothéliales pleurales (Figure 69B).

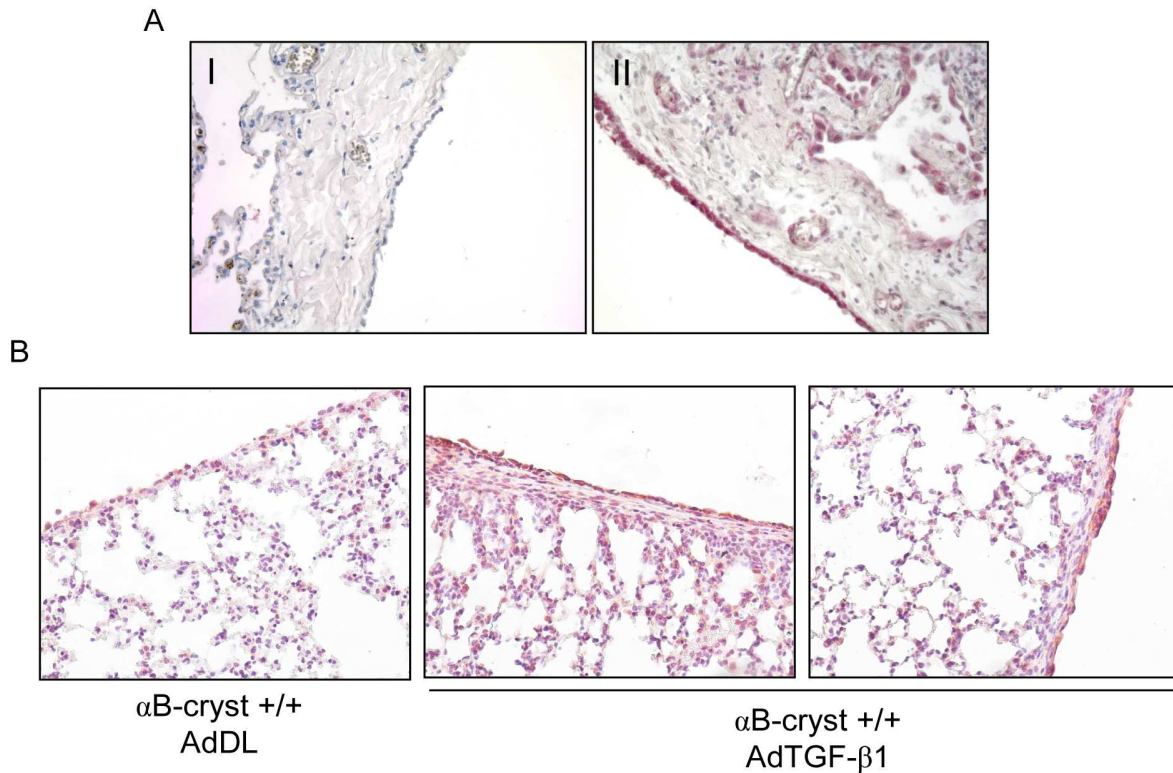


Figure 69 : α B-crystallin est exprimée au niveau pleural en cas de fibrose

A) Immunohistochimie d' α B-crystallin. I- Coupes de poumons de patients non atteints de FPI (n = 4), II- Coupes de poumons fibreux chez des patients atteints de FPI (n = 6). Les cellules mésothéliales pleurales sont positives pour le marquage α B-crystallin. Grossissement 200x.

B) Immunohistochimie d' α B-crystallin sur des tissus pulmonaires de souris ayant reçu soit un adénovirus contrôle (AdDL) soit un adénovirus codant le TGF- β 1 (AdTGF) par administration intrapleurale. Des images représentatives sont présentées.

2- L'absence d' α B-crystallin protège de la fibrose pleurale et sous pleurale induite par l'administration conjointe de bléomycine et de particules de carbone

Afin de rechercher si les souris déficientes en α B-crystallin étaient protégées de la fibrose pleurale de la même manière qu'elles étaient protégées de la fibrose pulmonaire, un modèle de fibrose pleurale basée sur la co-administration intrapleurale de bléomycine et de particules de carbone a été utilisé. 21 jours après l'injection, les souris WT développaient une fibrose pleurale importante avec une forte accumulation de collagène. Cependant, les souris KO montraient seulement un léger épaissement pleural sans accumulation de collagène (Figure 70).

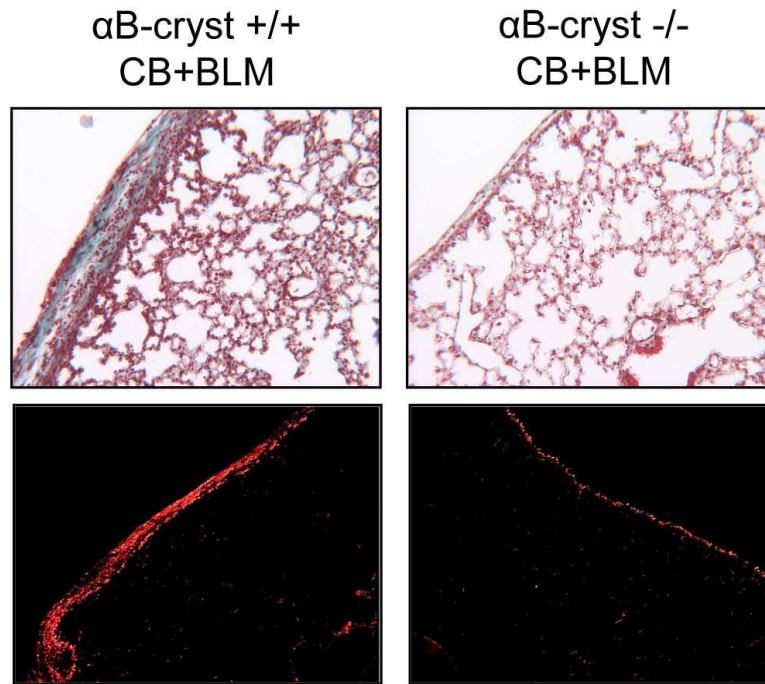


Figure 70 : Les souris KO pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose pleurale induite par l'administration conjointe de bléomycine et de particules de carbone.

Coupes de poumons de souris WT et KO à J21 après administration intrapleurale de bléomycine et de particules de carbone (panel haut). Coloration trichrome de Masson (x100, n=6). Photographies en lumière polarisée de coupes de poumons marquées au rouge Sirius (panel bas). Des images représentatives sont montrées (n=6).

Ces observations ont été confirmées par une quantification du collagène pas des mesures histomorphométriques. En effet, au niveau pleural, l'accumulation de collagène était significativement plus importante chez les souris WT en comparaison aux souris KO (Figure 71A). De manière intéressante, la quantité de collagène était également significativement plus augmentée chez les souris WT lorsque les mesures étaient réalisées au niveau sous pleurale (Figure 71B). Ce résultat semble suggérer que la fibrose pleurale induite par la bléomycine et les particules de carbone se propageait dans le parenchyme sous pleurale chez les souris WT et non chez les souris KO. Les mesures effectuées au niveau du parenchyme plus éloigné de la plèvre ne révélaient pas de différence entre les souris WT et KO (Figure 71C).

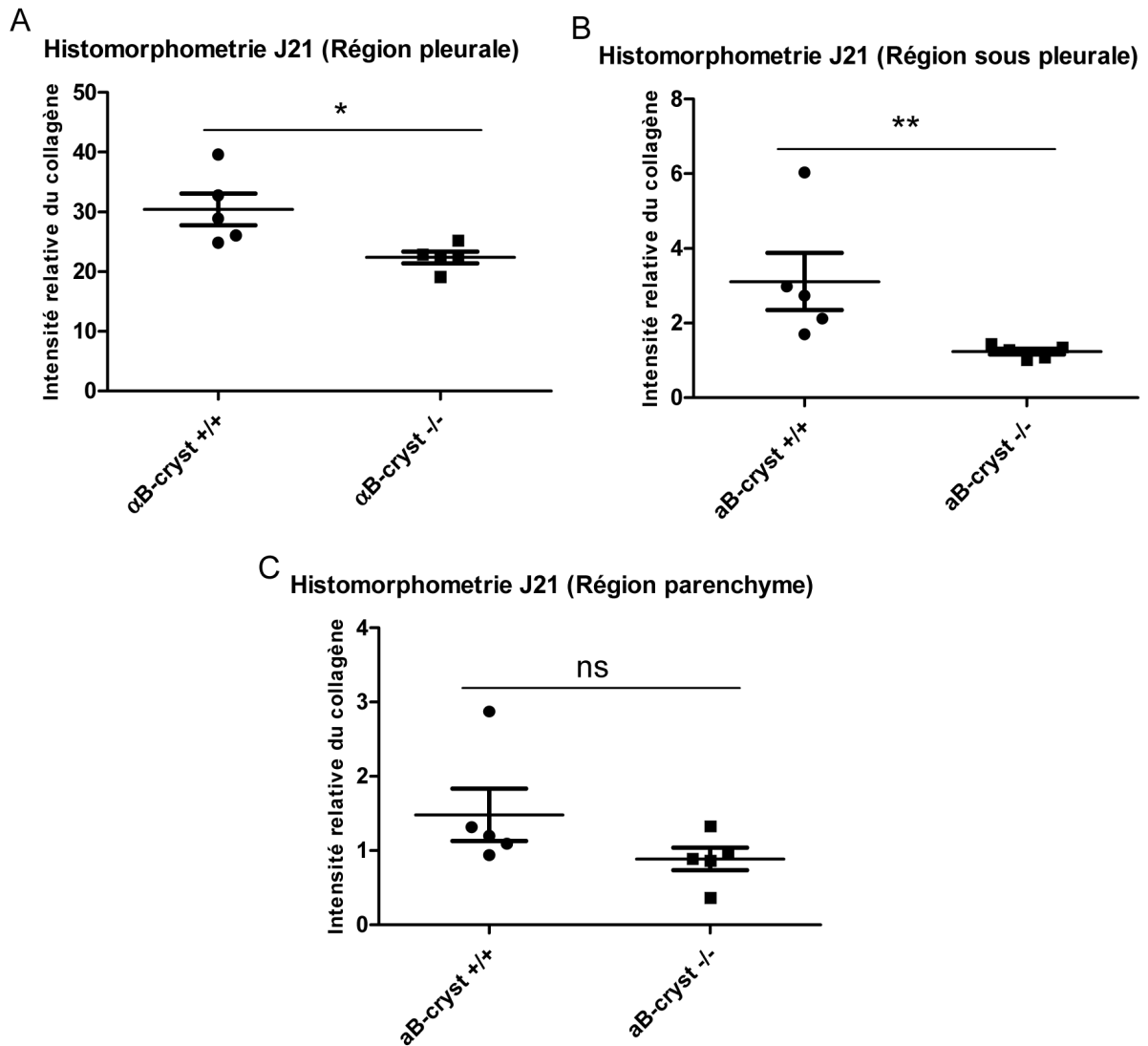


Figure 71 : L'accumulation de collagène au niveau pleural et sous pleural est plus faible chez les souris KO pour αB -crystallin après administration conjointe de bléomycine et de particules de carbone.

A) Quantification du collagène de la région pleurale par histomorphométrie sur des poumons de souris WT et KO à J21 ayant reçus de la bléomycine et des particules de carbone. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0.05$, $n=6$ /groupe.

B) Quantification du collagène de la région sous-pleurale par histomorphométrie sur des poumons de souris WT et KO à J21 ayant reçus de la bléomycine et des particules de carbone. Moyenne \pm SEM, ** $p \leq 0.01$, $n=6$ /groupe.

C) Quantification du collagène de la région du parenchyme par histomorphométrie sur des poumons de souris WT et KO à J21 ayant reçu de la bléomycine et des particules de carbone. Moyenne \pm SEM, $n=6$ /groupe.

3- Les souris KO pour α B-crystallin sont protégées de la fibrose pleurale et sous pleurale induite par le TGF- β 1

Nous avons ensuite utilisé un second modèle de fibrose pleurale basé sur l'injection intrapleurale d'AdTGF. Ce modèle entraînait la formation d'une fibrose très importante chez les souris WT dès J12. La fibrose observée chez les souris KO était une nouvelle fois significativement plus faible (Figure 72).

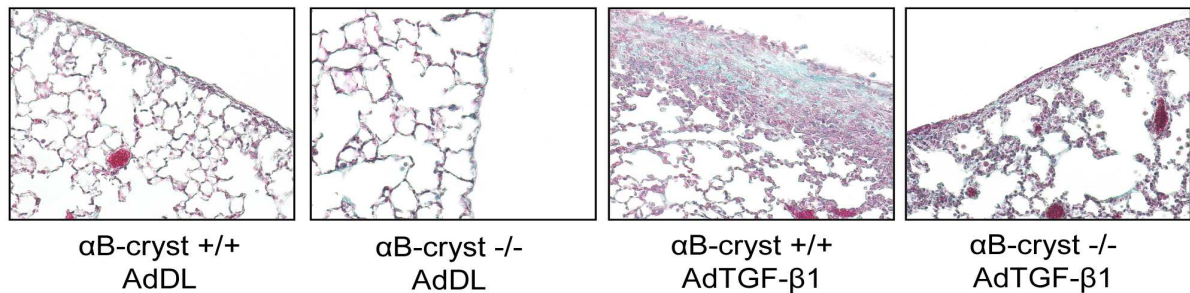


Figure 72 : L'absence d' α B-crystallin protège de la fibrose pleurale induite par le TGF- β 1

Coupes de poumons de souris WT et KO à J12 après administration intrapleurale d'AdTGF ou AdDL. Coloration trichrome de Masson (x100, n=6).

Un test ELISA montrait que le TGF- β 1 humain exogène (provenant des adénovirus) était exprimé de la même manière chez les souris WT et les souris KO (Figure 73).

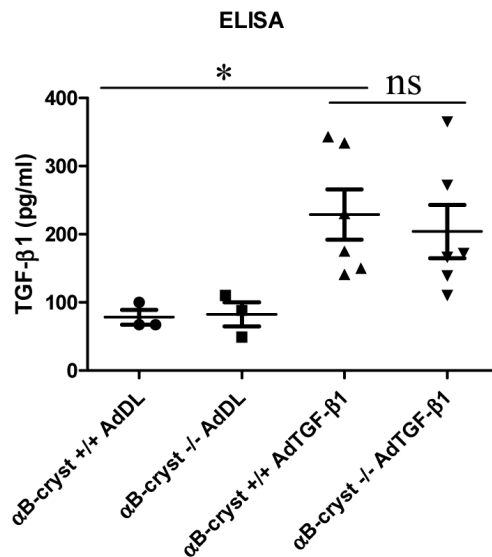


Figure 73 : Les souris KO et WT sont capables d'exprimer le gène codé par les adénovirus de la même manière

Le taux de TGF- β 1 total était mesuré par un test ELISA sur les PLF de souris WT et KO à J12. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0.05$, n=6/groupe.

Cependant, le dosage du collagène par le Sircol et l'histomorphométrie montrait que l'accumulation de collagène induite par l'AdTGF était significativement plus faible dans la plèvre des souris KO comparé aux souris WT (Figure 74A). Le dosage sircol, réalisé sur poumons entiers, montrait une augmentation globale du taux de collagène dans les poumons des souris WT qui n'était pas retrouvée chez les souris KO. Grâce aux mesures histomorphométriques, réalisées au niveau de la plèvre uniquement, nous montrons que l'augmentation du collagène chez les souris WT est exclusivement localisée au niveau de la plèvre alors que, chez les souris KO, la plèvre présentait des niveaux de collagène significativement plus faible (Figure 74). Ce résultat était aussi confirmé par la surexpression d'HSP47 chez les souris WT qui n'était pas retrouvée chez les souris KO (Figure 74B).

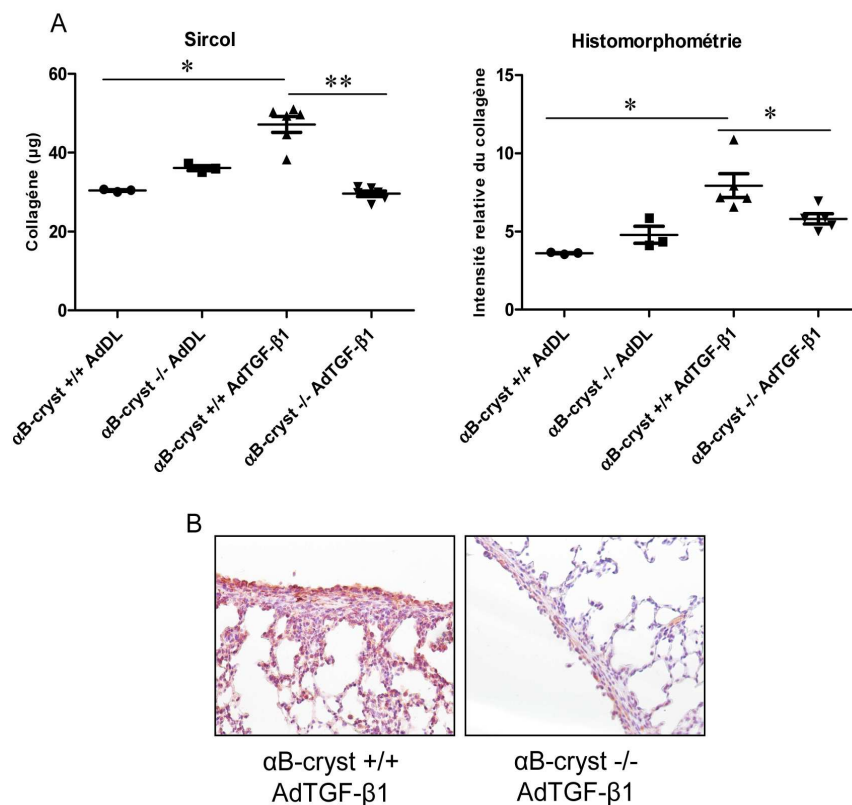


Figure 74 : L'accumulation de collagène pleural est plus faible chez les souris KO après administration d'AdTGF

A) Quantification du collagène de la région pleurale par Sircol (à gauche) et histomorphométrie (à droite) sur des poumons de souris WT et KO à J12 ayant reçus de l'AdTGF ou de l'AdDL. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, $n=6$ /groupe.

B) Immunohistochimie d'HSP47 sur des coupes de poumons de souris WT et KO à J12 après administration intrapleurale d'AdTGF ($\times 100$, $n=6$).

4- L'absence d' α B-crystallin inhibe la voie du TGF- β 1 au niveau de la plèvre et des cellules mésothéliales

Nous avons ensuite cherché à démontrer l'implication d' α B-crystallin sur la voie du TGF- β 1 sur la plèvre *in vivo* et sur les cellules mésothéliales *in vitro*. Comme dans le parenchyme, l'absence d' α B-crystallin chez les souris KO perturbait l'expression de l'ARN du TGF- β 1 endogène ainsi que celle de PAI-1 (Figure 75). Ce résultat montrait que la modulation de la voie du TGF- β 1 par α B-crystallin était identique dans le cas d'une fibrose pleurale et d'une fibrose pulmonaire affectant le parenchyme.

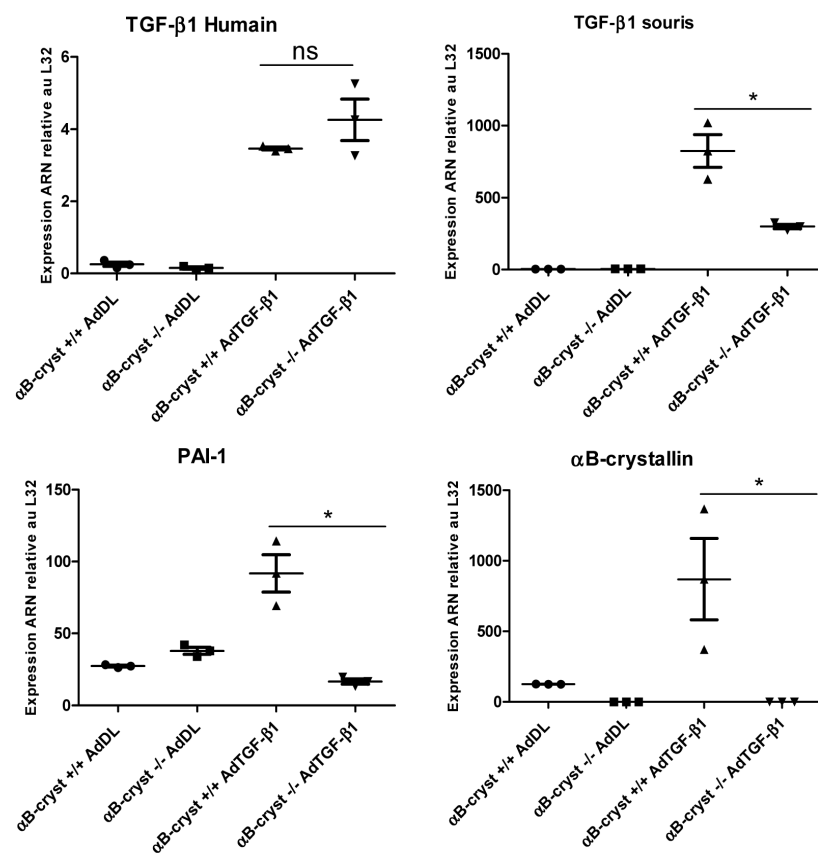


Figure 75 : α B-crystallin régule la voie du TGF- β 1 au niveau de la plèvre

Les niveaux d'ARN du TGF- β 1 humain, TGF- β 1 de souris, PAI-1, et α B-crystallin ont été analysés par PCR quantitative sur les tissus pulmonaires de souris WT et KO 12 jours après administration intrapleurale d'AdTGF- β 1 ou d'AdDL. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$, $n = 3$ /groupe.

De plus, grâce à l'inhibition d' α B-crystallin sur les cellules Met5A par des SiRNA, nous avons constaté que l'inhibition de l'expression d' α B-crystallin diminuait considérablement l'expression des gènes PAI-1 et TGF- β 1. En outre, la capacité connue du TGF- β 1 à induire l' α -SMA était contrée par l'inhibition d' α B-crystallin (figure 76). Ce résultat suggère que

l'inhibition d' α B-crystallin pourrait inhiber l'EMT des cellules mésothéliales qui a été montré comme étant un facteur important dans la fibrose pleurale et pleuro-pulmonaire.

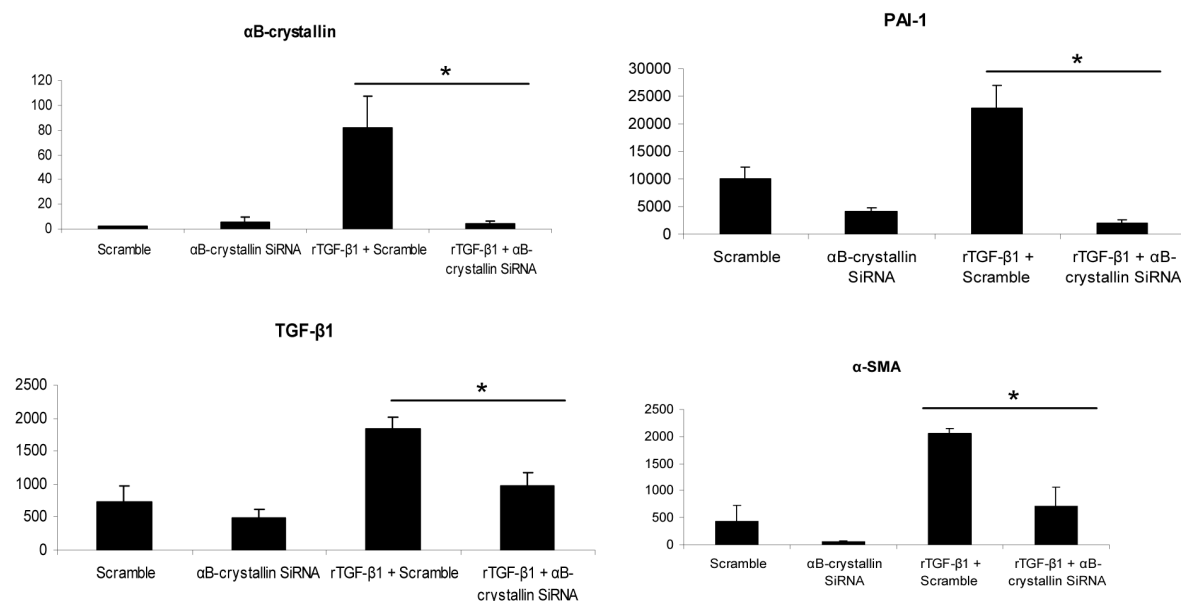


Figure 76 : α B-crystallin régule la voie du TGF- β 1 au niveau des cellules mésothéliales

L'expression des gènes α B-crystallin, TGF- β 1, α -SMA et PAI-1 a été analysée par PCR quantitative après traitement au rTGF- β 1 des cellules Met5A transfectées avec soit un siRNA scramble (contrôle) soit un siRNA spécifique pour α B-crystallin (24h, 10 ng/ml) . Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$, n = 3/groupe.

L'effet d' α B-crystallin sur la localisation cellulaire de Smad4 a été étudié. L'inhibition d' α B-crystallin conduisait à une diminution significative du « pool » de Smad4 nucléaire en corrélation avec une augmentation du « pool » cytosolique de Smad4 (Figure 77) dans les cellules mésothéliales pleurales, comme observé dans les cellules épithéliales et les fibroblastes pulmonaires.

L'absence d' α B-crystallin inhibait également le potentiel migratoire des cellules Met5A après traitement au TGF- β 1 (Figure 78), une autre preuve de l'inhibition de l'EMT de ces cellules par le manque d' α B-crystallin. Après administration intrapleurale d'AdTGF- β 1, les cellules de la plèvre migraient dans le parenchyme pulmonaire, caractérisant le phénomène d'EMT subit par les cellules mésothéliales pleurales. Cependant, cet envahissement du parenchyme n'était pas retrouvé chez les souris KO pour α B-crystallin après administration intrapleurale d'AdTGF- β 1 (Figure 78).

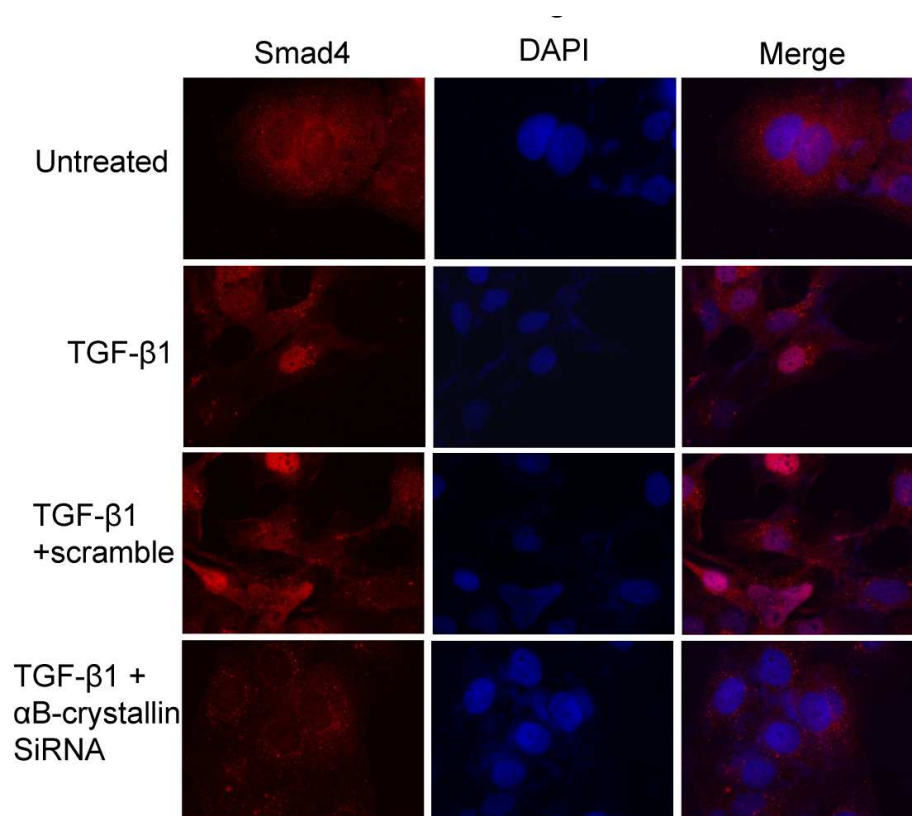


Figure 77 : α B-crystallin régule la localisation de Smad4 dans les cellules mésothéliales

La localisation de Smad4 a été observée par immunofluorescence dans des cellules Met5A transfectées avec soit un siRNA scramble (contrôle) ou un siRNA spécifique pour α B-crystallin.

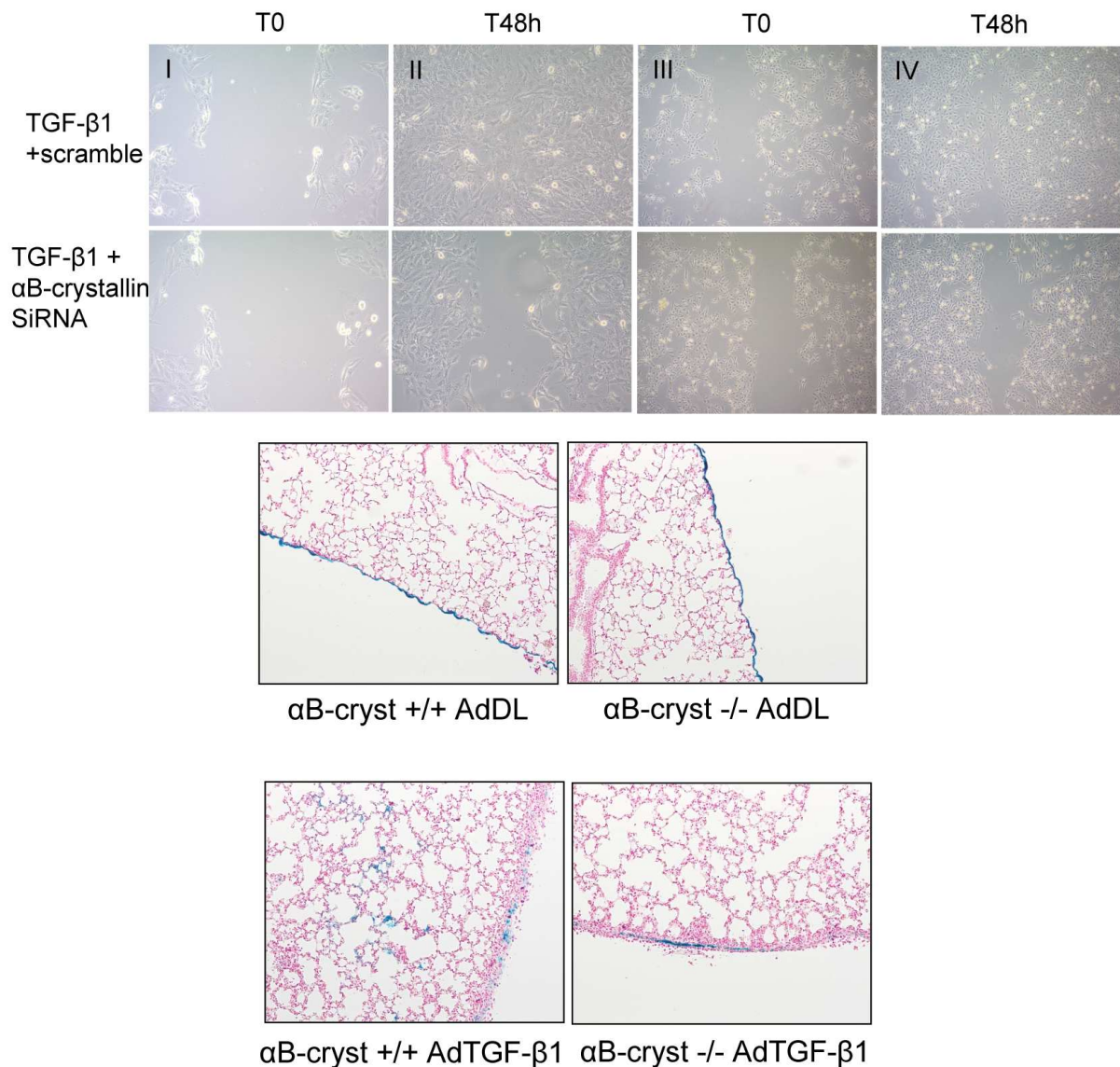


Figure 78 : L'inhibition d' α B-crystallin limite la migration des cellules mésothéliales pleurales *in vivo* et *in vitro*

La migration des cellules Met5A transfectées avec soit un siRNA scramble (contrôle) ou un siRNA spécifique pour α B-crystallin a été évaluée à 48h. I et II (x50), II et II (x100, panel haut). Les cellules mésothéliales pleurales ont été marquées par injection intra pleurale d'AdLacZ chez des souris WT et KO recevant de l'AdTGF- β 1 pour induire une fibrose. Après coloration les cellules mésothéliales apparaissaient bleues (J7, panel bas).

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie sont des résultats préliminaires et nécessiteront d'autres expériences pour confirmer l'implication d' α B-crystallin dans la transformation des cellules mésothéliales via le processus d'EMT et leur contribution à l'établissement d'une fibrose pleurale envahissant le parenchyme pulmonaire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

La fibrose pulmonaire est caractérisée par une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme pulmonaire. Même si dans certains cas précis les cliniciens peuvent identifier les origines de ces troubles fibreux, par exemple, par des agents chimiothérapeutiques, les causes et les éléments déclencheurs de la fibrose pulmonaire restent encore le plus souvent inconnus aujourd'hui. Il est cependant incontestable que les recherches actuelles ont pu mettre en évidence différents acteurs importants dans la fibrogenèse. Les lésions et l'altération des cellules épithéliales pulmonaires ont été largement démontrées dans la littérature et semble être un mécanisme important. La prolifération des myofibroblastes et leur caractère agressif, caractérisé par la synthèse excessive de MEC dans les conditions fibrotiques, font de ces cellules un autre acteur primordial lors de la fibrogenèse. Les origines de ce type de cellules au phénotype myofibroblastique sont encore très discutées dans le monde de la pneumologie. Trois hypothèses ont jusqu'à lors été avancées, la différenciation des fibroblastes résidents, la différenciation de fibrocytes (précurseurs fibroblastiques provenant de la moelle osseuse) ou la transformation de cellules épithéliales en myofibroblastes par le processus d'EMT. Cependant, quelle que soit la nature des précurseurs myofibroblastiques, les scientifiques s'accordent sur le fait que la mise en place d'un environnement profibrotique aux sein des poumons contribue à la transformation des cellules et à l'augmentation « du pool » de myofibroblastes responsables de la progression et la persistance de la pathologie. Le TGF- β 1, induit par les lésions épithéliales, les cellules inflammatoires recrutées sur les sites fibrotiques, les myofibroblastes ainsi que par les remodelages de la MEC, joue un rôle central à plusieurs niveaux en activant les cellules pulmonaires (cellules épithéliales, fibroblastes résidents et fibrocytes) et favorisant leur différenciation en myofibroblastes. Enfin, les cellules mésothéliales pleurales, encore très peu étudiées, semblent avoir un rôle au-delà de la fibrose de la plèvre. En effet, elles peuvent subir une transformation comparable à l'EMT et développer des caractères myofibroblastiques permettant leur migration au sein du parenchyme pulmonaire où elles joueront un rôle actif dans la production de TGF- β 1 et de MEC participant ainsi à l'augmentation du nombre de cellules myofibroblastiques au sein du parenchyme pulmonaire.

Ce travail de thèse nous a permis d'appréhender l'implication de certains de ces différents acteurs dans la fibrose pulmonaire et pleurale, et de mettre en évidence le rôle de la petite

protéine de stress α B-crystallin dans les processus de fibrogenèse et plus spécifiquement sur la voie du TGF- β 1 dépendante des protéines Smad. Nous discuterons d'abord de l'implication d' α B-crystallin au niveau du parenchyme pulmonaire puis de son rôle au niveau des cellules mésothéliales dans la fibrose pleuro-pulmonaire.

I- Rôle d' α B-crystallin dans la fibrose pulmonaire

Une des caractéristiques du poumon atteint de fibrose chez l'homme, est la présence de régions particulières, les foyers fibroblastiques au niveau desquels se concentrent les myofibroblastes et l'excès de MEC qu'ils produisent. Ces foyers regroupent donc tous les acteurs de la fibrose et sont des régions d'intérêt pour l'étude de la maladie. Au cours de ce travail, nous avons montré pour la première fois, qu' α B-crystallin était fortement exprimée dans les cellules épithéliales alvéolaires situées autour des foyers fibroblastiques ainsi que dans les cellules au sein de ces foyers (fibroblastes/myofibroblastes). Les cellules épithéliales et les fibroblastes présents au niveau de ces régions actives du poumon fibreux sont des cellules agressives qui acquièrent des caractéristiques myofibroblastiques et participent activement au développement de la fibrose. L'expression d' α B-crystallin dans ces cellules suggère un rôle de cette protéine dans leur transformation et leur participation à la production de TGF- β 1 et à la synthèse de MEC. α B-crystallin était également surexprimée dans nos modèles animaux (bléomycine, AdTGF- β 1 et AdIL-1 β) de manière plus diffuse, puisque les foyers fibroblastiques sont peu présents chez la souris atteinte de fibrose. Ces marquages suggèrent donc un rôle global d' α B-crystallin à la fois au niveau de cellules épithéliales et des fibroblastes. De plus, la fibrose était largement réduite chez les souris déficientes pour α B-crystallin dans nos modèles animaux.

Le TGF- β 1 est considéré comme l'élément pro-fibrosant majeur au cours de la fibrose pulmonaire par son action sur l'activation des fibroblastes et la transformation des cellules épithéliales par l'EMT. Dans notre travail, nous montrons que, dans un contexte pro-fibrosant, l'absence d' α B-crystallin bloque la voie du TGF- β dépendante des protéines Smad en inhibant la localisation nucléaire de Smad4 et donc son activité. Cependant, les voies du TGF- β sont multiples et impliquent de nombreuses autres protéines. Plusieurs études démontrent que les voies des MAPK, PI3K et JNK peuvent également être impliquées dans la fibrose pulmonaire (352-354). De plus, une étude parue en 2013, montre un rôle d' α B-crystallin sur

l'EMT à l'origine de la progression et du caractère agressif de carcinomes hépatiques (324). En effet, dans cet article, les auteurs montrent une action de la surexpression d' α B-crystallin sur l'activation de la voie de phosphorylation ERK qui induit un EMT des cellules d'hépatocarcinome favorisant la formation de métastases. Ainsi, α B-crystallin est un marqueur de mauvais pronostique pour ce type de cancer. Nous avons étudié dans notre travail le rôle d' α B-crystallin sur la phosphorylation de ERK. Dans nos modèles d'études, l'inhibition d' α B-crystallin n'entraînait aucune modification de la voie ERK sur les cellules épithéliales pulmonaires confirmant ainsi un rôle spécifique d' α B-crystallin sur la voie des Smad (Figure 79).

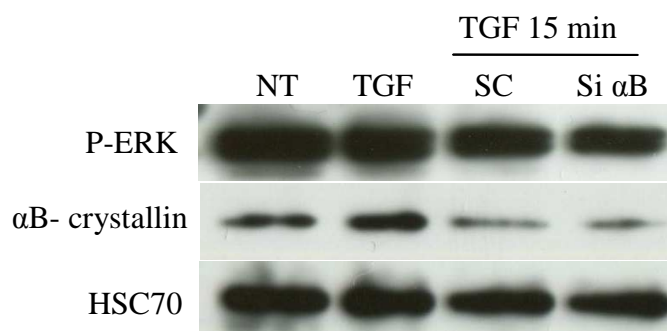


Figure 79 : L'inhibition d' α B-crystallin n'affecte pas la voie ERK

L'expression de P-ERK et α B-crystallin a été évaluée par Western blot sur des cellules A549 après inhibition d' α B-crystallin par un SiRNA spécifique (Scramble comme contrôle) et traitées ou non au rTGF- β 1 pour 15 minutes.

Même si l'implication des cellules épithéliales dans la fibrogenèse est largement acceptée, le concept d'EMT a récemment été sujet à controverse dans le monde de la pneumologie (146, 148). En 2006, Kim *et al.* démontraient *in vivo* que les cellules épithéliales alvéolaires subissaient une EMT et étaient une source importante de myofibroblastes dans un modèle de fibrose induite par l'AdTGF- β 1 (146). Cependant en 2011, une autre équipe montrait *in vivo*, dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine, que les cellules épithéliales pulmonaires étaient capables d'une grande plasticité mais remettaient en cause l'existence du phénomène d'EMT (148). Nos résultats *in vitro* mettent en évidence un rôle des cellules épithéliales dans des conditions pro-fibrosantes. En effet, après traitement au rTGF- β 1, une surexpression des marqueurs myofibroblastiques tels que α -SMA et le TGF- β 1 lui-même, était retrouvée chez les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 (AECII) primaires. De plus, la surexpression du facteur de transcription induisant l'EMT, Snai2, par ces cellules constitue une preuve de leur transformation via ce processus après stimulation au rTGF- β 1. Nous avons montré dans notre travail que la surexpression d' α -SMA, du TGF- β 1 et de Snai2 induite par le TGF- β 1 était

inhibée dans les AECII déficientes pour α B-crystallin suggérant que l'absence de cette petite protéine de stress limite le processus d'EMT.

De manière intéressante, l'absence d' α B-crystallin est également capable de bloquer la voie du TGF- β 1 dans les fibroblastes mettant en avant un rôle d' α B-crystallin à la fois chez les AECII et les fibroblastes. Le blocage de la voie du TGF- β 1 chez les souris KO pour α B-crystallin dans ces deux types cellulaires, pourrait être à l'origine d'une réduction du nombre de myofibroblastes ayant pour origine les AECII et les fibroblastes dans le tissu pulmonaire atteint de fibrose. Ceci peut être mis en corrélation avec la réduction de l'expression du procollagène produit par les myofibroblastes, dans les poumons des souris KO recevant de l'AdTGF- β 1, confirmant la réduction du nombre de myofibroblastes dans les poumons des souris KO après induction de fibrose. Malgré les débats actuels sur le processus d'EMT, nous montrons dans nos travaux que les cellules épithéliales primaires sont capables de subir une EMT après stimulation au rTGF- β 1 et que ce mécanisme est inhibé en absence d' α B-crystallin chez les animaux KO. De plus, la baisse de production de collagène et l'inhibition de la voie du TGF- β 1 des fibroblastes primaires en l'absence d' α B-crystallin, que nous montrons ici, renforce l'hypothèse selon laquelle le nombre de myofibroblastes serait réduit chez les souris déficientes pour α B-crystallin *in vivo* en conditions fibrotiques, expliquant la protection de ces animaux contre la fibrose induite par la bléomycine, l'AdTGF- β 1 et l'AdIL1.

Dans les deux types cellulaires que nous avons étudiés, ainsi que dans nos modèles *in vivo*, α B-crystallin modulait la voie du TGF- β 1 en jouant sur la localisation de la protéine Smad4. Le transport nucléo-cytoplasmique de Smad4 est essentiel pour la régulation de la voie du TF- β 1 Smad-dépendante. En effet, Smad4 voyage constamment entre le compartiment nucléaire et le cytoplasme suivant l'activation des différents signaux commandant son import ou son export nucléaire (118, 349). Il a été montré par de nombreux travaux, que l'inhibition de la translocation nucléaire de Smad4 entraînait l'inactivation de la voie du TGF- β 1 accompagnée par la baisse d'expression des gènes cibles du TGF- β 1 et du TGF- β 1 lui-même (355). L'export nucléaire de Smad4 est finement régulé par sa mono-ubiquitination par la protéine TIF1 γ (356). La mono-ubiquitination nucléaire de Smad4 par TIF1 γ permet la dissociation du complexe Smad2/3-Smad4 et favorise leur export nucléaire inhibant ainsi leur activité. La protéine TIF1 γ est donc un régulateur négatif de la voie du TGF- β 1 Smad-dépendante (357). De plus, le rôle de TIF1 γ sur Smad4 a récemment été mis en évidence comme régulateur négatif de l'EMT induite par le TGF- β 1 dans des cellules épithéliales mammaires (358). Nous

démontrons dans ce travail un rôle d' α B-crystallin sur la stabilité de TIF1 γ qui pourrait interférer avec le complexe TIF1 γ /Smad4 et ainsi moduler la localisation de Smad4. En condition de fibrose, la surexpression d' α B-crystallin entraîne une dégradation de TIF1 γ , et donc une réduction de l'interaction entre Smad4 et TIF1 γ inhibant l'export nucléaire de Smad4 et favorisant son activité pro-fibrosante. Nous n'avons cependant pas pu identifier le mécanisme impliqué dans la dégradation de TIF1 γ par α B-crystallin. Il a déjà été rapporté qu' α B-crystallin était impliquée dans le système de dégradation du protéasome (316, 359, 360) mais nos expériences d'inhibition de la dégradation protéasomale n'ont pas pu mettre en évidence ce mécanisme dans notre contexte. Un résultat préliminaire semblerait indiquer que l'inhibition de caspases par le Zvad pourrait contrer la dégradation de TIF1 γ induit par la surexpression d' α B-crystallin (Figure 80). Cependant, cette hypothèse suggère qu' α B-crystallin aurait un rôle positif sur l'activation des caspases ce qui est en contradiction avec de nombreuses études réalisées sur l'apoptose (306, 307).

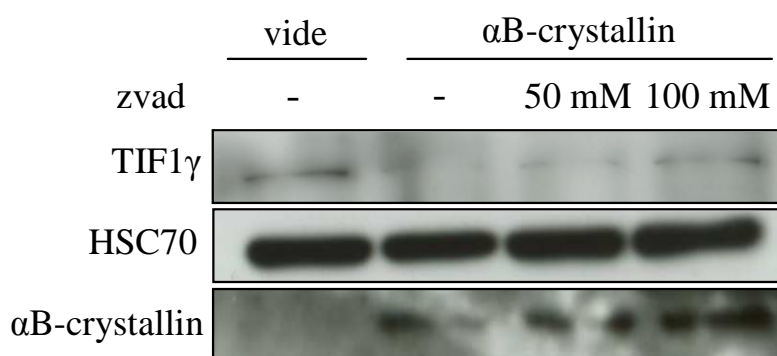


Figure 80 : L'inhibition des caspases restaure l'expression de TIF1 γ après surexpression d' α B-crystallin.

L'expression de TIF1 γ et α B-crystallin a été évaluée par Western blot sur des cellules A549 dans lesquelles α B-crystallin a été surexprimée à l'aide d'un plasmide (plasmide vide comme contrôle) après inhibition des caspases par le Zvad.

Outre son rôle sur la dégradation de TIF1 γ , nous montrons aussi la capacité d' α B-crystallin à interagir avec Smad4. La double interaction Smad4/ α B-crystallin – TIF1 γ / α B-crystallin laisse entrevoir un autre rôle d' α B-crystallin sur le complexe Smad4/TIF1 γ . En effet, nous émettons l'hypothèse qu'en interagissant avec Smad4, α B-crystallin « masque » le site de fixation de l'ubiquitine de Smad4 empêchant ainsi sa mono-ubiquitination et son export nucléaire. Selon cette hypothèse, α B-crystallin bloquerait l'interaction Smad4/TIF1 γ et donc la mono-ubiquitination de Smad4 par encombrement stérique. Cette seconde hypothèse semble plus vraisemblable et est en corrélation avec le rôle classique des protéines chaperonnes consistant

à inhiber les interactions et agrégations entre protéines. Des investigations plus poussées sur la nature exacte des interactions Smad4/ α B-crystallin/TIF1 γ sont actuellement en cours dans notre laboratoire pour définir si ces dernières sont directes et pour élucider plus précisément le rôle d' α B-crystallin dans ce complexe protéique. Dans un contexte de fibrose, le complexe TIF1 γ /Smad4 est donc inactif à cause de l'abondance d' α B-crystallin ; Smad4 est donc séquestrée dans le noyau et son activité de facteur de transcription sur les gènes profibrotiques de la voie du TGF- β 1 est augmentée. A l'inverse, chez les souris KO, l'absence d' α B-crystallin favorise l'action de TIF1 γ sur Smad4 en permettant la formation du complexe Smad4/TIF1 γ et induit l'export nucléaire de Smad4 donc son inactivation. De manière intéressante, la cinétique nucléo-cytoplasmique des protéines effectrices Smad2 et Smad3 est corrélée à celle de Smad4 (Figure 81). En effet, l'inhibition d' α B-crystallin permet également l'export de Smad2 et Smad3. Nous pensons que l'action d' α B-crystallin sur Smad4 se répercute sur Smad2 et 3 inhibant ainsi l'activité de facteur de transcription du complexe Smad2/3/4 et bloquant la voie de signalisation du TGF- β 1.

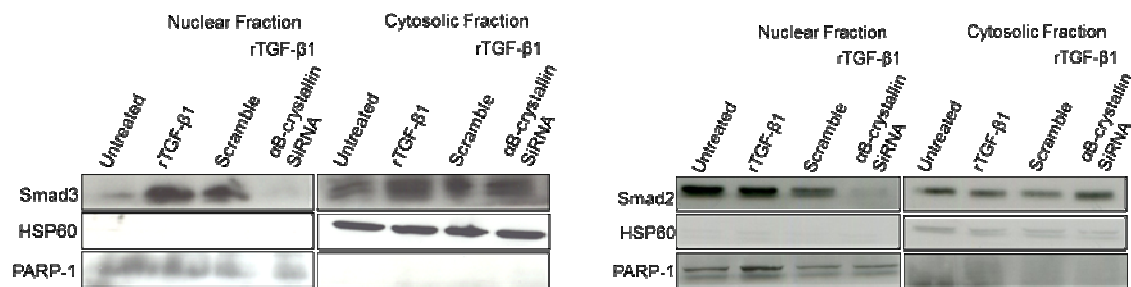


Figure 81 : L'inhibition d' α B-crystallin entraîne l'export nucléaire de Smad2 et Smad3

Les populations nucléaires et cytoplasmiques de Smad2 et smad3 étaient déterminées par fractionnement cellulaire des cellules A549 transfectées avec un siRNA spécifique d' α B-crystallin ou un siRNA scramble (contrôle) et/ou traitées avec du rTGF- β 1 (10ng/ml, 12h et 24h). La protéine PARP1 nucléaire et la protéine HSP60 mitochondriale étaient utilisées comme contrôles pour la pureté des extraits.

Le rôle de l'inflammation dans la fibrose pulmonaire reste aujourd'hui sujet à controverse (8, 9). Les thérapies anti-inflammatoires utilisées actuellement pour tenter de lutter contre la fibrose pulmonaire n'ont pas montré d'effets bénéfiques importants sur le développement de la maladie, même si l'inflammation semble avoir un rôle dans sa pathogenèse (78, 361, 362). Nous avons montré que l'absence d' α B-crystallin n'affectait pas l'inflammation précoce (entre J0 et J10) induite par la bléomycine alors que la production et le dépôt de collagène était fortement atténués chez les souris KO à des temps plus longs (J21). Il a été précédemment montré que la surexpression d'IL1 β activait la voie des Smad et conduisait à une surproduction persistante de TGF- β 1 (363). Dans ce modèle, une voie des Smad

fonctionnelle est nécessaire à l'établissement d'une fibrose et l'IL1 β est vraisemblablement impliquée dans la formation des myofibroblastes et le processus d'EMT via l'activation du TGF- β 1 (364, 365). Nous confirmons dans notre étude que la fibrose induite par l'IL1 β est associée à une surproduction de TGF- β 1 chez les souris WT, mais pas chez les souris KO pour lesquelles l'expression du TGF- β 1 est déficiente. Nous pensons que dans nos modèles *in vivo* et *in vitro*, α B-crystallin est surexprimée par l'inflammation et que cette surexpression active la voie des Smad en favorisant l'activité de Smad4. De manière intéressante, la protéine chaperonne du collagène HSP47 est connue pour être induite par l'inflammation. Dans nos modèles, HSP47 est surexprimée chez les souris WT et KO par la phase d'inflammation à J7, mais cette surexpression n'est conservée que chez les souris WT à J21 (366). L'expression d'HSP47 est maintenue chez les souris WT par la mise en place d'un environnement pro-fibrosant par le TGF- β 1, notamment en corrélation avec l'augmentation de l'expression du collagène. Chez les souris KO, l'expression d'HSP47 induite par la phase inflammatoire n'est pas maintenue puisque l'expression du TGF- β 1 est limitée par l'absence d' α B-crystallin. La biosynthèse et la maturation du collagène à J21 sont donc moins fortes chez les souris KO limitant le dépôt de collagène et la progression de la fibrose.

Comme nous l'avons déjà décrit, l'apoptose est un élément déclencheur important des processus fibrotiques. Le rôle cyto-protectif d' α B-crystallin a été largement décrit dans la littérature, notamment via son rôle inhibiteur de l'activation de la caspase-3 limitant l'apoptose. Cependant, dans nos modèles, nous n'avons observé aucune modification de la mort cellulaire des cellules épithéliales ou de fibroblastes pulmonaires entre souris WT et KO après injection de bléomycine. L'absence d' α B-crystallin ne semble donc ni jouer sur l'apoptose ni sur l'inflammation induite par la bléomycine, mais principalement sur l'expression du TGF- β 1 et de ces gènes cibles.

Actuellement, seulement quelques nouveaux médicaments aux effets limités sont disponibles pour aider les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique.

Certaines de ces molécules sont en cours d'essais cliniques, notamment la N-acétylcystéine anti-oxydant (NAC), qui augmente la résistance des cellules aux lésions oxydatives et peut donc avoir un effet bénéfique sur la fibrose pulmonaire. En effet, le stress oxydatif est impliqué dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire et est délétère pour les cellules épithéliales alvéolaires. Il a été montré dans différents modèles que l'expression d' α B-crystallin est en corrélation avec les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène comme l'oxyde

nitrique et la peroxydation lipidique (367, 368). Nous pensons que le stress oxydatif dans les poumons de patients atteints de FPI pourrait être un stimulus induisant l'expression d' α B-crystallin, qui à son tour contribue à l'activation des voies pro-fibrotiques du TGF- β et des Smad.

La Pirfenidone est une autre molécule testée dans des essais cliniques pouvant inhiber la progression de la fibrose dans des modèles animaux et chez les patients atteints de FPI. Bien que le mécanisme exact par lequel la pirfenidone pourrait interférer avec la fibrose dans les poumons reste incertaine, elle a été rapportée pour avoir une action anti-inflammatoire et anti-oxydante combinée. Ce petit composé est également capable d'inhiber l'expression du TGF- β 1 et d'HSP47 (329, 369). De manière intéressante, il a récemment été montré dans les cellules épithéliales rétinienne que la pirfenidone inhibe la fibrose induite par le TGF- β 1 en bloquant la translocation nucléaire de Smad4 (331). L'implication d' α B-crystallin dans l'effet anti-fibrotique de pirfenidone n'a pas encore été déterminée. Il serait cependant intéressant de savoir quel est l'effet de ces molécules sur l'expression d' α B-crystallin sur les cellules pulmonaires et chez les patients traités. L'inhibition d' α B-crystallin par ces composés pourrait en partie expliquer leurs effets notamment la modulation de la localisation de Smad4 par la pirfenidone. Ce travail démontre qu' α B-crystallin peut être une cible clé pour le développement de médicaments spécifiques dans le traitement des maladies fibrotiques.

II- Rôle d' α B-crystallin dans la fibrose pleurale

Outre le rôle d' α B-crystallin dans la fibrose du parenchyme pulmonaire, nous avons identifié une fonction similaire de cette sHSP au niveau pleural. En effet, nous avons remarqué une surexpression importante d' α B-crystallin au niveau de la plèvre des patients atteints de FPI. De plus, l'induction de fibrose pleurale par l'AdTGF- β 1 ou la bléomycine combinée à des particules de carbone était fortement limitée chez les souris déficientes pour α B-crystallin. Cette limitation de la fibrose pleurale était accompagnée par une diminution de l'expression du collagène du TGF- β 1. Grâce à l'étude des cellules mésothéliales, nous avons identifié le même mécanisme retrouvé dans les AECII et les fibroblastes ; α B-crystallin modulait la localisation de Smad4 régulant ainsi la voie du TGF- β 1.

Notre équipe a déjà montré le rôle des cellules mésothéliales dans la fibrose pleurale et également la fibrose pleuro-pulmoanire. En effet, grâce à l'étude d'HSP27, nous avons montré que les cellules mésothéliales pleurales subissaient, sous l'influence du TGF- β 1, une

transformation semblable à l'EMT. Au cours de cette transformation, les cellules de la plèvre ayant acquis un phénotype myofibroblastique migraient au sein du parenchyme pour initier la fibrose pulmonaire. L'inhibition d'HSP27 était capable de limiter ce phénomène en inhibant l'EMT. Ici, nous montrons *in vitro* que l'inhibition d' α B-crystallin limite également la migration de cellules mésothéliales. De plus, *in vivo*, la migration des cellules de la plèvre en réponse à l'administration d'AdTGF- β 1 était inhibée chez les souris KO alors que chez les souris WT un « envahissement » du parenchyme pulmonaire sous-jacent par les cellules mésothéliales était observé. Cependant les mécanismes que nous avons mis en évidence lors de ces deux études sont distincts. Alors qu'HSP27 exerce un rôle de chaperon pour le facteur de transcription Snail favorisant l'EMT, α B-crystallin favorise la localisation cellulaire de Smad4 augmentant également le phénomène d'EMT de cellules mésothéliales. Nous pensons que l'inhibition des deux sHSP simultanément, pourrait apporter un effet bénéfique synergique sur la fibrogenèse. L'utilisation de l'inhibiteur de l'expression d'HSP27 chez les souris KO pour α B-crystallin constitue donc la prochaine étape de nos recherches.

III- Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre les désordres fibrotiques. Le rôle global d' α B-crystallin sur les cellules importantes dans le développement des fibroses pleurales et pulmonaires en fait un acteur potentiellement majeur dans ces pathologies. Nous avons montré que l'inhibition d' α B-crystallin bloquait la voie de signalisation du TGF- β 1, voie essentielle de la fibrogenèse.

Nous pensons que l'ensemble de ces travaux apporte à différents niveaux, des outils pour améliorer notre compréhension de la fibrose pulmonaire, pour pouvoir cibler de nouvelles molécules pour de futures thérapies ou encore pour essayer de prévenir les fibroses pulmonaires ou pleuro-pulmonaires dont les étiologies sont déjà connues.

Références

1. Camus, P.H., Foucher, P., Bonniaud, P.H., and Ask, K. 2001. Drug-induced infiltrative lung disease. *Eur Respir J Suppl* 32:93s-100s.
2. Duggan, D.B., Petroni, G.R., Johnson, J.L., Glick, J.H., Fisher, R.I., Connors, J.M., Canellos, G.P., and Peterson, B.A. 2003. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. *J Clin Oncol* 21:607-614.
3. Froudarakis, M., Hatzimichael, E., Kyriazopoulou, L., Lagos, K., Pappas, P., Tzakos, A.G., Karavasilis, V., Daliani, D., Papandreou, C., and Briasoulis, E. 2013. Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Crit Rev Oncol Hematol*.
4. Camus, P., Fanton, A., Bonniaud, P., Camus, C., and Foucher, P. 2004. Interstitial lung disease induced by drugs and radiation. *Respiration* 71:301-326.
5. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., and Kolb, M. 2008. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* 40:362-382.
6. Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., et al. 2011. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183:788-824.
7. Todd, N.W., Luzina, I.G., and Atamas, S.P. 2012. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5:11.
8. Gauldie, J. 2002. Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1205-1206.
9. Strieter, R.M. 2002. Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1206-1207; discussion 1207-1208.
10. Rafii, R., Juarez, M.M., Albertson, T.E., and Chan, A.L. 2013. A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *J Thorac Dis* 5:48-73.
11. Decolonne, N., Kolb, M., Margetts, P.J., Menetrier, F., Artur, Y., Garrido, C., Gauldie, J., Camus, P., and Bonniaud, P. 2007. TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 179:6043-6051.
12. Ritossa, F.M. 1964. Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res* 35:601-607.
13. Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84:389-398.
14. Gething, M.J., and Sambrook, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45.
15. Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., and Green, D.R. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2:469-475.
16. Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., et al. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2:645-652.
17. Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., and Garrido, C. 2006. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*:171-198.
18. Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., and Alnemri, E.S. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2:476-483.

19. Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., and Calderwood, S.K. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6:435-442.
20. Tamura, Y., Torigoe, T., Kutomi, G., Hirata, K., and Sato, N. 2012. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Curr Mol Med* 12:1198-1206.
21. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., and Bonniaud, P. 2012. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? *Int J Biochem Cell Biol* 44:1680-1686.
22. Jego, G., Hazoume, A., Seigneuric, R., and Garrido, C. 2013. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 332:275-285.
23. Ghosh, J.C., Dohi, T., Kang, B.H., and Altieri, D.C. 2008. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 283:5188-5194.
24. Lemieux, P., Oesterreich, S., Lawrence, J.A., Steeg, P.S., Hilsenbeck, S.G., Harvey, J.M., and Fuqua, S.A. 1997. The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis* 17:113-123.
25. Sanderson, S., Valenti, M., Gowan, S., Patterson, L., Ahmad, Z., Workman, P., and Eccles, S.A. 2006. Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 5:522-532.
26. Thuringer, D., Jego, G., Wettstein, G., Terrier, O., Cronier, L., Yousfi, N., Hebrard, S., Bouchot, A., Hazoume, A., Joly, A.L., et al. 2013. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J*.
27. Rappa, F., Farina, F., Zummo, G., David, S., Campanella, C., Carini, F., Tomasello, G., Damiani, P., Cappello, F., EC, D.E.M., et al. 2012. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer Res* 32:5139-5150.
28. Wynn, T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117:524-529.
29. Hutchison, N., Fligny, C., and Duffield, J.S. 2012. Resident mesenchymal cells and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*.
30. Kisseleva, T., and Brenner, D.A. 2008. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:109-122.
31. Kisseleva, T., and Brenner, D.A. 2008. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc* 5:338-342.
32. Bataller, R., and Brenner, D.A. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209-218.
33. Kuwano, K., Hagimoto, N., and Nakanishi, Y. 2004. The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol* 19:867-881.
34. Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J.M. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964-3972.
35. Suematsu, M., Suzuki, H., Delano, F.A., and Schmid-Schonbein, G.W. 2002. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation* 9:259-276.
36. Piotrowski, W.J., and Marczak, J. 2000. Cellular sources of oxidants in the lung. *Int J Occup Med Environ Health* 13:369-385.
37. Wynn, T.A. 2003. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21:425-456.
38. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
39. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146:56-66.

40. Thannickal, V.J., and Horowitz, J.C. 2006. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 3:350-356.
41. Drakopanagiotakis, F., Xifteri, A., Polychronopoulos, V., and Bouros, D. 2008. Apoptosis in lung injury and fibrosis. *Eur Respir J* 32:1631-1638.
42. Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., and Hara, N. 2002. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 168:6470-6478.
43. Tanaka, T., Yoshimi, M., Maeyama, T., Hagimoto, N., Kuwano, K., and Hara, N. 2002. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur Respir J* 20:359-368.
44. Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z., and Thannickal, V.J. 2004. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem* 279:1359-1367.
45. Arora, P.D., Narani, N., and McCulloch, C.A. 1999. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol* 154:871-882.
46. Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., and Thomas, P.E. 2003. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278:12384-12389.
47. Muiznieks, L.D., and Keeley, F.W. 2012. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta*.
48. Wight, T.N., and Potter-Perigo, S. 2011. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G950-955.
49. Kim, S.H., Turnbull, J., and Guimond, S. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209:139-151.
50. Aitken, K.J., and Bagli, D.J. 2009. The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nat Rev Urol* 6:596-611.
51. Shoulders, M.D., and Raines, R.T. 2009. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78:929-958.
52. Bodian, D.L., Madhan, B., Brodsky, B., and Klein, T.E. 2008. Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. *Biochemistry* 47:5424-5432.
53. Beck, K., Chan, V.C., Shenoy, N., Kirkpatrick, A., Ramshaw, J.A., and Brodsky, B. 2000. Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4273-4278.
54. Ramshaw, J.A., Shah, N.K., and Brodsky, B. 1998. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* 122:86-91.
55. Jimenez, S.A., Hitraya, E., and Varga, J. 1996. Pathogenesis of scleroderma. Collagen. *Rheum Dis Clin North Am* 22:647-674.
56. Dancer, R.C., Wood, A.M., and Thickett, D.R. 2011. Metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 38:1461-1467.
57. Phan, S.H. 2002. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122:286S-289S.
58. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253:269-285.
59. Gueders, M.M., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D.D. 2006. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 533:133-144.
60. Loffek, S., Schilling, O., and Franzke, C.W. 2011. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 38:191-208.

61. Egeblad, M., and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161-174.
62. Nagase, H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378:151-160.
63. Noel, A., Maillard, C., Rocks, N., Jost, M., Chabottaux, V., Sounni, N.E., Maquoi, E., Cataldo, D., and Foidart, J.M. 2004. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol* 57:577-584.
64. Cook, D.N., Brass, D.M., and Schwartz, D.A. 2002. A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:122-124.
65. McKeown, S., Richter, A.G., O'Kane, C., McAuley, D.F., and Thickett, D.R. 2009. MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF. *Eur Respir J* 33:77-84.
66. Pardo, A., Selman, M., and Kaminski, N. 2008. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1141-1155.
67. Selman, M., Pardo, A., Barrera, L., Estrada, A., Watson, S.R., Wilson, K., Aziz, N., Kaminski, N., and Zlotnik, A. 2006. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:188-198.
68. O'Kane, C.M., McKeown, S.W., Perkins, G.D., Bassford, C.R., Gao, F., Thickett, D.R., and McAuley, D.F. 2009. Salbutamol up-regulates matrix metalloproteinase-9 in the alveolar space in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 37:2242-2249.
69. Ruiz, V., Ordonez, R.M., Berumen, J., Ramirez, R., Uhal, B., Becerril, C., Pardo, A., and Selman, M. 2003. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1026-1036.
70. Garcia-Alvarez, J., Ramirez, R., Checa, M., Nuttall, R.K., Sampieri, C.L., Edwards, D.R., Selman, M., and Pardo, A. 2006. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in vitro and expressed in fibroblastic foci in vivo in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 32:201-214.
71. Ramos, C., Montano, M., Garcia-Alvarez, J., Ruiz, V., Uhal, B.D., Selman, M., and Pardo, A. 2001. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:591-598.
72. Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., Segura, L., Ramirez, R., Barrios, R., and Pardo, A. 2000. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L562-574.
73. Alam, N., Goel, H.L., Zarif, M.J., Butterfield, J.E., Perkins, H.M., Sansoucy, B.G., Sawyer, T.K., and Languino, L.R. 2007. The integrin-growth factor receptor duet. *J Cell Physiol* 213:649-653.
74. Xu, P., Liu, J., and Derynck, R. 2012. Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS Lett* 586:1871-1884.
75. Gauldie, J., Bonniaud, P., Sime, P., Ask, K., and Kolb, M. 2007. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 35:661-664.
76. Bringardner, B.D., Baran, C.P., Eubank, T.D., and Marsh, C.B. 2008. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10:287-301.
77. Piguet, P.F., Ribaux, C., Karpuz, V., Grau, G.E., and Kapanci, Y. 1993. Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 143:651-655.
78. Kolb, M., Margetts, P.J., Anthony, D.C., Pitossi, F., and Gauldie, J. 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107:1529-1536.
79. Kelly, M., Kolb, M., Bonniaud, P., and Gauldie, J. 2003. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des* 9:39-49.
80. Lasky, J.A., and Brody, A.R. 2000. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4:751-762.

81. Javelaud, D., and Mauviel, A. 2004. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1161-1165.
82. Clark, D.A., and Coker, R. 1998. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30:293-298.
83. Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. 2011. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors*.
84. Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116:217-224.
85. Schiller, M., Javelaud, D., and Mauviel, A. 2004. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35:83-92.
86. Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124:2659-2670.
87. Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P.J., Warburton, D., Groffen, J., Gauldie, J., and Kolb, M. 2008. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *Int J Biochem Cell Biol* 40:484-495.
88. Fortunel, N.O., Hatzfeld, A., and Hatzfeld, J.A. 2000. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96:2022-2036.
89. Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618-10624.
90. Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazziere, R., Nunes, I., and Rifkin, D.B. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51:1376-1382.
91. Sheppard, D. 2006. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 3:413-417.
92. Border, W.A., and Noble, N.A. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292.
93. Dennler, S., Goumans, M.J., and ten Dijke, P. 2002. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 71:731-740.
94. Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F., and Moses, H.L. 1990. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110:1361-1367.
95. Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96:319-328.
96. Goodwin, A., and Jenkins, G. 2009. Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans* 37:849-854.
97. Annes, J.P., Chen, Y., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. 2004. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol* 165:723-734.
98. Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., and Nishimura, S.L. 2002. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol* 157:493-507.
99. Khalil, N., Parekh, T.V., O'Connor, R., Antman, N., Kepron, W., Yehaulaeshet, T., Xu, Y.D., and Gold, L.I. 2001. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 56:907-915.

100. Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. 1992. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68:775-785.
101. Franzen, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.H., and Miyazono, K. 1993. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 75:681-692.
102. Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.
103. Piek, E., Heldin, C.H., and Ten Dijke, P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124.
104. Lopez-Casillas, F., Wrana, J.L., and Massague, J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444.
105. Bonniaud, P., Margetts, P.J., Kolb, M., Schroeder, J.A., Kapoun, A.M., Damm, D., Murphy, A., Chakravarty, S., Dugar, S., Higgins, L., et al. 2005. 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.
106. Attisano, L., and Wrana, J.L. 1998. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol* 10:188-194.
107. Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95:779-791.
108. Roberts, A.B. 1999. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* 1:1265-1273.
109. Wells, R.G. 2000. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G845-850.
110. Shi, Y., and Massague, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
111. Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6:1365-1375.
112. Derynck, R., and Zhang, Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584.
113. Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783-2810.
114. Verrecchia, F., and Mauviel, A. 2002. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 118:211-215.
115. Leong, G.M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J.L., Hayman, M.J., Eisman, J.A., and Kouzmenko, A.P. 2001. Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem* 276:18243-18248.
116. Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
117. Wrana, J.L. 2009. The secret life of Smad4. *Cell* 136:13-14.
118. Pierreux, C.E., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. 2000. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 20:9041-9054.
119. Nicolas, F.J., De Bosscher, K., Schmierer, B., and Hill, C.S. 2004. Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *J Cell Sci* 117:4113-4125.
120. Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., et al. 2009. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136:123-135.
121. Miyazono, K. 2000. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 7):1101-1109.
122. Guo, X., and Wang, X.F. 2009. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 19:71-88.

123. Bonniaud, P., Kolb, M., Galt, T., Robertson, J., Robbins, C., Stampfli, M., Lavery, C., Margetts, P.J., Roberts, A.B., and Gauldie, J. 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 173:2099-2108.
124. Flanders, K.C. 2004. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85:47-64.
125. Higashiyama, H., Yoshimoto, D., Okamoto, Y., Kikkawa, H., Asano, S., and Kinoshita, M. 2007. Receptor-activated Smad localisation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 60:283-289.
126. Verrecchia, F., Chu, M.L., and Mauviel, A. 2001. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276:17058-17062.
127. Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., Miyazono, K., and Iwamoto, I. 1999. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104:5-11.
128. Meng, X.M., Huang, X.R., Xiao, J., Chung, A.C., Qin, W., Chen, H.Y., and Lan, H.Y. 2012. Disruption of Smad4 impairs TGF-beta/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney Int* 81:266-279.
129. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.L., and Gabbiani, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170:1807-1816.
130. Hinz, B., Pittet, P., Smith-Clerc, J., Chaponnier, C., and Meister, J.J. 2004. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* 15:4310-4320.
131. Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., and Chaponnier, C. 2001. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12:2730-2741.
132. McAnulty, R.J. 2007. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:666-671.
133. Harada, T., Watanabe, K., Nabeshima, K., Hamasaki, M., and Iwasaki, H. 2013. Prognostic significance of fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia and non-specific interstitial pneumonia. *Respirology* 18:278-283.
134. Cool, C.D., Groshong, S.D., Rai, P.R., Henson, P.M., Stewart, J.S., and Brown, K.K. 2006. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med* 174:654-658.
135. Gabbiani, G. 1999. Some historical and philosophical reflections on the myofibroblast concept. *Curr Top Pathol* 93:1-5.
136. Phan, S.H., Zhang, K., Zhang, H.Y., and Gharaee-Kermani, M. 1999. The myofibroblast as an inflammatory cell in pulmonary fibrosis. *Curr Top Pathol* 93:173-182.
137. Chambers, R.C., Leoni, P., Kaminski, N., Laurent, G.J., and Heller, R.A. 2003. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol* 162:533-546.
138. Chen, Z., Jin, N., Narasaraaju, T., Chen, J., McFarland, L.R., Scott, M., and Liu, L. 2004. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells. *Biochem Biophys Res Commun* 319:774-780.
139. Adamson, I.Y., and Bowden, D.H. 1974. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30:35-42.
140. Hay, E.D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154:8-20.
141. Willis, B.C., and Borok, Z. 2007. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L525-534.
142. Zavadil, J., and Bottinger, E.P. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-5774.

143. Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Bottinger, E.P. 2001. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6686-6691.
144. Zeisberg, M., and Neilson, E.G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119:1429-1437.
145. Liu, Y. 2010. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21:212-222.
146. Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., and Chapman, H.A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13180-13185.
147. Kolosova, I., Nethery, D., and Kern, J.A. 2011. Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells. *J Cell Physiol* 226:1248-1254.
148. Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Cronic, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W., and Hogan, B.L. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1475-1483.
149. Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., and Cerami, A. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81.
150. Abe, R., Donnelly, S.C., Peng, T., Bucala, R., and Metz, C.N. 2001. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166:7556-7562.
151. Andersson-Sjoland, A., de Alba, C.G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramirez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., and Selman, M. 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2129-2140.
152. Epperly, M.W., Guo, H., Gretton, J.E., and Greenberger, J.S. 2003. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:213-224.
153. Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S.W., and Phan, S.H. 2004. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113:243-252.
154. Song, J.S., Kang, C.M., Kang, H.H., Yoon, H.K., Kim, Y.K., Kim, K.H., Moon, H.S., and Park, S.H. 2010. Inhibitory effect of CXC chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 on bleomycin induced murine pulmonary fibrosis. *Exp Mol Med* 42:465-472.
155. Wynn, T.A. 2011. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 208:1339-1350.
156. Chen, J., and Stubbe, J. 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-112.
157. Schwartz, D.R., Homanics, G.E., Hoyt, D.G., Klein, E., Abernethy, J., and Lazo, J.S. 1999. The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4680-4685.
158. Moore, B.B., and Hogaboam, C.M. 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L152-160.
159. Chung, M.P., Monick, M.M., Hamzeh, N.Y., Butler, N.S., Powers, L.S., and Hunninghake, G.W. 2003. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:375-380.
160. Sime, P.J., Xing, Z., Graham, F.L., Csaky, K.G., and Gauldie, J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100:768-776.
161. Margetts, P.J., Bonniaud, P., Liu, L., Hoff, C.M., Holmes, C.J., West-Mays, J.A., and Kelly, M.M. 2005. Transient overexpression of TGF-beta1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 16:425-436.
162. Phan, S.H., and Kunkel, S.L. 1992. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 18:29-43.

163. Piguet, P.F., Vesin, C., Grau, G.E., and Thompson, R.C. 1993. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 5:57-61.
164. Degryse, A.L., and Lawson, W.E. 2011. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* 341:444-449.
165. English, J.C., and Leslie, K.O. 2006. Pathology of the pleura. *Clin Chest Med* 27:157-180.
166. Agostoni, E., and Zocchi, L. 2007. Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 159:311-323.
167. Jantz, M.A., and Antony, V.B. 2008. Pathophysiology of the pleura. *Respiration* 75:121-133.
168. Mutsaers, S.E. 2002. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 7:171-191.
169. Simsir, A., Fetsch, P., Mehta, D., Zakowski, M., and Abati, A. 1999. E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: the good, the bad, the worthless. *Diagn Cytopathol* 20:125-130.
170. Foley-Comer, A.J., Herrick, S.E., Al-Mishlab, T., Prele, C.M., Laurent, G.J., and Mutsaers, S.E. 2002. Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing. *J Cell Sci* 115:1383-1389.
171. Mutsaers, S.E. 2004. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36:9-16.
172. Jones, L.M., Gardner, M.J., Catterall, J.B., and Turner, G.A. 1995. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin Exp Metastasis* 13:373-380.
173. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Kolb, M., Hammann, A., Crestani, B., Soler, P., Marchal-Somme, J., Hazoume, A., Gaudie, J., Gunther, A., et al. 2013. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 27:1549-1560.
174. Nasreen, N., Mohammed, K.A., Mubarak, K.K., Baz, M.A., Akindipe, O.A., Fernandez-Bussy, S., and Antony, V.B. 2009. Pleural mesothelial cell transformation into myofibroblasts and haptotactic migration in response to TGF-beta1 in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L115-124.
175. Lv, Z.D., Na, D., Ma, X.Y., Zhao, C., Zhao, W.J., and Xu, H.M. 2011. Human peritoneal mesothelial cell transformation into myofibroblasts in response to TGF-ss1 in vitro. *Int J Mol Med* 27:187-193.
176. Strippoli, R., Benedicto, I., Perez Lozano, M.L., Cerezo, A., Lopez-Cabrera, M., and del Pozo, M.A. 2008. Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF-kappaB/Snail1 pathway. *Dis Model Mech* 1:264-274.
177. Yang, A.H., Chen, J.Y., and Lin, J.K. 2003. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 63:1530-1539.
178. Huggins, J.T., and Sahn, S.A. 2004. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology* 9:441-447.
179. Jantz, M.A., and Antony, V.B. 2006. Pleural fibrosis. *Clin Chest Med* 27:181-191.
180. Pfitzenmeyer, P., Foucher, P., Dennewald, G., Chevalon, B., Debieuvre, D., Bensa, P., Piard, F., and Camus, P. 1996. Pleuropulmonary changes induced by ergoline drugs. *Eur Respir J* 9:1013-1019.
181. Hamada, K., Nagai, S., Kitaichi, M., Jin, G., Shigematsu, M., Nagao, T., Sato, A., and Mishima, M. 2003. Cyclophosphamide-induced late-onset lung disease. *Intern Med* 42:82-87.
182. Malik, S.W., Myers, J.L., DeRemee, R.A., and Specks, U. 1996. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use. Two distinct patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1851-1856.
183. Balbir-Gurman, A., Yigla, M., Nahir, A.M., and Braun-Moscovici, Y. 2006. Rheumatoid pleural effusion. *Semin Arthritis Rheum* 35:368-378.
184. Jagirdar, J., Lee, T.C., Reibman, J., Gold, L.I., Aston, C., Begin, R., and Rom, W.N. 1997. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5:1197-1203.

185. Harvey, W., and Amlot, P.L. 1983. Collagen production by human mesothelial cells in vitro. *J Pathol* 139:337-347.
186. Ma, C., Tarnuzzer, R.W., and Chegini, N. 1999. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* 7:477-485.
187. Falk, P., Ma, C., Chegini, N., and Holmdahl, L. 2000. Differential regulation of mesothelial cell fibrinolysis by transforming growth factor beta 1. *Scand J Clin Lab Invest* 60:439-447.
188. Sasse, S.A., Jadus, M.R., and Kukes, G.D. 2003. Pleural fluid transforming growth factor-beta1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. *Am J Respir Crit Care Med* 168:700-705.
189. Kunz, C.R., Jadus, M.R., Kukes, G.D., Kramer, F., Nguyen, V.N., and Sasse, S.A. 2004. Intrapleural injection of transforming growth factor-beta antibody inhibits pleural fibrosis in empyema. *Chest* 126:1636-1644.
190. Light, R.W., Cheng, D.S., Lee, Y.C., Rogers, J., Davidson, J., and Lane, K.B. 2000. 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.
191. Lee, Y.C., Lane, K.B., Parker, R.E., Ayo, D.S., Rogers, J.T., Deters, R.W., Thompson, P.J., and Light, R.W. 2000. Transforming growth factor beta(2) (TGF beta(2)) produces effective pleurodesis in sheep with no systemic complications. *Thorax* 55:1058-1062.
192. Harrison, J.H., Jr., and Lazo, J.S. 1987. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 243:1185-1194.
193. Nicholson, A.G. 2002. Classification of idiopathic interstitial pneumonias: making sense of the alphabet soup. *Histopathology* 41:381-391.
194. Souza, C.A., Muller, N.L., Flint, J., Wright, J.L., and Churg, A. 2005. Idiopathic pulmonary fibrosis: spectrum of high-resolution CT findings. *AJR Am J Roentgenol* 185:1531-1539.
195. Kelley, J., Shull, S., Walsh, J.J., Cutroneo, K.R., and Absher, M. 1993. Auto-induction of transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:417-424.
196. Decolonne, N., Wettstein, G., Kolb, M., Margetts, P., Garrido, C., Camus, P., and Bonniaud, P. 2010. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* 35:176-185.
197. Mubarak, K.K., Montes-Worboys, A., Regev, D., Nasreen, N., Mohammed, K.A., Faruqi, I., Hensel, E., Baz, M.A., Akindipe, O.A., Fernandez-Bussy, S., et al. 2012. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*.
198. Arrigo, A.P. 2005. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* 21:619-625.
199. Westerheide, S.D., Raynes, R., Powell, C., Xue, B., and Uversky, V.N. 2012. HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. *Curr Protein Pept Sci* 13:86-103.
200. Shi, Y., Mosser, D.D., and Morimoto, R.I. 1998. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 12:654-666.
201. Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, S.M., Jr., Sistonen, L., and Morimoto, R.I. 2009. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323:1063-1066.
202. Nguyen, V.T., Morange, M., and Bensaude, O. 1989. Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem* 264:10487-10492.
203. Ananthan, J., Goldberg, A.L., and Voellmy, R. 1986. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232:522-524.
204. Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., and Garrido, C. 2010. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal* 10:1543-1552.
205. Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., and Hightower, L.E. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14:105-111.

206. Biasini, E., Fioriti, L., Ceglia, I., Invernizzi, R., Bertoli, A., Chiesa, R., and Forloni, G. 2004. Proteasome inhibition and aggregation in Parkinson's disease: a comparative study in untransfected and transfected cells. *J Neurochem* 88:545-553.
207. Allegra, A., Sant'antonio, E., Penna, G., Alonci, A., D'Angelo, A., Russo, S., Cannavo, A., Gerace, D., and Musolino, C. 2011. Novel therapeutic strategies in multiple myeloma: role of the heat shock protein inhibitors. *Eur J Haematol* 86:93-110.
208. Kamada, M., So, A., Muramaki, M., Rocchi, P., Beraldi, E., and Gleave, M. 2007. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6:299-308.
209. Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., and Nardai, G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79:129-168.
210. Multhoff, G. 2006. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol*:279-304.
211. Pearl, L.H., and Prodromou, C. 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75:271-294.
212. Czar, M.J., Welsh, M.J., and Pratt, W.B. 1996. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 70:322-330.
213. Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M.F., Fritz, L.C., and Burrows, F.J. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425:407-410.
214. Noh, H., Kim, H.J., Yu, M.R., Kim, W.Y., Kim, J., Ryu, J.H., Kwon, S.H., Jeon, J.S., Han, D.C., and Ziyadeh, F. 2012. Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor-beta type II receptor. *Lab Invest* 92:1583-1596.
215. Myung, S.J., Yoon, J.H., Kim, B.H., Lee, J.H., Jung, E.U., and Lee, H.S. 2009. Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 330:276-282.
216. Reka, A.K., Kuick, R., Kurapati, H., Standiford, T.J., Omenn, G.S., and Keshamouni, V.G. 2011. Identifying inhibitors of epithelial-mesenchymal transition by connectivity map-based systems approach. *J Thorac Oncol* 6:1784-1792.
217. Banh, A., Deschamps, P.A., Vijayan, M.M., Sivak, J.G., and West-Mays, J.A. 2007. The role of Hsp70 and Hsp90 in TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in rat lens epithelial explants. *Mol Vis* 13:2248-2262.
218. Wrighton, K.H., Lin, X., and Feng, X.H. 2008. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9244-9249.
219. Zhang, K., Lu, Y., Yang, P., Li, C., Sun, H., Tao, D., Liu, Y., Zhang, S., and Ma, Y. 2012. HILI inhibits TGF-beta signaling by interacting with Hsp90 and promoting TbetaR degradation. *PLoS One* 7:e41973.
220. Sun, X., Zhang, X.D., Cheng, G., Hu, Y.H., and Wang, H.Y. 2009. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation by heat shock protein 90 inhibitors in vitro. *Mol Cell Biochem* 330:181-185.
221. Mann, D.A., and Smart, D.E. 2002. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 50:891-896.
222. Daugaard, M., Rohde, M., and Jaattela, M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581:3702-3710.
223. Florin, L., Becker, K.A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Muller, M., Streeck, R.E., and Sapp, M. 2004. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol* 78:5546-5553.
224. Welch, W.J., and Suhan, J.P. 1986. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103:2035-2052.
225. Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16:574-581.

226. Namba, T., Tanaka, K., Hoshino, T., Azuma, A., and Mizushima, T. 2011. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *PLoS One* 6:e27296.
227. Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L. 2005. Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* 14:1697-1709.
228. Goette, A., Staack, T., Rocken, C., Arndt, M., Geller, J.C., Huth, C., Ansorge, S., Klein, H.U., and Lendeckel, U. 2000. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 35:1669-1677.
229. Booz, G.W., Carl, L.L., and Baker, K.M. 1999. Amplification of angiotensin II signaling in cardiac myocytes by adenovirus-mediated overexpression of the AT1 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 874:20-26.
230. Wakisaka, O., Takahashi, N., Shinohara, T., Ooie, T., Nakagawa, M., Yonemochi, H., Hara, M., Shimada, T., Saikawa, T., and Yoshimatsu, H. 2007. Hyperthermia treatment prevents angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation via induction of heat-shock protein 72. *J Mol Cell Cardiol* 43:616-626.
231. Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A., and Mizushima, T. 2010. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 80:920-931.
232. Fujibayashi, T., Hashimoto, N., Jijiwa, M., Hasegawa, Y., Kojima, T., and Ishiguro, N. 2009. 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.
233. Zhou, Y., Mao, H., Li, S., Cao, S., Li, Z., Zhuang, S., Fan, J., Dong, X., Borkan, S.C., Wang, Y., et al. 2010. HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 21:598-609.
234. Kahloon, R.A., Xue, J., Bhargava, A., Csizmadia, E., Otterbein, L., Kass, D.J., Bon, J., Soejima, M., Levesque, M.C., Lindell, K.O., et al. 2013. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *Am J Respir Crit Care Med* 187:768-775.
235. Wells, A.U., and Kelleher, W.P. 2013. Idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis and novel approaches to immunomodulation: we must not be tyrannized by the PANTHER data. *Am J Respir Crit Care Med* 187:677-679.
236. Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., and Subject, J.R. 1995. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 270:15725-15733.
237. Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D., and Lindquist, S. 1991. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* 353:270-273.
238. Oh, H.J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y., and Subject, J.R. 1999. The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J Biol Chem* 274:15712-15718.
239. Yamagishi, N., Yokota, M., Yasuda, K., Saito, Y., Nagata, K., and Hatayama, T. 2011. Characterization of stress sensitivity and chaperone activity of Hsp105 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409:90-95.
240. Hatayama, T., and Yasuda, K. 1998. Association of HSP105 with HSC70 in high molecular mass complexes in mouse FM3A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248:395-401.
241. Andreasson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Mayer, M.P., and Bukau, B. 2008. Hsp110 is a nucleotide-activated exchange factor for Hsp70. *J Biol Chem* 283:8877-8884.
242. Mohamed, B.A., Barakat, A.Z., Zimmermann, W.H., Bittner, R.E., Muhlfeld, C., Hunlich, M., Engel, W., Maier, L.S., and Adham, I.M. 2012. Targeted disruption of Hspa4 gene leads to cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 53:459-468.

243. Mala, J.G., and Rose, C. 2010. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci* 87:579-586.
244. Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H.P., and Nagata, K. 2006. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell* 17:2346-2355.
245. Nagata, K. 1998. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol* 16:379-386.
246. Hendershot, L.M., and Bulleid, N.J. 2000. Protein-specific chaperones: the role of hsp47 begins to gel. *Curr Biol* 10:R912-915.
247. Masuda, H., Fukumoto, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. 1994. Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha 1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 94:2481-2488.
248. Sunamoto, M., Kuze, K., Iehara, N., Takeoka, H., Nagata, K., Kita, T., and Doi, T. 1998. Expression of heat shock protein 47 is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Int J Exp Pathol* 79:133-140.
249. Becerril, C., Pardo, A., Montano, M., Ramos, C., Ramirez, R., and Selman, M. 1999. Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1020-1027.
250. Mala, J.G., and Rose, C. 2010. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci* 87:579-586.
251. Razzaque, M.S., and Taguchi, T. 1997. Collagen-binding heat shock protein (HSP) 47 expression in anti-thymocyte serum (ATS)-induced glomerulonephritis. *J Pathol* 183:24-29.
252. Razzaque, M.S., Ahsan, N., and Taguchi, T. 2000. Heat shock protein 47 in renal scarring. *Nephron* 86:339-341.
253. Mishima, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Ozono, Y., Shiohita, K., Xia, Z., Harada, T., Taguchi, T., Koji, T., and Kohno, S. 2003. Enhanced expression of heat shock protein 47 in rat model of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 23:14-22.
254. Razzaque, M.S., Hossain, M.A., Kohno, S., and Taguchi, T. 1998. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows Arch* 432:455-460.
255. Kakugawa, T., Mukae, H., Hishikawa, Y., Ishii, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Fujii, T., Koji, T., and Kohno, S. 2010. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch* 456:309-315.
256. Iwashita, T., Kadota, J., Naito, S., Kaida, H., Ishimatsu, Y., Miyazaki, M., Ozono, Y., and Kohno, S. 2000. 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.
257. Xia, Z., Abe, K., Furusu, A., Miyazaki, M., Obata, Y., Tabata, Y., Koji, T., and Kohno, S. 2008. Suppression of renal tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein 47. *Am J Nephrol* 28:34-46.
258. Obata, Y., Nishino, T., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Koji, T., Tabata, Y., and Kohno, S. 2012. HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Acta Biomater* 8:2688-2696.
259. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., and Noguchi, T. 2007. An antisense oligonucleotide to HSP47 inhibits paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *Toxicology* 236:199-207.
260. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., and Noguchi, T. 2007. Antisense oligonucleotide inhibition of heat shock protein (HSP) 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respir Res* 8:37.
261. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., and Noguchi, T. 2007. Introduction of antisense oligonucleotides to heat shock protein 47 prevents pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced pneumopathy of the rat. *Eur J Pharmacol* 564:174-180.

262. Yoshioka, S., Mukae, H., Ishii, H., Kakugawa, T., Ishimoto, H., Sakamoto, N., Fujii, T., Urata, Y., Kondo, T., Kubota, H., et al. 2007. Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts. *Life Sci* 80:1839-1845.
263. Xiao, H.B., Liu, R.H., Ling, G.H., Xiao, L., Xia, Y.C., Liu, F.Y., Li, J., Liu, Y.H., Chen, Q.K., Lv, J.L., et al. 2012. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF-beta1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:F757-765.
264. Sasaki, H., Sato, T., Yamauchi, N., Okamoto, T., Kobayashi, D., Iyama, S., Kato, J., Matsunaga, T., Takimoto, R., Takayama, T., et al. 2002. 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.
265. Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., and Buchner, J. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* 16:221-229.
266. Ingolia, T.D., and Craig, E.A. 1982. Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2360-2364.
267. Lindquist, S., and Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
268. Arrigo, A.P., Suhan, J.P., and Welch, W.J. 1988. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol* 8:5059-5071.
269. Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S., and Inaguma, Y. 1994. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem* 269:11274-11278.
270. Mehlen, P., Hickey, E., Weber, L.A., and Arrigo, A.P. 1997. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241:187-192.
271. Mehlen, P., and Arrigo, A.P. 1994. The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *Eur J Biochem* 221:327-334.
272. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., and Gaestel, M. 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* 313:307-313.
273. Kostenko, S., Johannessen, M., and Moens, U. 2009. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal* 21:712-718.
274. Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E., and Garrido, C. 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 23:5790-5802.
275. Arrigo, A.P. 2000. sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol Biol (Paris)* 48:280-288.
276. Hino, M., Kurogi, K., Okubo, M.A., Murata-Hori, M., and Hosoya, H. 2000. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271:164-169.
277. Katoh, M., Koninkx, J., and Schumacher, U. 2000. Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Lett* 161:113-120.
278. Li, G.P., Wang, H., Lai, Y.K., Chen, S.C., Lin, M.C., Lu, G., Zhang, J.F., He, X.G., Qian, C.N., and Kung, H.F. 2011. Proteomic profiling between CNE-2 and its strongly metastatic subclone S-18 and functional characterization of HSP27 in metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Proteomics* 11:2911-2920.
279. Parcellier, A., Schmitt, E., Brunet, M., Hammann, A., Solary, E., and Garrido, C. 2005. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxid Redox Signal* 7:404-413.

280. Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P., and Solary, E. 1998. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res* 58:5495-5499.
281. Choi, D.H., Ha, J.S., Lee, W.H., Song, J.K., Kim, G.Y., Park, J.H., Cha, H.J., Lee, B.J., and Park, J.W. 2007. Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells. *FEBS Lett* 581:1649-1656.
282. Zhuang, H., Jiang, W., Cheng, W., Qian, K., Dong, W., Cao, L., Huang, Q., Li, S., Dou, F., Chiu, J.F., et al. 2010. Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis. *Lung Cancer* 68:27-38.
283. Korfeij, M., Schmitt, S., Ruppert, C., Henneke, I., Markart, P., Loeh, B., Mahavadi, P., Wygrecka, M., Klepetko, W., Fink, L., et al. 2011. Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *J Proteome Res* 10:2185-2205.
284. Chilosi, M., Zamo, A., Doglioni, C., Reghellin, D., Lestani, M., Montagna, L., Pedron, S., Ennas, M.G., Cancellieri, A., Murer, B., et al. 2006. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 7:95.
285. Vargha, R., Bender, T.O., Riesenhuber, A., Endemann, M., Kratochwill, K., and Aufricht, C. 2008. Effects of epithelial-to-mesenchymal transition on acute stress response in human peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 23:3494-3500.
286. Vidyasagar, A., Reese, S., Acun, Z., Hullett, D., and Djamali, A. 2008. HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F707-716.
287. Bhat, S.P., and Nagineni, C.N. 1989. alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158:319-325.
288. Markov, D.I., Pivovarova, A.V., Chernik, I.S., Gusev, N.B., and Levitsky, D.I. 2008. Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation. *FEBS Lett* 582:1407-1412.
289. MacIntyre, D.A., Tyson, E.K., Read, M., Smith, R., Yeo, G., Kwek, K., and Chan, E.C. 2008. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology* 149:245-252.
290. Fu, L., and Liang, J.J. 2003. Enhanced stability of alpha B-crystallin in the presence of small heat shock protein Hsp27. *Biochem Biophys Res Commun* 302:710-714.
291. Nicholl, I.D., and Quinlan, R.A. 1994. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J* 13:945-953.
292. Wisniewski, T., and Goldman, J.E. 1998. Alpha B-crystallin is associated with intermediate filaments in astrocytoma cells. *Neurochem Res* 23:385-392.
293. Launay, N., Goudeau, B., Kato, K., Vicart, P., and Lilienbaum, A. 2006. Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 312:3570-3584.
294. Perng, M.D., Cairns, L., van den, I.P., Prescott, A., Hutcheson, A.M., and Quinlan, R.A. 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci* 112 (Pt 13):2099-2112.
295. Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., et al. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 20:92-95.
296. Goldfarb, L.G., Olive, M., Vicart, P., and Goebel, H.H. 2008. Intermediate filament diseases: desminopathy. *Adv Exp Med Biol* 642:131-164.
297. Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R.K., and Goldman, J.E. 1989. Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 57:71-78.
298. Song, S., Hanson, M.J., Liu, B.F., Chylack, L.T., and Liang, J.J. 2008. Protein-protein interactions between lens vimentin and alphaB-crystallin using FRET acceptor photobleaching. *Mol Vis* 14:1282-1287.

299. Brady, J.P., Garland, D.L., Green, D.E., Tamm, E.R., Giblin, F.J., and Wawrousek, E.F. 2001. AlphaB-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2924-2934.
300. Jehle, S., Rajagopal, P., Bardiaux, B., Markovic, S., Kuhne, R., Stout, J.R., Higman, V.A., Klevit, R.E., van Rossum, B.J., and Oschkinat, H. 2010. Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 17:1037-1042.
301. Bagneris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., and Slingsby, C. 2009. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J Mol Biol* 392:1242-1252.
302. Delbecq, S.P., and Klevit, R.E. 2013. One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin. *FEBS Lett* 587:1073-1080.
303. Aquilina, J.A., Shrestha, S., Morris, A.M., and Ecroyd, H. 2013. Structural and Functional Aspects of Hetero-oligomers Formed by the Small Heat Shock Proteins alphaB-Crystallin and HSP27. *J Biol Chem* 288:13602-13609.
304. Baldwin, A.J., Lioe, H., Robinson, C.V., Kay, L.E., and Benesch, J.L. 2011. alphaB-crystallin polydispersity is a consequence of unbiased quaternary dynamics. *J Mol Biol* 413:297-309.
305. Kamradt, M.C., Chen, F., and Cryns, V.L. 2001. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem* 276:16059-16063.
306. Kamradt, M.C., Lu, M., Werner, M.E., Kwan, T., Chen, F., Strohecker, A., Oshita, S., Wilkinson, J.C., Yu, C., Oliver, P.G., et al. 2005. The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 280:11059-11066.
307. Kamradt, M.C., Chen, F., Sam, S., and Cryns, V.L. 2002. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277:38731-38736.
308. Mao, Y.W., Xiang, H., Wang, J., Korsmeyer, S., Reddan, J., and Li, D.W. 2001. Human bcl-2 gene attenuates the ability of rabbit lens epithelial cells against H₂O₂-induced apoptosis through down-regulation of the alpha B-crystallin gene. *J Biol Chem* 276:43435-43445.
309. Morrison, L.E., Hoover, H.E., Thuerauf, D.J., and Glembotski, C.C. 2003. Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ Res* 92:203-211.
310. Mao, Y.W., Liu, J.P., Xiang, H., and Li, D.W. 2004. 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.
311. Liu, S., Li, J., Tao, Y., and Xiao, X. 2007. Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 354:109-114.
312. Verschuure, P., Croes, Y., van den, I.P.R., Quinlan, R.A., de Jong, W.W., and Boelens, W.C. 2002. Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 34:117-128.
313. Garrido, C. 2002. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ* 9:483-485.
314. Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* 17:7151-7160.
315. Boelens, W.C., Croes, Y., and de Jong, W.W. 2001. Interaction between alphaB-crystallin and the human 20S proteasomal subunit C8/alpha7. *Biochim Biophys Acta* 1544:311-319.
316. den Engelsman, J., Keijsers, V., de Jong, W.W., and Boelens, W.C. 2003. The small heat-shock protein alpha B-crystallin promotes FBX4-dependent ubiquitination. *J Biol Chem* 278:4699-4704.

317. Cherneva, R., Petrov, D., Georgiev, O., Slavova, Y., Toncheva, D., Stamenova, M., and Trifonova, N. 2010. Expression profile of the small heat-shock protein alpha-B-crystallin in operated-on non-small-cell lung cancer patients: clinical implication. *Eur J Cardiothorac Surg* 37:44-50.
318. Cherneva, R.V., Georgiev, O.B., Petrova, D.S., Trifonova, N.L., Stamenova, M., Ivanova, V., and Vlasov, V.I. 2012. The role of small heat-shock protein alphaB-crystalline (HspB5) in COPD pathogenesis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 7:633-640.
319. Lang, A., Schrum, L.W., Schoonhoven, R., Tuvia, S., Solis-Herruzo, J.A., Tsukamoto, H., Brenner, D.A., and Rippe, R.A. 2000. Expression of small heat shock protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1333-1342.
320. van de Bovenkamp, M., Groothuis, G.M., Meijer, D.K., and Olinga, P. 2008. 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.
321. Rezzani, R., Rodella, L., Buffoli, B., Giugno, L., Stacchiotti, A., and Bianchi, R. 2005. Cyclosporine A induces vascular fibrosis and heat shock protein expression in rat. *Int Immunopharmacol* 5:169-176.
322. Yu, A.L., Fuchshofer, R., Birke, M., Priglinger, S.G., Eibl, K.H., Kampik, A., Bloemendal, H., and Welge-Lussen, U. 2007. Hypoxia/reoxygenation and TGF-beta increase alphaB-crystallin expression in human optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res* 84:694-706.
323. Welge-Lussen, U., May, C.A., Eichhorn, M., Bloemendal, H., and Lutjen-Drecoll, E. 1999. AlphaB-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2235-2241.
324. Huang, X.Y., Ke, A.W., Shi, G.M., Zhang, X., Zhang, C., Shi, Y.H., Wang, X.Y., Ding, Z.B., Xiao, Y.S., Yan, J., et al. 2013. alphaB-crystallin complexes with 14-3-3zeta to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*.
325. Datta, A., Scotton, C.J., and Chambers, R.C. 2011. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol* 163:141-172.
326. Raghu, G., Anstrom, K.J., King, T.E., Jr., Lasky, J.A., and Martinez, F.J. 2012. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 366:1968-1977.
327. Di Sario, A., Bendia, E., Svegliati Baroni, G., Ridolfi, F., Casini, A., Ceni, E., Saccomanno, S., Marzioni, M., Trozzi, L., Sterpetti, P., et al. 2002. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J Hepatol* 37:584-591.
328. Hewitson, T.D., Kelynack, K.J., Tait, M.G., Martic, M., Jones, C.L., Margolin, S.B., and Becker, G.J. 2001. Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis. *J Nephrol* 14:453-460.
329. Kakugawa, T., Mukae, H., Hayashi, T., Ishii, H., Abe, K., Fujii, T., Oku, H., Miyazaki, M., Kadota, J., and Kohno, S. 2004. Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 24:57-65.
330. Oku, H., Nakazato, H., Horikawa, T., Tsuruta, Y., and Suzuki, R. 2002. Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha, enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *Eur J Pharmacol* 446:167-176.
331. Choi, K., Lee, K., Ryu, S.W., Im, M., Kook, K.H., and Choi, C. 2012. Pirfenidone inhibits transforming growth factor-beta1-induced fibrogenesis by blocking nuclear translocation of Smads in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Mol Vis* 18:1010-1020.
332. Taniguchi, H., Ebina, M., Kondoh, Y., Ogura, T., Azuma, A., Suga, M., Taguchi, Y., Takahashi, H., Nakata, K., Sato, A., et al. 2010. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 35:821-829.
333. Collard, H.R. 2010. Idiopathic pulmonary fibrosis and pirfenidone. *Eur Respir J* 35:728-729.
334. Noble, P.W., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Glassberg, M.K., Kardatzke, D., King, T.E., Jr., Lancaster, L., Sahn, S.A., Swarcberg, J., et al. 2011. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 377:1760-1769.

335. Montaldo, C., Cannas, E., Ledda, M., Rosetti, L., Congiu, L., and Atzori, L. 2002. Bronchoalveolar glutathione and nitrite/nitrate in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 19:54-58.
336. Behr, J., Degenkolb, B., Krombach, F., and Vogelmeier, C. 2002. Intracellular glutathione and bronchoalveolar cells in fibrosing alveolitis: effects of N-acetylcysteine. *Eur Respir J* 19:906-911.
337. Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J.C., Subramanian, I.M., Martinez, F.J., Toews, G.B., and Thannickal, V.J. 2005. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J* 19:854-856.
338. Behr, J., Maier, K., Degenkolb, B., Krombach, F., and Vogelmeier, C. 1997. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1897-1901.
339. Demedts, M., Behr, J., Buhl, R., Costabel, U., Dekhuijzen, R., Jansen, H.M., MacNee, W., Thomeer, M., Wallaert, B., Laurent, F., et al. 2005. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 353:2229-2242.
340. Higashiyama, H., Yoshimoto, D., Kaise, T., Matsubara, S., Fujiwara, M., Kikkawa, H., Asano, S., and Kinoshita, M. 2007. Inhibition of activin receptor-like kinase 5 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Mol Pathol* 83:39-46.
341. Horan, G.S., Wood, S., Ona, V., Li, D.J., Lukashev, M.E., Weinreb, P.H., Simon, K.J., Hahm, K., Allaire, N.E., Rinaldi, N.J., et al. 2008. Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 177:56-65.
342. Rice, W.R., Conkright, J.J., Na, C.L., Ikegami, M., Shannon, J.M., and Weaver, T.E. 2002. Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L256-264.
343. Bonniaud, P., Martin, G., Margetts, P.J., Ask, K., Robertson, J., Gauldie, J., and Kolb, M. 2004. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis-resistant" BALB/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:510-516.
344. Janssen, L.J., Farkas, L., Rahman, T., and Kolb, M.R. 2009. ATP stimulates Ca(2+)-waves and gene expression in cultured human pulmonary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2477-2484.
345. Samarakoon, R., Chitnis, S.S., Higgins, S.P., Higgins, C.E., Krepinsky, J.C., and Higgins, P.J. 2011. Redox-induced Src kinase and caveolin-1 signaling in TGF-beta1-initiated SMAD2/3 activation and PAI-1 expression. *PLoS One* 6:e22896.
346. Samarakoon, R., and Higgins, P.J. 2008. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 100:976-983.
347. Heldin, C.H., and Moustakas, A. 2012. Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res* 347:21-36.
348. Yao, X., Chen, X., Cottonham, C., and Xu, L. 2008. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. *J Biol Chem* 283:22867-22874.
349. Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. 2000. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* 1:176-182.
350. Holt, P.F. 1983. Translocation of inhaled dust to the pleura. *Environ Res* 31:212-220.
351. Cisneros-Lira, J., Gaxiola, M., Ramos, C., Selman, M., and Pardo, A. 2003. Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L949-956.
352. Alcorn, J.F., van der Velden, J., Brown, A.L., McElhinney, B., Irvin, C.G., and Janssen-Heininger, Y.M. 2009. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for the development of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:422-432.
353. Martin, M.M., Buckenberger, J.A., Jiang, J., Malana, G.E., Knoell, D.L., Feldman, D.S., and Elton, T.S. 2007. TGF-beta1 stimulates human AT1 receptor expression in lung fibroblasts by

- cross talk between the Smad, p38 MAPK, JNK, and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L790-799.
354. Yoshida, K., Kuwano, K., Hagimoto, N., Watanabe, K., Matsuba, T., Fujita, M., Inoshima, I., and Hara, N. 2002. MAP kinase activation and apoptosis in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 198:388-396.
 355. Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunnicardi, F.C., and Feng, X.H. 2003. SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 278:31043-31048.
 356. Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., and Piccolo, S. 2005. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121:87-99.
 357. Morsut, L., Yan, K.P., Enzo, E., Aragona, M., Soligo, S.M., Wendling, O., Mark, M., Khetchoumian, K., Bressan, G., Chambon, P., et al. 2010. Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. *Development* 137:2571-2578.
 358. Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A.P., Gillet, G., Mikaelian, I., et al. 2011. Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 12:665-672.
 359. Aki, T., Yoshida, K., and Mizukami, Y. 2003. The mechanism of alphaB-crystallin gene expression by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 311:162-167.
 360. Singh, B.N., Rao, K.S., and Rao Ch, M. 2010. Ubiquitin-proteasome-mediated degradation and synthesis of MyoD is modulated by alphaB-crystallin, a small heat shock protein, during muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1803:288-299.
 361. Collard, H.R., and King, T.E., Jr. 2001. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the rise and fall of corticosteroids. *Am J Med* 110:326-328.
 362. Sime, P.J., Marr, R.A., Gauldie, D., Xing, Z., Hewlett, B.R., Graham, F.L., and Gauldie, J. 1998. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol* 153:825-832.
 363. Bonniaud, P., Margetts, P.J., Ask, K., Flanders, K., Gauldie, J., and Kolb, M. 2005. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 175:5390-5395.
 364. Doerner, A.M., and Zuraw, B.L. 2009. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* 10:100.
 365. Chaudhuri, V., Zhou, L., and Karasek, M. 2007. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis. *J Cutan Pathol* 34:146-153.
 366. Takahashi, K., Kubo, T., Goomer, R.S., Amiel, D., Kobayashi, K., Imanishi, J., Teshima, R., and Hirasawa, Y. 1997. Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 5:321-329.
 367. Kampinga, H.H., and Garrido, C. 2012. HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1706-1710.
 368. Christians, E.S., Ishiwata, T., and Benjamin, I.J. 2012. Small heat shock proteins in redox metabolism: implications for cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1632-1645.
 369. Hisatomi, K., Mukae, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Kakugawa, T., Hara, S., Fujita, H., Nakamichi, S., Oku, H., Urata, Y., et al. 2012. Pirfenidone inhibits TGF-beta1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm Med* 12:24.

ANNEXES

Annexes

Liste des Annexes :

1- Curriculum vitae

Pierre-Simon BELLAYE
47, rue Hoche, 21000 Dijon France
Phone: +33 (0)6.45.82.38.55

ps.bellaye@hotmail.fr
02/04/1987

Field of research

Pulmonary diseases domain using *in vivo* and *in vitro* approaches based on cell and molecular biology

Education

- 2010-2013 **PhD** in Biochemistry, Cellular and Molecular Biology. Burgundy university, Dijon, France
- 2009-2010 **MRes** in Biochemistry , cellular and molecular Biology, with honors. Burgundy University, Dijon, France
- 2008-2009 **MSc** in Biochemistry, with honors. Stockholm university, Stockholm, Sweden
- 2005-2008 **BSc** in Biochemistry, with Honors. Burgundy University, Dijon, France

Work experiences

- 10/2010-present **PhD, INSERM U866** « Lipids, Nutrition, Cancer », Dijon, France
- Role of Heat Shock Protein α B-crystallin in the smad-dependent TGF- β 1 and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) processes leading to pleura-pulmonary fibrosis.
 - Characterisation of several pulmonary fibrosis models induced by divers agents (Bleomycin, AdTGF- β 1, AdIL1 β) in α B-crystallin null mice.
 - Development and characterization of a new animal model of pleural fibrosis by administration of adenoviruses encoding AdTGF- β 1 in mice.
- 2009-2010 (6 months) **INSERM U866** « Lipids, Nutrition, Cancer », Dijon, France
- Developpement of a bleomycine-induced pulmonary fibrosis model in α B-crystallin null mice

Technical skills

- In vivo work** Intra-tracheal, Intra-pleural, Intravenous, Intra-peritoneal and subcutaneous injection on mice, dissection and organ recovery.
- In vitro work** Cell culture (primary lung fibroblasts, pleural mesothelial cells and lung epithelial cells and established cell lines), transfections (plasmids, siRNA, antisens oligonucleotids), RT-PCR, Q-PCR, induction of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Immunofluorescence, Western blot, Co-immunoprecipitation, Immunohistofluorescence, Immunohistochemistry, ELISA, flux cytometry, primer design.

Other skills

Language French: Mother tongue **English: Fluent** German: Basic knowledge
Animal experimentation certificate (level1), (Dijon, EPHE, 2013)
Student training (PhD students, Master students)

Scientific publication

Original articles:

- [Bellaye PS](#), Wettstein G, Burgy O, Causse S, Joannes A, Marchal-Somme J, Crestani B, Kolb M, Gaudie J, Camus P, Garrido C, and Bonniaud P. The small Heat Shock Protein α B-crystallin is a key player for Smad4's nuclear localisation: impact on pulmonary fibrosis. Ongoing revisions for the "Journal of pathology" before resubmission.
- Wettstein G, Decologne N, [Bellaye P-S](#), Kenani A, Brahim S, Bettaieb A, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. Deglycosylated bleomycin, While keeping bleomycin's antitumor activity, is devoid of its strong pulmonary toxicity. Ongoing revisions for the "Journal of experimental medicine" before resubmission.
- Jego G, Lanneau D, De Thonel A, Hazoumé A, [Bellaye P-S](#), Wettstein G, Jacquel A, Hamman A, Duplomb L, Le Mouël A, Lallemand-Mezger V, Christian E, Bonniaud P, Droin N, Solary E and Garrido C. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. Under revision (Blood)
- Wettstein G, [Bellaye P-S](#), Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, Marchal-Somme J, Hazoume A, Gaudie J, Gunther A, Micheau O, Gleave M, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. Inhibition of hsp27 blocks fibrosis development and emt features by promoting snail degradation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013;27:1549-1560.

Reviews:

- Wettstein G, [Bellaye PS](#), Micheau O, Bonniaud P. Small heat shock proteins and cytoskeleton, from physiology to pathology. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2012 Oct; 44(10):1680-6

Scientific communication

Oral presentation:

- J2R (*Respiratory research days*), 21-22 october 2011, Toulouse, France.
- J2R (*Respiratory research days*), 15-16 october 2010, Nantes, France.

Poster présentation

- *International Colloquium on Lung and Airways Fibrosis (ICLAF)*, September 29-October 3, 2012, Modena, Italy
- *Lung Science Conference (ERS)*, march 30 - april 3, 2012, Estoril, Portugal
- *ERS (European respiratory Society) conference*, 24-28 september 2011 Amsterdam, Nederland
- *ERS (European respiratory Society) conference*, 18-22 september 2010, Barcelona, Spain
- J2R (*Respiratory research days*), 19-20 october 2012, Lille; 21-22 october 2011, Toulouse; 15-16 october 2010, Nantes.

Hobbies

Travelling, Sport : Badminton, Karate, ski

References

Pr Philippe Bonniaud, PhD advisor, Inserm U866, Dijon, France philippe.bonnaud@chu-dijon.fr
Dr Carmen Garrido, Team Leader, Inserm U866, Dijon, France cgarrido@u-bourgogne.fr
Dr Laurent Lagrost, Lab head, Inserm U866, Dijon, France laurent.lagrost@u-bourgogne.fr

2- Autres publication et articles didactiques

a- Articles en préparation

- Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, Besnard V, Joannes A, Colas J, Causse S, Marchal-Somme J, Crestani B, Kolb M, Gauldie J, Camus P, Garrido C and Bonniaud P. The small heat shock protein α B-crystallin is essential for Smad4's nuclear localisation: impact on pulmonary fibrosis. (En resoumission après révision au "Journal of pathology").
- Bellaye PS, Burgy O, Colas J, Wettstein G, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. The lack of the small heat shock protein α B-crystallin hampers pleural fibrosis by blocking TGF- β 1 signalling.
- Bellaye Pierre-Simon, Burgy Olivier, Causse Sébastien, Garrido Carmen, Bonniaud Philippe. Heat shock proteins and fibrosis: good or evil? (Revue).

The small heat shock protein α B-crystallin is essential for Smad4's nuclear localisation: impact on pulmonary fibrosis

Running title: α B-crystallin modulates Smad4 localisation

Pierre-Simon Bellaye^{1,2}, Guillaume Wettstein^{1,2}, Olivier Burgy^{1,2}, Valérie Besnard³, Audrey Joannes³, Julien Colas^{1,2}, Sébastien Causse^{1,2}, Joëlle Marchal-Somme³, Bruno Crestani^{3,4,5}, Martin Kolb⁶, Jack Gauldie⁶, Philippe Camus^{1,2,7}, Carmen Garrido^{1,2,*} and Philippe Bonniaud^{1,2,7*}.

¹ INSERM U866 équipe labellisée Ligue contre le cancer, 21000 Dijon, France, ² Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France, ³ INSERM U700, 75000 Paris, France, ⁴ Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, 75000 Paris, France, ⁵ Faculté de médecine Bichat, Paris APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, 75000 Paris, France, ⁶ Center for Gene Therapeutics, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, ⁷ Service de Pneumologie, CHU Dijon 21079, Dijon, France.

* Equal contribution to the work

Corresponding author:

Philippe Bonniaud, MD, PhD, Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, CHU le bocage 21079 Dijon. Tél : +33 3 80 29 32 63. E-mail : philippe.bonniaud@chu-dijon.fr

Conflict of interest statement:

All authors confirm they have no conflict of interests to declare

Word count: 3867

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease characterized by the proliferation of myofibroblasts and extracellular-matrix (ECM) accumulation in lungs. TGF- β 1 is the major pro-fibrotic cytokine involved in IPF and is responsible for myofibroblast proliferation and differentiation and ECM synthesis. α B-crystallin is constitutively expressed in the lungs and is inducible by stress, acts as a chaperon and is known to have a role in cell cytoskeleton architecture homeostasis. The role of α B-crystallin in fibrogenesis remains unknown. The principal signalling pathway involved in this process is the Smad-dependant pathway. We demonstrate here that α B-crystallin is strongly expressed in fibrotic lung tissue from IPF patients and *in vivo* rodent models of pulmonary fibrosis. We also show that α B-crystallin deficient mice are protected from bleomycin-induced fibrosis. Similar protection from fibrosis was observed in α B-crystallin KO mice after transient IL-1 β or TGF- β 1 adenoviral mediated overexpression. We show *in vitro* in primary epithelial cells and fibroblasts that α B-crystallin increases Smad4's nuclear localisation, therefore enhancing the TGF- β 1/Smad pathway and the consequent activation of TGF- β 1 downstream genes. α B-crystallin overexpression disrupts Smad4 mono-ubiquitination by interacting with its E3-ubiquitin ligase, TIF1 γ , thus limiting its nuclear export. Conversely, in the absence of α B-crystallin, TIF-1 γ can freely interact with Smad4. Consequently, Smad4 mono-ubiquitination and nuclear export are favoured and thus the TGF- β 1/Smad4 pro-fibrotic activity is inhibited.

In conclusion our work demonstrates that α B-crystallin may be a key target for the development of specific drugs in the treatment of IPF or other fibrotic diseases.

Key words: Fibrogenesis, Inflammation, TGF- β 1, Heat shock proteins

Introduction

Diseases involving chronic fibrotic changes in the lung structure such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are challenging clinical problems. IPF is a rare pathology with unknown origins characterized by a rapid evolution leading to respiratory failure and death with a median survival expectancy of three years with no efficient therapy to prevent or reverse it (1). The development of IPF is classically viewed as an abnormal alveolar repair and interactions between fibroblasts and alveolar cells are key components in this process. Myofibroblasts are assembled in specific regions called myofibroblastic foci and are the main components responsible for the tissue remodeling occurring during this repair, causing strong extracellular matrix (ECM) accumulation. The anti-cancerous drug bleomycin is known to induce lung fibrosis in humans as a side effect and is widely used for experimental pulmonary fibrosis induction in animals (2, 3).

TGF- β 1 is a key cytokine involved in the process of fibrogenesis, and plays a pivotal role during fibrosis in many different organ systems. TGF- β 1 causes myofibroblast proliferation and differentiation, increasing ECM components synthesis (4). It has been shown that adenoviral vector-mediated gene transfer of active TGF- β 1 (AdTGF- β 1223/225) in rodent lungs leads to progressive and severe fibrosis (5). Moreover, TGF- β 1 induces the transformation of alveolar epithelial cells into cells with a myofibroblastic phenotype, a controversial process called Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT, (6, 7)).

Among Heat Shock Proteins (HSP), α B-crystallin (HSPB5) belongs to the small Heat Shock Proteins family (sHSP) that have been demonstrated to be involved in kidney, vascular and pleuro-pulmonary fibrosis (8-10). α B-crystallin is highly inducible by several stresses and its expression is enhanced by TGF- β 1 (11, 12). This sHSP is constitutively expressed in tissues with high rates of oxidative metabolism, including skeletal muscle fibers, kidney, heart and lung (13). α B-crystallin binds to and stabilizes microtubules and has a major role in cytoskeletal homeostasis. The interactions with

desmin and actin suggest that α B-crystallin may be of great importance in the cytoskeletal architecture of fibroblast and myofibroblasts during the process of fibrogenesis (14).

These reasons led us to investigate the role of α B-crystallin on pulmonary fibrosis. We demonstrate for the first time that α B-crystallin is overexpressed in fibrotic lung tissue and provide evidence that the lack of α B-crystallin has a protective effect on pulmonary fibrogenesis *in vivo*. *In vitro*, we highlight a mechanism by which α B-crystallin favors the TGF- β 1 pathway via its role on the modulation of Smad4's cellular localisation.

Materiel and methods

Human tissue samples

Lung tissue samples were obtained by open lung biopsy (INSERM U700, Paris). IPF were diagnosed according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society consensus criteria (1), including clinical, radiographic, and characteristic histopathologic features (n = 6). Control non IPF lung tissue samples were obtained from smokers who underwent thoracic surgery for localized primary lung carcinoma (n = 4). The local ethics committee (comité de protection des personnes, Ile de France 1) approved the study, and patients gave their informed consent before lung surgery.

Paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded sections of human lung tissue were pretreated in citrate buffer pH6 for 40 minutes for antigen retrieval. Sections were then incubated with 1B6.1-3G4 anti- α B-crystallin monoclonal antibody (Enzo Life Sciences) and positive cells were revealed using the Vectastain ABC-alkaline phosphatase kit system (Vector Laboratories).

Animal procedures

SV129 Wild-Type (WT) mice (Charles River, Saint Germain-sur-l'Arbresle, France) and SV129 Knock-Out (KO) mice for the α B-crystallin gene were housed in pathogen-free conditions. Mouse food and water were provided *ad libitum*. The animals were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France). All experiments were approved by the Comité d'Ethique de l'Université de Bourgogne (Bourgogne, France). Intratracheal instillation of bleomycin (blenoxane; Bristol-Myers-Squibb, Montreal, QC, Canada) was performed as previously described (15). AdTGF- β 1 ($5 \cdot 10^8$ PFU/mouse) and AdIL1- β ($5 \cdot 10^8$ PFU/mouse) were instilled following the same protocole. Bleomycin, AdTGF- β 1 and AdIL1- β were diluted in 50mL of 0.9% NaCl. Mice were euthanized by abdominal aortic bleeding at day 7 or 21 after administration. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was gathered as previously described (16).

Collagen quantification

Histomorphometric assay - The amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was quantified by staining with Picrosirius Red as previously described (4, 17).

Sircol assay - The sircol assay was performed on whole lung extract of the left lobe using a “Sircol kit” (Biocolor LTD., Northern Ireland, UK) following the manufacturer’s recommendations.

TGF- β 1 quantification (ELISA)

Total human and mouse TGF- β 1 from BALFs was determined using ELISA (R&D Systems, Lille, France), performed according to the recommendations of the manufacturer.

Primary cell culture

Mouse alveolar type II cells were isolated as described previously (18) and cultured on Matrigel (BD Biosciences) in BEGM (Lonza, France) supplemented with 50 units of penicillin per milliliter, 50 μ g of streptomycin per milliliter, and 5% fetal bovine serum.

Mouse fibroblasts were isolated as described previously (19, 20) and cultures in DMEM + 10% serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin.

RNA interference and transfection

α B-crystallin RNA interference - α B-crystallin siRNA was purchased from applied biosystem (Courtaboeuf, France). The sense and antisense sequences were respectively: 5’ AGUCUUGUGACUAGUGCUG-tt-3’ and 5’CAGCACUAGUCAVAAGACU-tt-3’. SiRNAs (50 nM) were transfected using INTERFERin (polyplus, Illkirch, France) following the manufacturer’s recommendations.

α B-crystallin transfection - to overexpress α B-crystallin, a pcDNA6 plasmid encoding human α B-crystallin was used. Transfections were performed using Nanojuice transfection reagent (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) following the manufacturer’s recommendations.

Cell fractionation

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction kit (Pierce - thermo scientific, Rockford, IL) was used for cell fractionation following the manufacturer's recommendations. Leptomycin B (Invivogen, San Diego, USA) was used to inhibit nuclear export at a concentration of 20 ng/ml for 1hour.

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation experiments were performed using the Exactacruz™ kit (Santa-Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelyne, France) following the manufacturer's recommendations.

Antibodies: αB-crystallin (mouse clone 1B6.1-3G4, enzo life science), TIF1γ (Mouse clone 16G9, abcam), Ubiquitin (mouse clone P4D1, santa cruz biotechnology), Smad4 (rabbit clone H-552, santa cruz biotechnology).

q-PCR analysis

Total RNA from cells was extracted using TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription was performed on the total RNA using the M-MLV kit (Promega, Charbonnieres, France). Quantitative RT-PCR was performed on the cDNA using SYBR green master mix (Promega).

Immunofluorescence

Cells were fixed with paraformaldehyde (4% PFA for 10 min) and permeated with a PBS-Triton (0.1%, 5 min) solution. After saturation of nonspecific sites with BSA (5%, 20 min), cells were incubated with primary antibodies overnight in a humidified chamber at 4°C. Cells were stained for Smad4 (rabbit clone EP618Y, Abcam). Goat anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor 594 (Molecular Probe, InVitrogen, Cergy Pontoise, France) were used as secondary antibodies at a dilution of 1 : 2000.

Immunohistochemistry

After deparaffination (Xylene) and endogenous peroxidases inhibition (PBS- H₂O₂ 1% 20 min), sections were saturated (BSA 5%) and incubated overnight at 4°C with specific antibodies at a dilution of 1 : 250 for the detection of α B-crystallin (Enzo life science). HRP-conjugated goat anti-rabbit, (Jackson immunoresearch laboratories, Suffolk, UK) was used as the secondary antibody (1:250, 45 min).

Statistical analysis

Comparison between different groups was performed using the non parametric Mann-Whitney test implemented in the statview software. *P* values below 0.05 were considered as statistically significant.

Results

α B-crystallin is upregulated during lung fibrosis in vivo

Histological examination of IPF lungs from patients showed that α B-crystallin is abundant in fibrotic areas (Figure 1A). Hyperplastic epithelial cells located around the fibroblastic foci strongly expressed α B-crystallin (Figure 1A). We also found that myofibroblasts within the foci expressed this sHSP. In contrast, α B-crystallin was barely detected in lung parenchyma from non-IPF patients. To confirm this observation we used different rodent lung fibrosis models.

Intra-tracheal administration of bleomycin in mice is a classical animal model of fibrosis that reproduces the acute lung injury found in patients. We observed that in parallel of fibrosis formation, bleomycin intra-tracheal administration in mice induced a significant increase in α B-crystallin expression (Figure 1B). Rats that received an adenovirus encoding for TGF- β 1 (AdTGF- β 1) by intrapleural or intratracheal injection developed, as previously published, parenchymal fibrosis (5, 19). Immunohistochemistry of pulmonary tissue (Figure 1C) showed that α B-crystallin was strongly expressed in animals that have been subjected to AdTGF- β 1. In contrast, hardly any expression of α B-crystallin was observed in the control animals that received an empty adenovirus (AdDL) and that did not develop fibrosis.

The lack of α B-crystallin does not alter lung morphology in aging mice

Brady *et al.* described that α B-crystallin KO mice presented minor eye lens troubles and major skeletal muscle issues during aging (21). However, even though α B-crystallin is highly expressed in the heart (13), these mice had a normal heart structure throughout their life. In this study, we have investigated the lung architecture in aging α B-crystallin KO mice. We first confirmed that mice KO for α B-crystallin did not express the protein neither in heart nor lung tissues whereas wild type animals did (Figure 2A). Histological examination of the lungs from aging α B-crystallin KO mice did not reveal evidence of morphological changes, including lung fibrosis or emphysema, compared to WT mice at 8, 16 and 48 weeks of age (Supplemental Figure S1A). Using a Sircol assay we did not find any

significant differences in collagen quantification performed on lung tissue lysates between aging WT and KO mice. In both cases the total amount of collagen increased similarly with age, as expected (Supplemental Figure S1B). We found similar results with a histomorphometric measurement of collagen based on picrosirius red staining (Supplemental Figure S1B). From those experiments we concluded that the lack of α B-crystallin did not spontaneously affect lung structure in aging mice.

The lack of α B-crystallin hampers bleomycin-induced lung fibrosis

Lung sections from α B-crystallin KO and WT mice showed that the lack of α B-crystallin protected mice from bleomycin-induced fibrosis (Figure 2B). 21 days after bleomycin injection, WT mice developed, as expected, a severe fibrosis characterised by an important accumulation of collagen throughout the lung whereas fibrosis in α B-crystallin KO mice was much more limited. Using a Sircol assay we found that after bleomycin treatment, the amount of collagen increased by 3 fold in WT mice whereas it increased only by 1.3 fold in KO mice (Figure 2C). This result was confirmed by a second method of collagen quantification (histomorphometric measurement of picrosirius red staining on lung sections) which allowed us to demonstrate that the amount of collagen increased by 5 fold in WT mice whereas an increase of only 2 fold was observed in KO mice, compared to their respective controls (Figure 2C). HSP47 is a well-characterized chaperone of collagen, known to be highly expressed during pulmonary fibrotic processes (22, 23). Interestingly, the increase in HSP47 induced by bleomycin was much lower in KO compared to WT mice at day 21 (Figure 2D).

Furthermore, we observed using an ELISA assay that the level of TGF- β 1 in the BALF from WT mice was significantly increased 21 days after bleomycin administration, in accordance with previous studies (24, 25). Interestingly, this TGF- β 1 upregulation was significantly lower (2 fold) in KO mice (Figure 2E). We hypothesize that this deficit in bleomycin-induced TGF- β 1 expression was linked to the reduced fibrosis observed in the absence of α B-crystallin.

α B-crystallin is also involved in pulmonary fibrosis induced by the pro-inflammatory cytokine IL-1 β

We next aimed to confirm the anti-fibrotic effect resulting from the lack of α B-crystallin in KO mice by using another *in vivo* model of pulmonary fibrosis. We examined the lungs from α B-crystallin KO and WT mice in which an adenovirus encoding IL-1 β was injected intratracheally. This well-known model induces a pulmonary fibrosis involving an initial inflammation and subsequent increase in TGF- β 1 expression (26). By collagen quantification using a Sircol assay and histomorphometric measurements we showed that the transient IL-1 β overexpression induced a significantly less severe fibrosis in the lungs from KO compared to WT mice by day 18 (Figure 3A). Furthermore, we demonstrated *in vivo* that the transient IL-1 β overexpression induced an increase in TGF- β 1 expression at the RNA (Figure 3B) and protein level (Figure 3C-D) in the lungs from WT mice. This IL-1 β -induced TGF- β 1 expression was significantly lower in α B-crystallin KO mice (WT: 15 fold increase; KO: 5 fold increase; Figure 3C).

These results suggest that α B-crystallin KO mice had a deficient TGF- β 1 pathway that could protect them against inflammation-induced fibrosis (through AdIL1 β and bleomycin).

α B-crystallin modulates TGF- β 1 signalling pathway in vivo and in vitro.

In order to understand why TGF- β 1-induced fibrosis was impaired in the absence of α B-crystallin, we investigated the role of α B-crystallin on the TGF- β 1 pathway. *In vivo*, we used our murine model based on intratracheal injection of adenoviruses encoding the TGF- β 1 gene into WT and KO mice. An ELISA assay and a rt-PCR analysis of total RNAs from lungs validated our model by showing that both WT and KO mice were able to similarly express the adenovirus encoding human TGF- β 1 (Figure 4A). We then investigated the expression of several TGF- β 1 downstream genes such as PAI-1, procollagen and endogenous TGF- β 1 itself. The lack of α B-crystallin in KO mice disrupted the expression of PAI-1 by 3 fold, procollagen by 20 fold and endogenous TGF- β 1 RNA by 7 fold (Figure 4B), suggesting a direct effect of α B-crystallin in the autoactivation loop of TGF- β 1. Interestingly, in WT mice, the expression of α B-crystallin was significantly increased in the presence of TGF- β 1 (Figure 4B).

Next, we confirmed the role of α B-crystallin on TGF- β 1 downstream genes *in vitro*. As hyperplastic epithelial alveolar cells and fibroblasts appeared to highly overexpress α B-crystallin in the lung from IPF patients (Figure 1A), we drove our experiments on primary type II epithelial cells (AEC II, Figure 5A) and primary fibroblast (Supplemental Figure S2) isolated from WT and KO mice. We also used A549 lung epithelial cells (Figure 5B). In all these cells we found that, as in our *in vivo* experiments, recombinant TGF- β 1 (rTGF- β 1) induced an up-regulation of α B-crystallin and of all TGF- β 1 downstream genes analysed: PAI-1, TGF- β 1, procollagen, Snai2 and α -SMA. However, in α B-crystallin-deleted cells (KO cells or after using RNA interference against α B-crystallin), we found a strong decrease in the expression of all these rTGF- β 1-induced genes (Figure 5 and Supplemental Figure S2). Moreover, the known ability of TGF- β 1 to down-regulate E-cadherin in epithelial cells (27) was also countered by α B-crystallin inhibition (Figure 5B). In accord with these results, an opposite effect was observed when α B-crystallin was overexpressed i.e. PAI-1, TGF- β 1 and α -SMA expression were significantly enhanced as demonstrated at the RNA (Supplemental Figure S3A) and protein level (Supplemental Figure S3B-C).

We conclude from these results that α B-crystallin, in the different cells involved in pulmonary fibrosis (epithelial cells and fibroblasts) is able to favour the TGF- β 1 signalling pathway.

α B-crystallin modulates Smad4's cellular localisation

Since α B-crystallin has a role on the TGF- β 1 pathway, we decided to investigate its role on the main TGF- β 1 signalling pathway, the Smad pathway. The downregulation of α B-crystallin using a specific siRNA had no effect on Smad2, Smad3, Smad4 or Smad7 protein expression 12 hours after rTGF- β 1 treatment in A549 cells (Supplemental Figure S4A). The TGF- β 1 pathway is mediated by a rapid phosphorylation of effective Smads proteins (Smad2 and Smad3). However the downregulation of α B-crystallin using a siRNA did not induce any differences in Smad2 or Smad3 phosphorylation 15 minutes after rTGF- β 1 treatment (Supplemental Figure S4B). Interactions between Smad proteins and α B-crystallin were assessed. Smad4 (Figure 6A) but not Smad3 (Supplemental Figure S4C) was

able to co-immunoprecipitate with α B-crystallin. This interaction, already observed at the basal level, was slightly enhanced after rTGF- β 1 stimulation (Figure 6A).

Dynamic nucleocytoplasmic translocation of Smad4 is essential in managing the nuclear shuttling of other Smads (28). Therefore, we investigated whether α B-crystallin affected the cellular localisation of Smad4. Proteins from the cytosolic and nuclear fractions of A549 cells transfected with either scrambled siRNA or siRNA specific for α B-crystallin and treated with rTGF- β 1 were analyzed separately. Interestingly, 12 hours and 24 hours after rTGF- β 1 treatment, α B-crystallin knockdown led to a significant decrease in nuclear Smad4 that correlated with an increase in cytosolic Smad4 (Figure 6B). On the other hand, transfection-induced overexpression of α B-crystallin favoured the nuclear localisation of Smad4 (Figure 6C) and thereby its transcriptional activity as demonstrated using a reporter gene assay (Supplemental Figure S5). The impact of α B-crystallin on Smad4 localisation was confirmed using immunofluorescence (Figure 6D).

As in α B-crystallin-depleted cells Smad4 disappeared from the nucleus to accumulate into the cytosol, we hypothesized that the absence of α B-crystallin could promote Smad4 nuclear export.

In accordance with our hypothesis, western blotting analysis revealed no changes in the level of Importin β , the protein responsible for nuclear import of Smad4 (29), after α B-crystallin downregulation using a siRNA (Supplemental Figure S6). In contrast, when the exportin1/CRM1-mediated Smad4 export (30, 31) was inhibited with leptomycin B (LMB), Smad4 nuclear content was restored in α B-crystallin depleted-cells (Fig 6D-E). Interestingly, similar results were observed in primary fibroblasts where Smad4 was found in the nuclei of WT fibroblasts but was only barely detectable in the nuclei of α B-crystallin KO fibroblasts (Supplemental figure S7); LMB treatment restored the nuclear localisation of Smad4 in fibroblasts lacking α B-crystallin. These results strongly suggest that α B-crystallin downregulation decreases the nuclear levels of Smad4 by enhancing its nuclear export.

α B-crystallin regulates Smad4 mono-ubiquitination via TIF1 γ .

The cytosolic translocation of Smad4 is driven by its mono-ubiquitination. In the nucleus, the E3 ubiquitin ligase, TIF1 γ , interacts with and mono-ubiquitinates Smad4, separating it from Smad2 and Smad3 and promoting Smad4 nuclear export.

By co-immunoprecipitation we demonstrated that α B-crystallin interacts with TIF1 γ in the presence of rTGF- β 1 (Figure 7A). In contrast, no interaction was found between α B-crystallin and the Smad4 deubiquitinase, FAM/USP9x (Figure 7A).

Treatment with rTGF- β 1 inhibited Smad4 mono-ubiquitination in control A549 cells but not in α B-crystallin depleted A549 cells (Figure 7B); in line with our previous results showing that α B-crystallin knockdown increased the nuclear export of Smad4. Moreover, the interaction between Smad4 and TIF1 γ in the nucleus was reduced in the context of an α B-crystallin overexpression (Figure 7C). We therefore hypothesize that α B-crystallin interacts with TIF1 γ and blocks Smad4-TIF1 γ association and the subsequent transfer of ubiquitin to Smad4.

We next performed immunofluorescent Smad4 staining on lung sections from WT and KO mice that received bleomycin to assess Smad4 cellular localisation *in vivo* in the presence or absence of α B-crystallin. In the lung of WT mice that exhibited severe pulmonary fibrosis, Smad4 was mainly present in the nuclei. On the contrary, in the lungs of α B-crystallin KO mice, where fibrosis was strongly reduced, Smad4 location was mostly limited to the cytoplasm (Figure 7D).

Altogether, we conclude that α B-crystallin binds to Smad4 and TIF-1 and physically interferes with the transfer of ubiquitin. In the absence of α B-crystallin, TIF-1 γ is able to ubiquitinate Smad4, thereby allowing its nuclear export and thus inhibiting the pro-fibrotic activity of Smad4.

Discussion

TGF- β 1 is considered as the most potent pro-fibrotic growth factor. In this study we identified the small heat shock protein α B-crystallin as a new player in pulmonary fibrosis through its role on the TGF- β /Smad pathway and, more specifically, on the cellular localisation of Smad4 (Figure 8). The lack of α B-crystallin impaired TGF- β 1 pathway by decreasing the nuclear localisation of Smad4 and therefore Smad4 activity. In addition, fibrosis development was strongly reduced in α B-crystallin KO mice in our different models of fibrosis induction. We demonstrate for the first time that α B-crystallin is overexpressed in hyperplastic alveolar epithelial cells and also within fibroblastic foci in lungs from IPF patients. We also show that α B-crystallin is upregulated during fibrogenesis using three well known *in vivo* animal models of PF (bleomycin, AdTGF- β 1 and AdIL-1 β).

The fact that TGF- β 1-induced expression of α -SMA, Snai2 (the transcription factor enhancing EMT) and TGF- β 1 were strongly reduced in AECII from α B-crystallin KO mice suggest that α B-crystallin depletion limits the process of EMT thereby decreasing the pool of myofibroblast in fibrotic lungs.

Smad4 is rapidly and constantly shuttling between the nuclear and cytoplasmic compartments, depending on the activation of nuclear import and export signals (30, 31). The inhibition of nuclear translocation of Smad4 results in an inactivation of the TGF- β 1 pathway and disruption of expression of TGF- β 1 responsive genes including TGF- β 1 itself (32). Nuclear export of Smad4 is regulated by its mono-ubiquitination by the ubiquitine-ligase TIF1 γ (33). In the cytoplasm, Smad4 is in a deubiquitinated form, and can bind to Smad2-3 and translocate into the nucleus. In the nucleus, Smad4 is modified by mono-ubiquitination, it thereby dissociates from Smad2-3 and returns to the cytosol (Figure 8). TIF1 γ has recently been shown to be a negative regulator of Smad4 activity during the EMT process induced by TGF- β 1 (34) in mammary epithelial cells. We demonstrate here that α B-crystallin overexpression disturbs the interaction between TIF1 γ and Smad4. We hypothesize that during the process of fibrogenesis TIF1 γ -Smad4 interaction is decreased by the abundance of α B-crystallin thus inhibiting Smad4 monoubiquitination and the subsequent nuclear export. The lack of α B-crystallin enhances TIF1 γ and Smad4 interaction and the subsequent Smad4 mono-ubiquitination

and nuclear export thereby decreasing the deleterious pro-fibrotic effects of TGF- β 1 (Figure 8). We therefore propose that the chaperone α B-crystallin through its association to both Smad4 and TIF1 γ physically blocks Smad4/TIF1 γ interaction and thus the transfer of ubiquitin.

α B-crystallin is also known for its anti-apoptotic properties and apoptosis may be involved in fibrogenesis as it is known that bleomycin induces apoptosis in mice lungs. However, we did not find any difference in the amount of apoptosis found in the lungs of α B-crystallin KO and WT treated mice (Supplemental Figure S8).

The role of inflammation in the progression of pulmonary fibrosis remains a controversial issue (35, 36). Anti-inflammatory therapies have no impact in IPF progression despite the fact that inflammatory events are present during the disease's development (26, 37, 38). IL-1 β has been shown to be involved in myofibroblast formation through activation of TGF- β 1 (39, 40). In the present study we confirm that IL-1 β -induced fibrosis is associated with TGF- β 1 upregulation in control mice, but not in α B-crystallin KO mice. We show in our *in vitro* and *in vivo* models that α B-crystallin is upregulated in inflammatory conditions and that this α B-crystallin overexpression increases Smad4 activity.

Today, there are very few relatively efficient drugs in the treatment of IPF. On-going clinical trials include the anti-oxidant N-acetylcysteine (NAC), which increases cell resistance to oxidative injuries and therefore may have a beneficial effect in fibrotic lung disease. Indeed, oxidative stress is involved in the pathogenesis of pulmonary fibrosis and is deleterious for alveolar epithelial cells. Interestingly, it has been shown in different models that α B-crystallin expression correlates with the levels of reactive oxygen species, nitric oxide and lipid peroxidation (41, 42). We believe that the oxidative stress in IPF lungs could be a stimulus of α B-crystallin expression that in turn contributes to the activation of the profibrotic TGF- β and Smad pathways.

Pirfenidone is another molecule tested in clinical trials reported to inhibit the progression of fibrosis in animal models and in IPF patients. Although the exact mechanism(s) by which pirfenidone might interfere with fibrosis in the lungs remains unclear, it has been reported to have a combined anti-

inflammatory and anti-oxidative action. This small compound is also able to inhibit TGF- β 1 and HSP47 expression (43, 44). Interestingly, it has recently been shown in retinal epithelial cells that pirfenidone inhibits TGF- β 1 induced fibrogenesis by blocking the nuclear translocation of Smads (45). Whether α B-crystallin might be involved in the anti-fibrotic effect of pirfenidone has yet to be determined.

In conclusion, the present work demonstrates that α B-crystallin may be a key target for the development of specific drugs in the treatment of IPF or other fibrotic diseases.

Aknowledgement

We thank V. San Giorgio and all the team from the animal quarter and A. Bouchot and all the team from Cellimap for their invaluable and professional help.

The research leading to these results has received funding from the European Community 7th Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement HEALTH-F2-2007- 202224 eurIPFnet, the FEDER, Agence Nationale de la Recherche Blanc 11-BSV-011-01 meso-IPF and La Ligue Régionale Grand Est Contre le Cancer. PS. B and G. W are supported by the EU 7th Framework Programme (2007–2013 agreement HEALTH-F2-2007-202224 eurIPFnet.). G. W is supported by le Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire". O. B is supported by le Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire" (FRSR). C.G. team has the label from La Ligue National Contre le Cancer and LabEx LipSTIC.

Author contributions: P-S.B. designed the study, performed the experiments and data analyses and prepared the manuscript. G.W., O.B., V.B., A.J. and J.M-S performed the experiments. J.C., S.C. B.C., M.K., J.G. and P.C. revisited the draft of the article for important intellectual content. C.G. and P.B. designed the study and provided critical revision of the manuscript. C.G. and P.B. equally contributed to this work.

List of online supporting information

- Supplemental methods and supplemental figure legends
- Supplemental figure S1: *The lack of α B-crystallin does not alter lung morphology in aging mice*
- Supplemental figure S2: *α B-crystallin also modulates fibroblasts functions.*
- Supplemental figure S3: *α B-crystallin modulates myofibroblast phenotype markers in epithelial cells.*
- Supplemental figure S4: *α B-crystallin downregulation did not act on Smads expression nor phosphorylation.*
- Supplemental figure S5: *α B-crystallin enhances Smad4 transcriptional activity*
- Supplemental figure S6: *α B-crystallin downregulation did not affect Imp8 protein level.*
- Supplemental figure S7: *α B-crystallin deficiency alters Smad4 nuclear localisation in primary fibroblasts*
- Supplemental figure S8: *Bleomycin-induced apoptosis is not limited by the absence of α B-crystallin.*

References

1. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; **183**: 788-824.
2. Camus PH, Foucher P, Bonniaud PH, *et al.* Drug-induced infiltrative lung disease. *The European respiratory journal Supplement* 2001; **32**: 93s-100s.
3. Cooper JA, Jr., White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs. *The American review of respiratory disease* 1986; **133**: 321-340.
4. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine* 2000; **342**: 1350-1358.
5. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, *et al.* Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003; **168**: 770-778.
6. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, *et al.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; **103**: 13180-13185.
7. Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; **108**: E1475-1483.
8. Rezzani R, Rodella L, Buffoli B, *et al.* Cyclosporine A induces vascular fibrosis and heat shock protein expression in rat. *International immunopharmacology* 2005; **5**: 169-176.
9. Vidyasagar A, Reese S, Acun Z, *et al.* HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *American journal of physiology Renal physiology* 2008; **295**: F707-716.
10. Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013.
11. Welge-Lussen U, May CA, Eichhorn M, *et al.* AlphaB-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Investigative ophthalmology & visual science* 1999; **40**: 2235-2241.
12. Yu AL, Fuchshofer R, Birke M, *et al.* Hypoxia/reoxygenation and TGF-beta increase alphaB-crystallin expression in human optic nerve head astrocytes. *Experimental eye research* 2007; **84**: 694-706.
13. Bhat SP, Nagineni CN. alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 1989; **158**: 319-325.
14. Iwaki T, Iwaki A, Tateishi J, *et al.* Sense and antisense modification of glial alpha B-crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. *The Journal of cell biology* 1994; **125**: 1385-1393.
15. Decolonne N, Wettstein G, Kolb M, *et al.* Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010; **35**: 176-185.
16. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, *et al.* TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 2005; **175**: 5390-5395.
17. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, *et al.* TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 2007; **179**: 6043-6051.
18. Rice WR, Conkright JJ, Na CL, *et al.* Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002; **283**: L256-264.
19. Bonniaud P, Kolb M, Galt T, *et al.* Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2004; **173**: 2099-2108.

20. Janssen LJ, Farkas L, Rahman T, *et al.* ATP stimulates Ca(2+)-waves and gene expression in cultured human pulmonary fibroblasts. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009; **41**: 2477-2484.
21. Brady JP, Garland DL, Green DE, *et al.* AlphaB-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001; **42**: 2924-2934.
22. Mala JG, Rose C. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life sciences* 2010; **87**: 579-586.
23. Razzaque MS, Hossain MA, Kohno S, *et al.* Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 1998; **432**: 455-460.
24. Santana A, Saxena B, Noble NA, *et al.* Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1995; **13**: 34-44.
25. Phan SH, Gharaee-Kermani M, Wolber F, *et al.* Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *The Journal of clinical investigation* 1991; **87**: 148-154.
26. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, *et al.* Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2001; **107**: 1529-1536.
27. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* 2009; **119**: 1429-1437.
28. Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell and tissue research* 2012; **347**: 21-36.
29. Yao X, Chen X, Cottonham C, *et al.* Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. *The Journal of biological chemistry* 2008; **283**: 22867-22874.
30. Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and cellular biology* 2000; **20**: 9041-9054.
31. Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, *et al.* Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO reports* 2000; **1**: 176-182.
32. Lin X, Liang M, Liang YY, *et al.* SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**: 31043-31048.
33. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, *et al.* Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 2005; **121**: 87-99.
34. Hesling C, Fattet L, Teyre G, *et al.* Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO reports* 2011; **12**: 665-672.
35. Gauldie J. Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; **165**: 1205-1206.
36. Strieter RM. Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; **165**: 1206-1207; discussion 1207-1208.
37. Collard HR, King TE, Jr. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the rise and fall of corticosteroids. *The American journal of medicine* 2001; **110**: 326-328.
38. Sime PJ, Marr RA, Gauldie D, *et al.* Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *The American journal of pathology* 1998; **153**: 825-832.

39. Chaudhuri V, Zhou L, Karasek M. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis. *Journal of cutaneous pathology* 2007; **34**: 146-153.
40. Doerner AM, Zuraw BL. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respiratory research* 2009; **10**: 100.
41. Kampinga HH, Garrido C. HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012; **44**: 1706-1710.
42. Christians ES, Ishiwata T, Benjamin IJ. Small heat shock proteins in redox metabolism: implications for cardiovascular diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012; **44**: 1632-1645.
43. Hisatomi K, Mukae H, Sakamoto N, *et al.* Pirfenidone inhibits TGF-beta1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC pulmonary medicine* 2012; **12**: 24.
44. Kakugawa T, Mukae H, Hayashi T, *et al.* Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2004; **24**: 57-65.
45. Choi K, Lee K, Ryu SW, *et al.* Pirfenidone inhibits transforming growth factor-beta1-induced fibrogenesis by blocking nuclear translocation of Smads in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Molecular vision* 2012; **18**: 1010-1020.

Figure legends

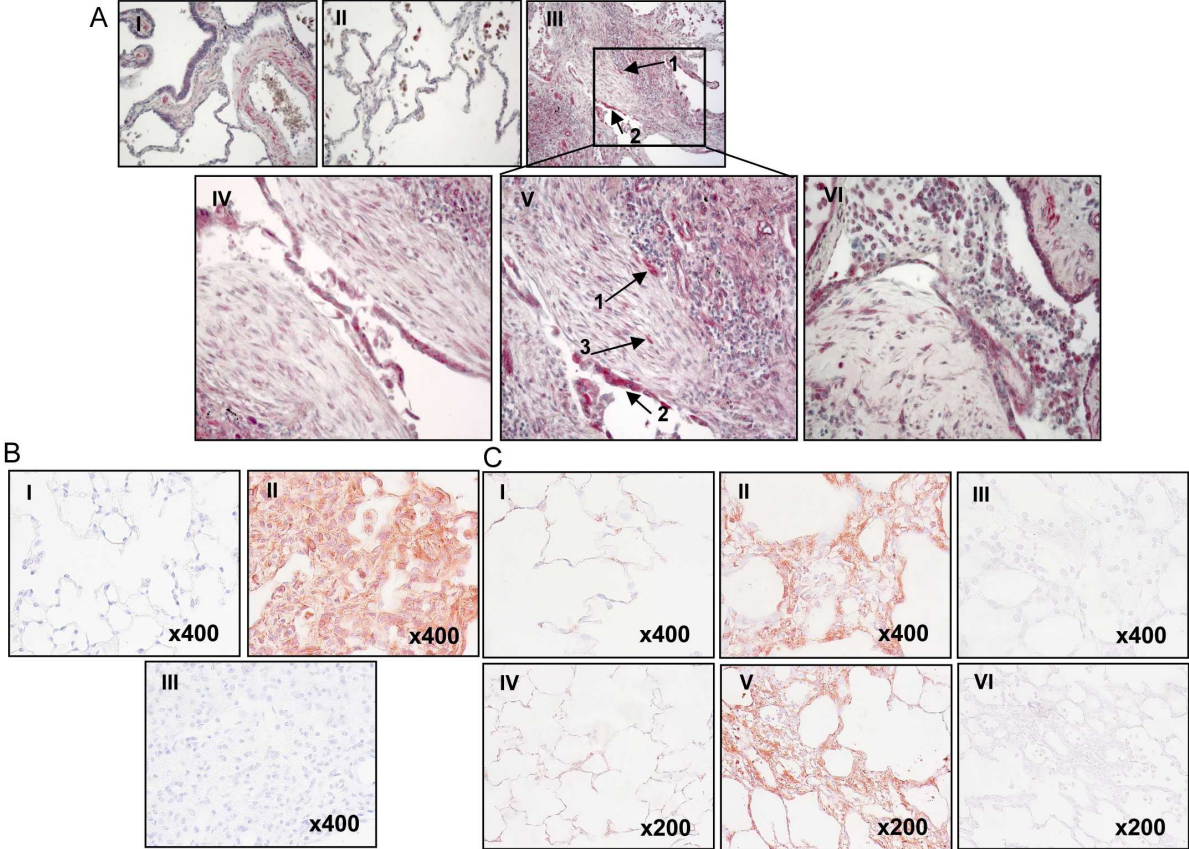


Figure 1: *αB-crystallin is expressed in fibrotic lung tissue.*

A) *αB-crystallin* immunohistochemistry. I and II- Representative non IPF patient (n=4), III, IV, V and VI- Area of established fibrosis from IPF patients (n=6). Hyperplastic alveolar epithelial cells (arrows 1 and 2) and myofibroblasts (arrow 3) are *αB-crystallin* positive. Magnification, 200x (I, II and III) and 400x (IV, V and VI). I, II, and IV, V, VI are respectively from separate control and IPF patients.

B) *αB-crystallin* immunohistochemistry on lung sections from mice receiving either NaCl (I) or bleomycin (II) by intra-tracheal injection. A representative image (400x, n=6) obtained at day 21 after bleomycin treatment is shown. III) Negative control using IgG1 Ab (400x).

C) *αB-crystallin* immunohistochemistry on lung tissues from rats that received either a control adenovirus (AdDL, I and IV) or the TGF-β1 encoding adenovirus (AdTGF-β1, II and V) intratracheally. A

representative image obtained at day 21 (upper panel 400x and lower panel 200x, n=6) after adenovirus administration is shown. III and VI) Negative controls using IgG1 Ab (200x and 400x).

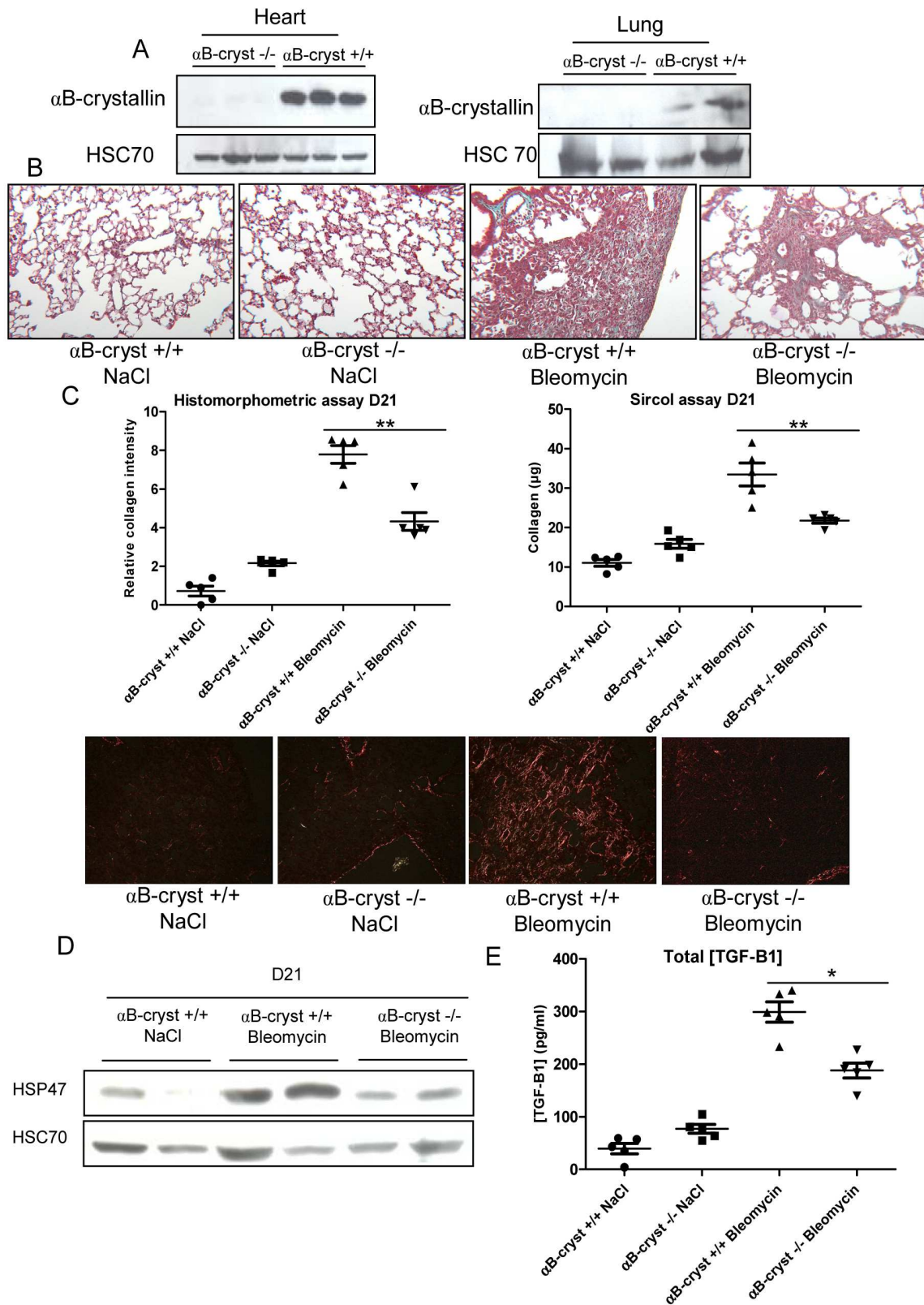


Figure 2 α B-crystallin KO mice are protected from bleomycin-induced fibrosis.

A) α B-crystallin expression analysed by western blot on heart (left) and whole lungs (right) from untreated SV129 KO and WT mice. HSC 70 served as a loading control.

B) Representative histology of WT and α B-crystallin KO mice lungs 21 days after i.t. administration of NaCl or Bleomycin. Masson Trichrome staining 100x. (n=8).

C) Collagen quantification using a Sircol assay (right) or a histomorphometric method (left) in lungs from WT and KO mice at D21. Mean \pm SEM, ** $p \leq 0.01$, n=6/group. Polarised light photography of lung sections stained with Picrosirius Red (lower panel) from WT and KO mice at D21. Representative images are shown (n=6).

D) HSP47 expression analysed by western blot on protein extracts from whole lung tissue of WT and KO mice at D21. HSC70 served as a loading control.

E) Total mouse TGF- β 1 was measured by ELISA on BALF from WT and KO mice 21 days after intratracheal administration of bleomycin or NaCl. Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, n=6/group.

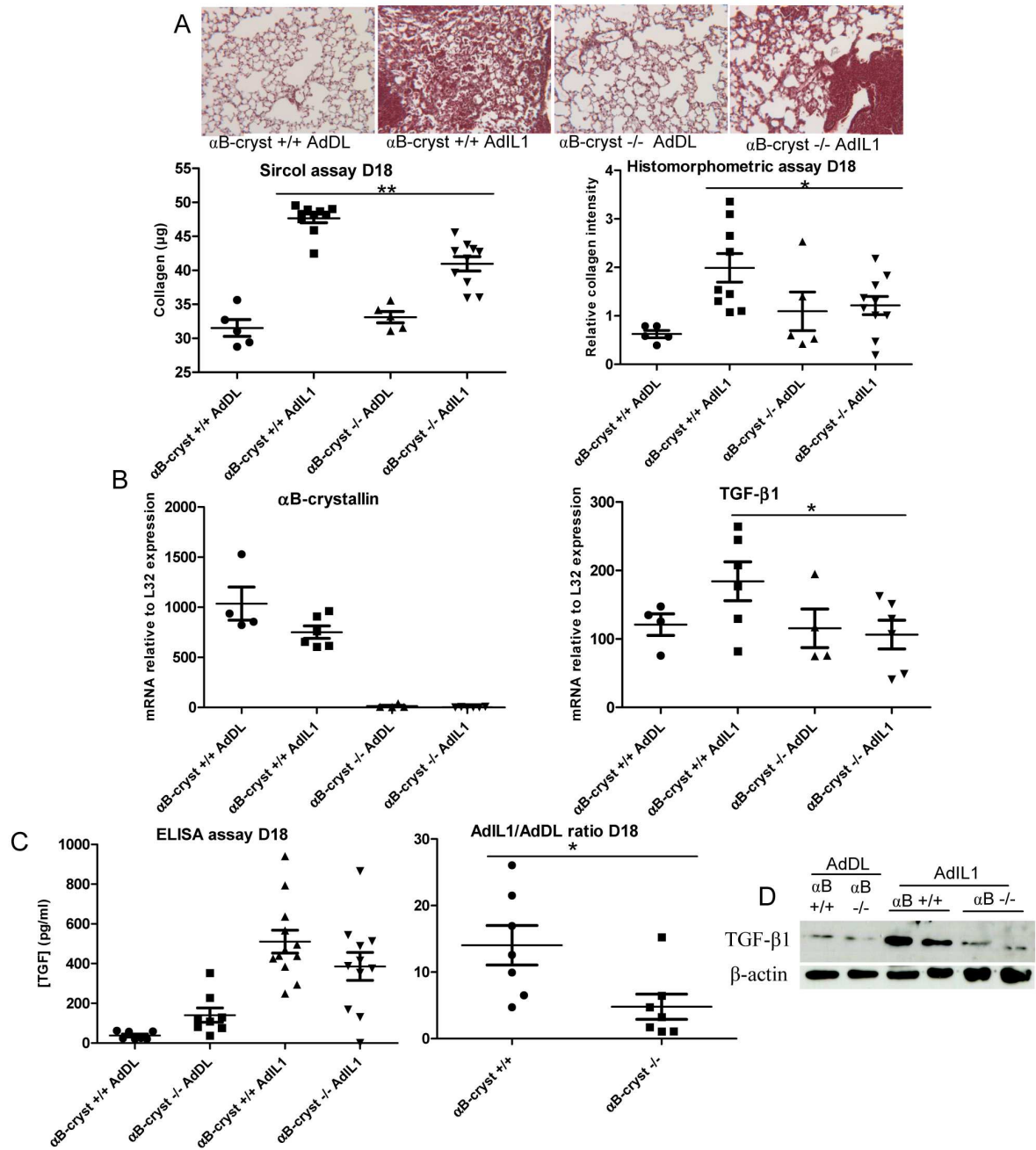


Figure 3 α B-crystallin is involved in pulmonary fibrosis induced by a pro-inflammatory cytokine, IL-1 β .

A) Representative histology of WT and α B-crystallin KO mice lungs 18 days after i.t. administration of AdDL (control) or AdIL1- β . Masson Trichrome staining 100x (upper panel). A representative image is shown (n=10). Lung collagen quantification using a Sircol and a histomorphometric assay in WT and α B-crystallin KO mice that received AdIL1- β or AdDL (control) (D18, lower panel). Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, n=8/group.

B) α B-crystallin and TGF- β 1 RNA levels were analyzed by quantitative PCR in lungs from WT and KO mice treated with AdIL1- β or AdDL (D6). Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, n=8/group.

C) TGF- β 1 was measured by ELISA on lungs from WT and KO mice treated with AdIL1- β or AdDL (D18). Mean \pm SEM, ** $p \leq 0.01$, n=8/group.

D) Western blot analysis of protein extracts from whole lungs of WT and KO mice at D18 after being treated with AdIL1- β or AdDL. β -actin served as a loading control.

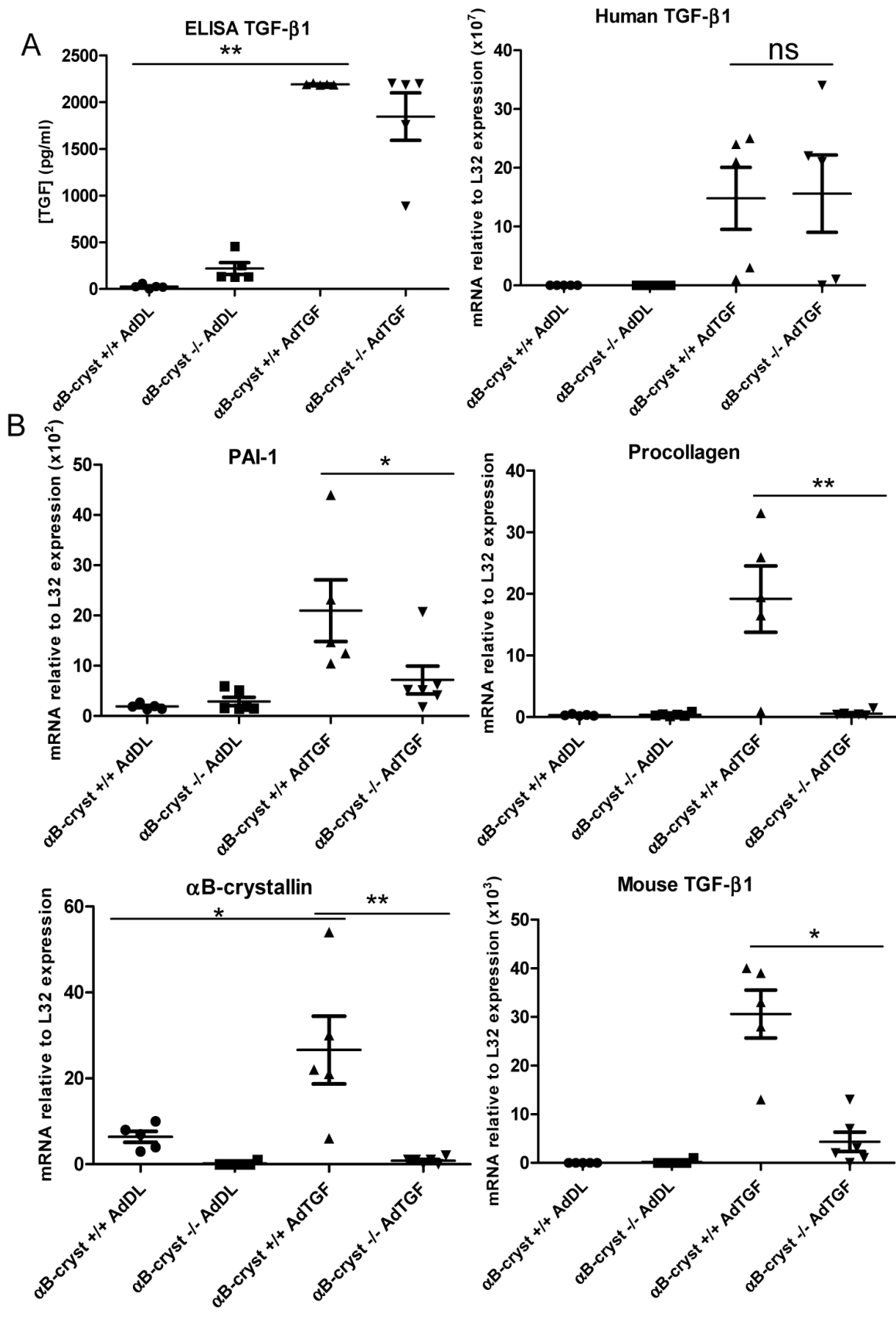


Figure 4 α B-crystallin KO mice have a deficient TGF- β 1 pathway.

A) Total TGF- β 1 was measured by an ELISA assay that detects both human and rodent TGF- β 1 on BALF from WT and KO mice 7 days after intratracheal administration of AdTGF- β 1 or AdDL (left). RNA level of human TGF- β 1 was analyzed by quantitative PCR on lung tissues from WT and KO mice, 7 days after intratracheal administration of AdTGF- β 1 or AdDL. Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, n=6/group.

B) RNA levels of mouse TGF- β 1, PAI-1, Procollagen and α B-crystallin, were analyzed by quantitative PCR on lung tissues from WT and KO mice, 7 days after intratracheal administration of AdTGF- β 1 or AdDL. Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, n=6/group.

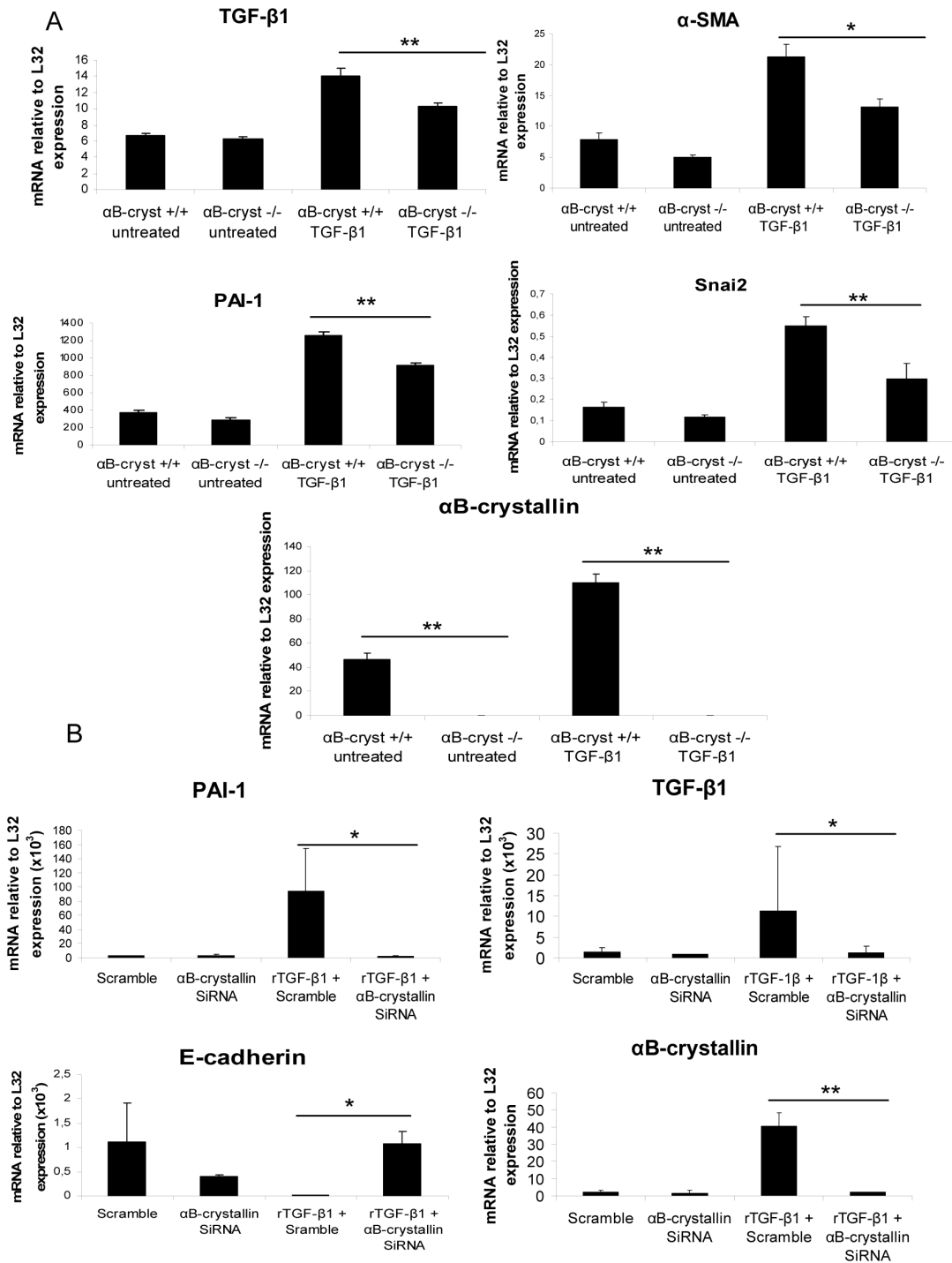


Figure 5 *αB-crystallin* modulates the expression of genes downstream of the TGF-β1 pathway.

A) RNA levels of *αB-crystallin*, TGF-β1, *α-SMA*, PAI-1 and *Snai2* were analyzed by quantitative PCR on primary type II lung epithelial cells (AEC II) left untreated or treated with rTGF-β1 (6h, 10 ng/ml).

Mean ± SEM, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, $n=7$ /group.

B) RNA levels of α B-crystallin, TGF- β 1, E-cadherin and PAI-1 were analyzed by quantitative PCR after rTGF- β 1 treatment in A549 cells transfected with either scrambled siRNA or α B-crystallin specific siRNA (24h, 10 ng/ml). Mean \pm SEM, * p \leq 0.05 and ** p \leq 0.01, n=3/group.

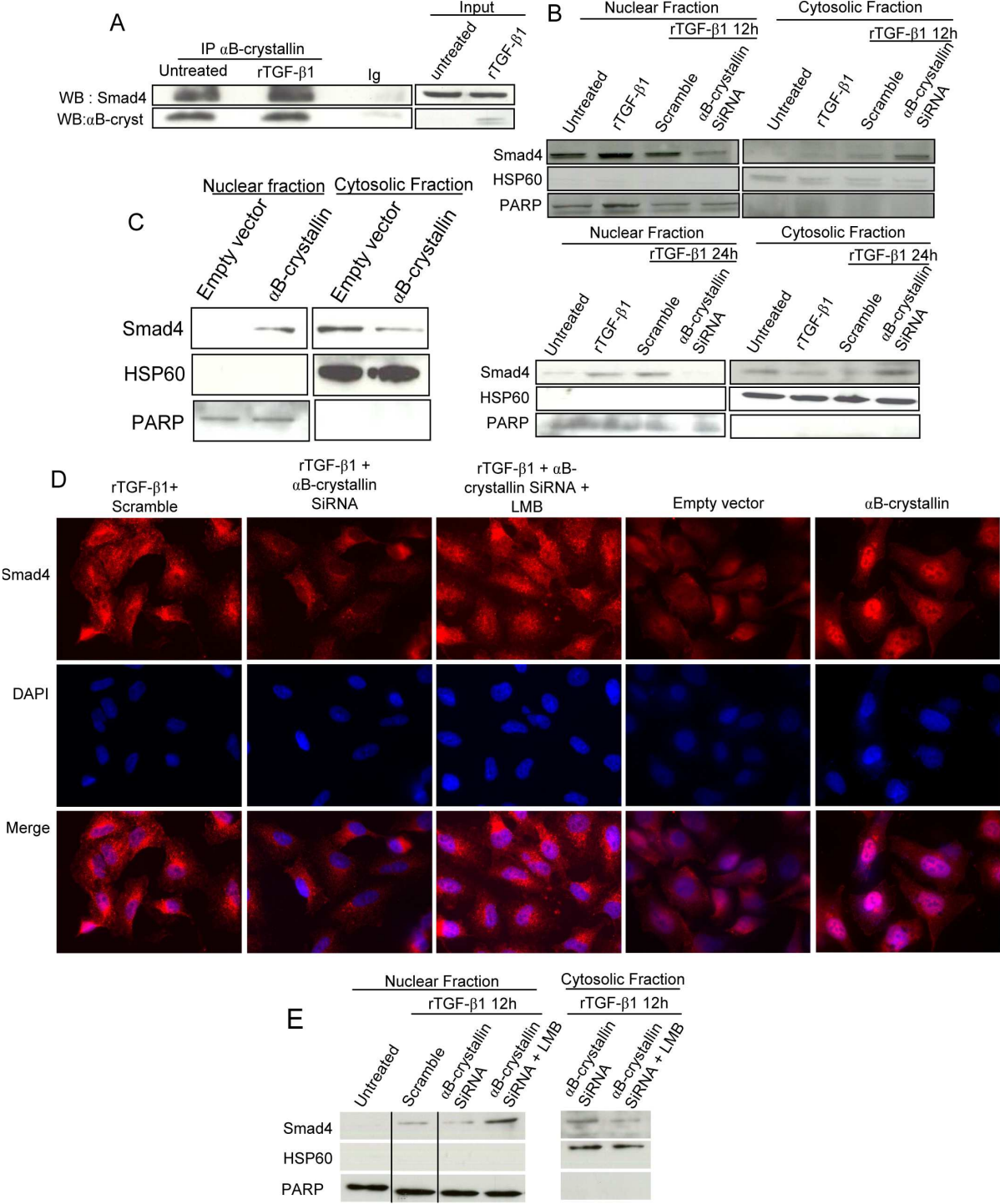


Figure 6 α B-crystallin modulates cellular localisation of Smad4.

A) Immunoprecipitation (IP) of α B-crystallin in A549 cells after rTGF- β 1 treatment was followed by immunodetection of Smad4. Control Ig: non-relevant antibody. Input: non immunoprecipitated cell extracts.

B) The nuclear and cytoplasmic populations of Smad4 were determined by cell fractionation of A549 cells transfected with an α B-crystallin specific siRNA or scrambled siRNA (control) and/or treated with rTGF- β 1 (10ng/ml, 12h and 24h). The nuclear protein PARP and the mitochondrial protein HSP60 were used as controls for extract purity.

C) The nuclear and cytoplasmic populations of Smad4 were determined by western blot after cell fractionation of A549 cells transfected with an α B-crystallin encoding vector or an empty vector (control).

D) Smad4 nuclear and cytoplasmic presence was confirmed by immunofluorescence in A549 cells transfected with a specific α B-crystallin siRNA (or scrambled siRNA) and treated with rTGF- β 1 or cells transfected with an α B-crystallin vector (or an empty vector as a control). Representative images are shown (n=4).

E) The nuclear and cytoplasmic populations of Smad4 were determined by cell fractionation in A549 cells transfected with an α B-crystallin specific siRNA or a scrambled siRNA and treated with rTGF- β 1 (10ng/ml, 12h). When indicated, LMB (20nM, 1h) was used to inhibit nuclear export. Lanes 1 and 2 were run on the same gel but were noncontiguous.

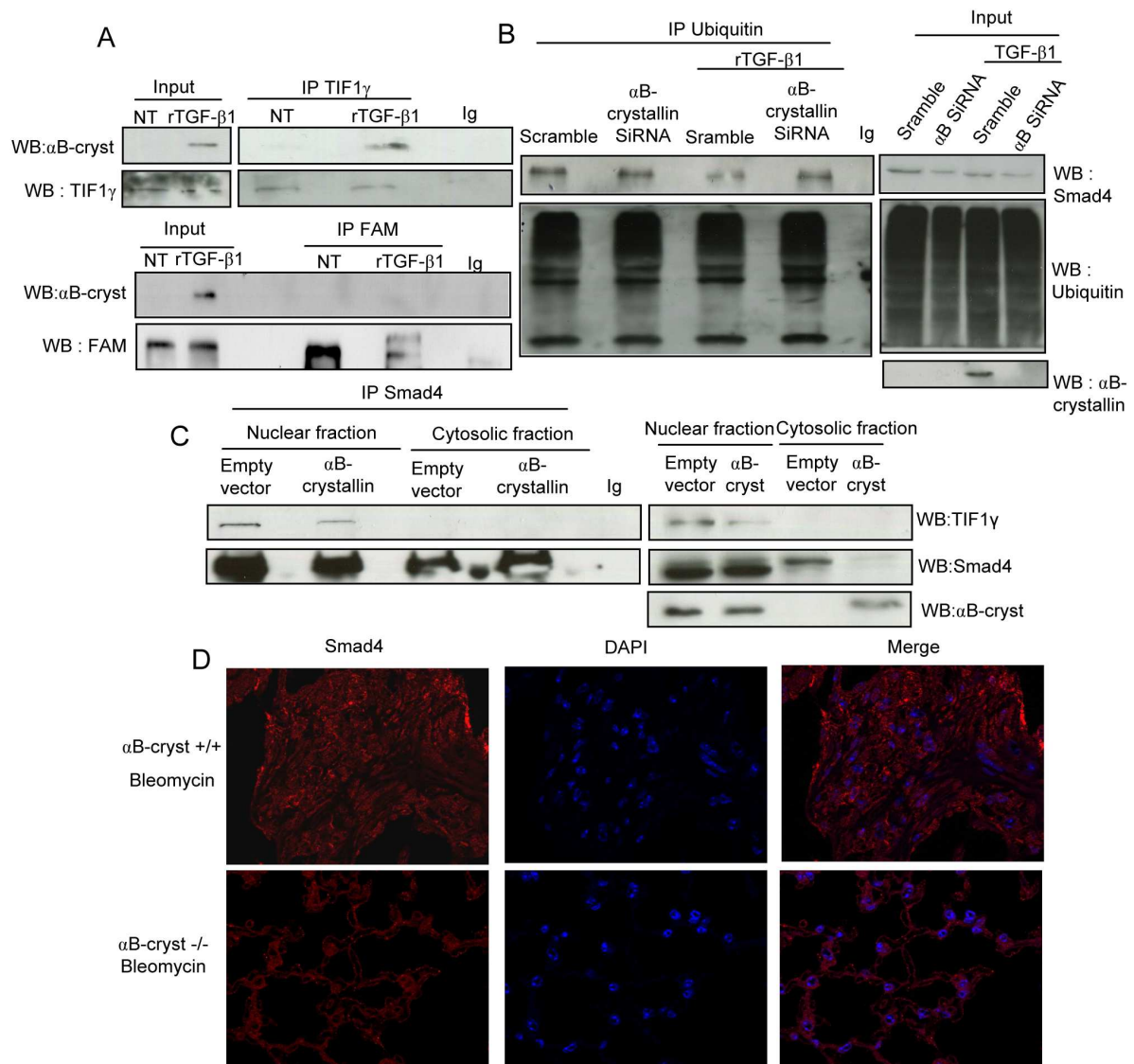


Figure 7 Role of α B-crystallin in Smad4 monoubiquitination.

A) Immunoprecipitation (IP) of TIF1 γ (upper panel) or FAM/USP9x (lower panel) in A549 cells treated with rTGF- β 1 (12h) was followed by immunodetection of α B-crystallin. Control Ig: non-relevant antibody. Input: nonimmunoprecipitated cell extracts.

B) IP of ubiquitinated proteins in A549 cells transfected with an α B-crystallin siRNA or scrambled siRNA (left untreated or treated with rTGF- β 1) was followed by immunodetection of Smad4. Control Ig: non-relevant antibody. Input: nonimmunoprecipitated cell extracts.

C) IP of Smad4 in A549 cells treated with an α B-crystallin encoding vector or an empty vector was followed by immunodetection of TIF1 γ in nuclear and cytosolic fraction. Control Ig: non-relevant antibody. Input: nonimmunoprecipitated cell extracts.

D) Smad4 nuclear and cytoplasmic location was confirmed by immunofluorescence on lung sections from WT and KO mice receiving bleomycin (D21). Representative images are shown (n=5).

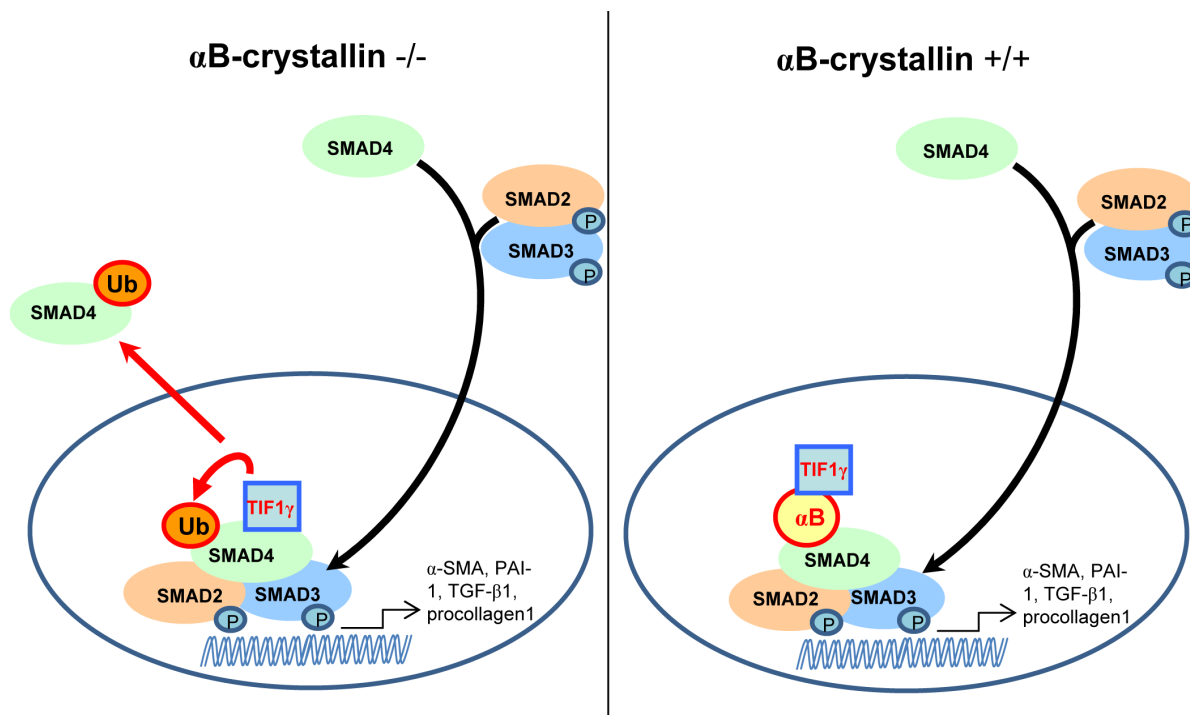


Figure 8 Hypothetical mechanism of action of α B-crystallin on the Smad4-dependant TGF- β 1 pathway.

After TGF- β 1 stimulation, the interaction between Smad4 and TIF1 γ is decreased by α B-crystallin thereby disturbing Smad4 monoubiquitination. As a consequence, Smad4 remains sequestered in the nucleus where its pro-fibrotic activity is functional. In contrast, in the absence of α B-crystallin Smad4 monoubiquitination by TIF1 γ is favoured and thereby its nuclear export.

The lack of the small heat shock protein α B-crystallin hampers pleural fibrosis by blocking TGF- β 1 signalling

Bellaye P-S, Burgy O, Colas J, Wettstein G, Camus P, Garrido C, Bonniaud P.

Introduction

The pleura can be, as the lung parenchyma, the seat of fibrotic diseases. This often results from other pleural disorders inducing fibrotic reaction in the mesothelium. Exposure to asbestos (46), pleural reactions induced by drugs such as ergots (47) or cyclophosphamide (48, 49), hemothorax or pneumothorax and tuberculosis are among the most common causes of pleural fibrosis. Depending on the severity of the disease, pleural fibrosis can be associated with respiratory failure, quality of life reduction and even mortality. There is no effective current therapies to reverse establish pleural fibrosis. Pleural and pulmonary fibrosis have several properties in common and both are closely related. They are characterized by an excessive extracellular matrix deposition and remodelling observed in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) typically start in subpleural lung regions (1, 50). Our team demonstrated that TGF- β 1 overexpression and bleomycin combined with carbon particles in the pleural space led to severe pleural fibrosis invading the lung parenchyma (15, 17). We showed that pleural mesothelial cells undergo a transformation similar to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and acquire the ability to migrate into the lung parenchyma playing a potential role in IPF (17). Even though the EMT process is strongly debated in IPF (6, 7), we recently showed that the inhibition of the small heat shock protein HSP27 favours the degradation of the transcription factor Snail thus limiting the EMT process in mesothelial cells (51). This inhibition was associated with beneficial effects on pleural and subpleural fibrosis (51).

α B-crystallin is another small heat shock protein often related to HSP27 which expression is known to be enhanced by TGF- β 1 (11, 12). α B-crystallin has a major role in cytoskeletal homeostasis

suggesting a function of α B-crystallin in cytoskeletal architecture of fibroblast and myofibroblasts during the process of fibrogenesis. Recently, we demonstrated that α B-crystallin was able to favour Smad4 nuclear localisation and activity in pulmonary epithelial cells and fibroblasts by disrupting the complex between TIF1 γ and Smad4. Indeed, by inhibiting TIF1 γ /Smad4 complex formation α B-crystallin abrogated Smad4 monoubiquitination by TIF1 γ thus sequestering Smad4 in the nucleus enhancing the TGF- β 1 pathway and subsequent fibrosis (my ref). As a consequence, α B-crystallin deficient mice were protected from pulmonary fibrosis induced by bleomycin, TGF- β 1 and IL-1 β (my ref).

These reasons led us to investigate the role of α B-crystallin on pleural fibrosis and pleural mesothelial cells. We demonstrate here that α B-crystallin is strongly overexpressed in the pleura of IPF patient and provide evidence that the lack of α B-crystallin has a protective effect on pleural fibrosis *in vivo*. *In vitro*, we highlight a mechanism by which α B-crystallin favors the TGF- β 1 pathway via subsequent modulation of Smad4's cellular localisation on mesothelial cells as we already observed in pulmonary epithelial cells and fibroblasts. In our model, α B-crystallin downregulation limited mesothelial cells EMT and hampered their migration thus abrogating their subsequent parenchymal invasion.

The present article highlights a potential role of the small heat shock protein α B-crystallin in the transformation of pleural mesothelial cells through EMT participating to the subpleural initiation and parenchymal invasion of mesothelial cells in the process of IPF.

Materiel and methods

Human tissue samples for histology

Lung tissue samples were obtained by open lung biopsy (INSERM U700, Paris). IPF were diagnosed according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society consensus criteria (1), including clinical, radiographic, and characteristic histopathologic features (n = 6). Control non IPF lung tissue samples were obtained from smokers who underwent thoracic surgery for localized primary lung carcinoma (n = 4). The local ethics committee (comité de protection des personnes, Ile de France 1) approved the study, and patients gave their informed consent before lung surgery.

Paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded sections of human lung tissue were pretreated in citrate buffer pH6 for 40 minutes for antigen retrieval. Sections were then incubated with 1B6.1-3G4 anti- α B-crystallin monoclonal antibody (Enzo Life Sciences) and positive cells were revealed using the Vectastain ABC-alkaline phosphatase kit system (Vector Laboratories). Mouse IgG1 was used to test the specificity of immunostaining.

Recombinant adenovirus

The construction of adenoviral vectors has been described previously (52, 53) Briefly, TGF- β 1 cDNA was cloned into a shuttle vector downstream a human CMV promoter and cotransfected with a shuttle plasmid in 293 cells. The TGF- β 1 cDNA has cysteine to serine mutations at position 223 and 225, rendering the expressed TGF- β 1 biologically active. The control vector (AdDL) with no insert in the E1 region was produced in the same way (52)

Animal procedures

SV129 Wild-Type (WT) mice (Charles River, Saint Germain-sur-l'Arbresle, France) and SV129 Knock-Out (KO) mice for the α B-crystallin gene were housed in pathogen-free conditions. The adjacent gene *HSPB2*, which is located in the 5' flanking region of the α B-crystallin gene in a head-to-head manner with an intergenic sequence of less than 1 kb, was also knocked-out in those mice (21). Mouse food

and water were provided *ad libitum*. The animals were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France). All experiments were approved by the Comité d’Ethique de l’Université de Bourgogne (Bourgogne, France). Procedures were performed under anaesthesia by isoflurane inhalation (TEM, Lormont, France). For pleural/subpleural fibrosis, adenovector and bleomycin/carbon particules administrations were performed by intrapleural injection of 100 µl of sterile NaCl 0.9% containing a total of 5.10^8 plaque forming units (PFU) of AdTGF-β1, AdDL, or AdLacZ as described by Decologne *et al.* (15, 17). Bleomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA, 20 mg/Kg) and carbon particles (carbon black 101, 90 nm diameter; Degussa, Frankfurt, Germany, 0.1 mg/mouse) were administered following the same protocol. Adenovectors were administered, without any surgery, by intrapleural injection on the right side (6th intercostal space) with a 20-gauge needle, with animals in a left lateral decubitus position. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and pleural lavage fluid (PLF) was gathered as previously described (16) and stored at -20°C after cell count was performed.

Collagen quantification (sircol and histomorphometry)

Histomorphometric assay - The amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was quantified by staining with Picosirius Red. The percentage of emission (reflecting the percentage of collagen) of the pleural, subpleural and parenchymal areas were quantified (morphometry software from Histolab/Microvision Instruments) as previously described (7). Briefly, collagen intensity in the pleura was measured within a rectangle (constant length of 100 mm, width depending on pleura thickness). Collagen content was expressed as percentage of emission multiplied by the surface of each rectangle. Collagen within the subpleural zone was measured using circles (diameter 65 mm) randomly placed at a constant distance from the pleural surface. Collagen content within circles was expressed as percentage of emission. Collagen amounts were measured using 20 circles per sections placed randomly throughout the parenchyma. Circles had a constant diameter. Large vessels and airways were excluded. The collagen content

within the circles was expressed as the percentage of emission (5 measurements per picture, 8 pictures per animal).

Sircol assay - The sircol assay was performed on whole lung extract of the left lobe. Left lobes were crushed in 1 ml of lysis buffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 2M, EDTA 1mM Tween 0.01%, pH 7.4) using an Ultra-turax T25. Lysates were incubated over night at 4°C under agitation. Proteins were collected by a 10 min centrifugation at 16000g. Collagen quantification was performed using a “Sircol kit” (Biocolor LTD., Northern Ireland, UK) following the manufacturer’s recommendations.

TGF-β1 quantification (ELISA)

Total human and mouse TGF-β1 from PLFs was determined using ELISA (R&D Systems, Lille, France), performed according to the recommendations of the manufacturer. The sensitivity of this assay was 7 pg.ml⁻¹.

Cell culture

Met5A lung mesothelial cells (ATCC) were grown as monolayers in 5% CO₂ at 37°C in Med199 (Lonza, Paris, France), supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS, Lonza). Cells were seeded at 40% confluence one day prior to starting the treatment and then stimulated with recombinant human TGF-β1 (rTGF-β1, R&D Systems, Minneapolis, MN) in complete medium at 10 ng/ml.

RNA interference and transfection

αB-crystallin RNA interference - αB-crystallin siRNA was purchased from applied biosystem (Courtaboeuf, France). The sense and antisense sequences were respectively: 5’ AGUCUUGUGACUAGUGCUG-tt-3’ and 5’CAGCACUAGUCAVAAGACU-tt-3’. SiRNAs (50 nM) were transfected using INTERFERin (polyplus, Illkirch, France) following the manufacturer’s recommendations. Six hours after transfection, the medium was removed and cells were treated with rTGF-β1 after 24h.

q-PCR analysis

Total RNA from A549 cells was extracted using TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription was performed on the total RNA using the M-MLV kit (Promega, Charbonnières, France). Quantitative RT-PCR was performed on the cDNA using SYBR green master mix (Promega). The human forward and reverse primer sequences were the following: α B-crystallin, 5'-CACCCAGCTGGTTTGACACT-3' and 5'-TTCCTCTGGGGAGAAGTGCT-3'; α -SMA, 5'-TGGTCGGTATGGGTCAGAAAG-3' and 5'-TCAGGGTCAGGATACCTCTCTTG-3'; PAI-1, 5'-CGTGGTTTTCTCACCTATGG-3' and 5'-CTGGGTTTTCTCCTCTGTTGTC-3'; and TGF- β 1, 5'-CTGCTGTGGCTACTGGTGC3' and 5'-CTTACCAGCTCCATGTCGAT-3'. The mouse forward and reverse primer sequences were: α B-crystallin, 5'-AGGGAAGTGGCTGTTGAGAAG-3' and 5'-GCCTCTTCGACCAGTTCTTCG-3'; TGF- β 1, 5'-CGTGGCTTCTAGTGCTGACGC-3' and 5'-CCATGTCGATGGTCTTGCAGGT-3'; PAI-1, 5'-GGCCGTGGAACAAGAATGAGAT-3' and 5'-GCTTGAAGAAGTGGGGCATGAAG-3'.

Immunofluorescence

Cells were fixed with paraformaldehyde (4% PFA for 10 min) and permeated with a PBS-Triton (0.1%, 5 min) solution. After saturation of nonspecific sites with BSA (5%, 20 min), cells were incubated with primary antibodies overnight in a humidified chamber at 4°C. Cells were stained for Smad4 (rabbit clone EP618Y, Abcam), α B-crystallin (mouse clone 1B6.1-3G4, Enzo life science). Goat anti-rabbit and goat anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 594 and Alexa Fluor 488 respectively (Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were used as secondary antibodies at a dilution of 1 : 2000.

Immunohistochemistry

After deparaffination (Xylene) and endogenous peroxidases inhibition (PBS- H₂O₂ 1% 20 min), sections were saturated (BSA 5%) and incubated overnight at 4°C with specific antibodies at a dilution of 1 : 250 for the detection of α B-crystallin (Enzo life science), HSP47 (mouse clone

M16.10A1, enzo life science) and α -SMA (mouse clone CGA7, santa cruz biotechnology). HRP-conjugated goat anti-rabbit, (Jackson immunoresearch laboratories, Suffolk, UK) was used as the secondary antibody (1:250, 45 min).

Wound closure assay

When Met-5A cells were confluent, a wound was performed with a tip in the middle of the culture. Cells were then transfected with α B-crystallin siRNA or a Scramble SiRNA and treated rTGF- β 1 for 48h or left untreated. Pictures were taken immediately after the scratch and 48h after rTGF- β 1 treatment (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Statistical analysis

Comparison between different groups was performed using the non parametric Mann-Whitney test implemented in the statview software. *P* values below 0.05 were considered as statistically significant. All results are representative from at least 3 different experiments.

Results

α B-crystallin is expressed in the pleura of fibrotic lungs.

Histological examination of lung section from patients affected by IPF showed that α B-crystallin was up-regulated in the pleura of fibrotic lungs. Indeed, pleural mesothelial cells strongly expressed α B-crystallin (Figure 1A). On the contrary, α B-crystallin was barely detected in pleura from non-IPF patients. This result was confirmed using a rodent model of pleural fibrosis based on the administration of adenoviruses encoding TGF- β 1 in the pleural space of mice. We observed that pleural fibrosis formation was correlated with a significant increase in α B-crystallin expression (Figure 1B). α B-crystallin was strongly expressed in animals that received AdTGF- β 1 whereas no expression of α B-crystallin was observed in the control animals receiving an empty adenovirus (AdDL) and that did not develop pleural fibrosis (Figure 1B).

α B-crystallin KO mice are protected from bleomycin/carbon particule-induced pleural fibrosis.

Intrapleural injection of bleomycin combined with carbon particles (CB+BLM) is an established model of pleural fibrosis in mice (15). Lung sections from WT and KO mice receiving both CB+BLM showed that α B-crystallin deficient mice developed a less severe pleural fibrosis compared to WT mice at D21 (Figure 2A). This observation was confirmed by collagen quantification using histomorphometric measurements. Collagen deposition in the pleura of WT mice appeared to be greater than collagen content in KO mice (1.5 fold increase, Figure 2B). Further, the subpleural area of WT mice also contained more collagen than subpleural area of KO mice after CB+BLM administration (2.5 fold increase, Figure 2B). In contrast, collagen accumulation seemed identical in parenchyma of WT and KO mice after they received CB+BLM (Figure 2B). CB+BLM-induced pleural fibrosis invaded the subpleural area of WT mice to a larger extent than KO mice but did not lead to parenchymal collagen accumulation at D21.

α B-crystallin KO mice are protected from AdTGF- β 1-induced pleural fibrosis

In order to confirm our results we used another pleural fibrosis model based on intrapleural injection of AdTGF- β 1 in the pleural space of mice. To our knowledge, this model has already been described in rats (17) but this is the first time that it is used in mice. We observed that WT mice developed a severe pleural fibrosis after AdTGF- β 1 administration compared to mice receiving control AdDL (Figure 3A). However, whereas α B-crystallin null mice receiving AdDL appeared normal, the pleural fibrosis induced by AdTGF- β 1 in α B-crystallin null mice was strongly limited compared to WT mice (Figure 3A). An ELISA assay from lungs of all groups validated our model by showing that both WT and KO mice were able to similarly express the adenovirus encoding human TGF- β 1 (Figure 3B). We, then, investigated the collagen deposition in WT and KO mice using two methods of collagen quantification, histomorphometry and Sircol assay. Both methods confirmed an increase of collagen accumulation in WT mice receiving AdTGF- β 1 compared to control AdDL WT mice (histomorphometry and Sircol: 1.5 fold increase, Figure 3C). However, this increase of collagen accumulation was not found in mice lacking α B-crystallin (histomorphometry and Sircol: 1.05 fold increase compared to control AdDL KO mice, Figure 3C).

In line with our results, we demonstrated that HSP47, the chaperon for collagen, was also increased in the pleura of WT mice compared to KO mice after intrapleural AdTGF- β 1 administration (Figure 3D). Further, the increase in α -SMA, a myofibroblastic marker, induced by AdTGF- β 1 was much lower in KO compared to WT mice at day 10 (Figure 3E).

The lack of α B-crystallin KO impairs the TGF- β 1 pathway in vivo and in vitro.

The role of α B-crystallin in the TGF- β 1 pathway as already been demonstrated in lung fibrosis on epithelial cells and fibroblasts (My ref). Here we show that the lack of α B-crystallin inhibited the expression of several TGF- β 1 downstream genes such as PAI-1 and endogenous TGF- β 1 itself in vivo during pleural fibrosis (Figure 4A). α B-crystallin deficient mice has a less important up-regulation of PAI-1 (5.5 fold decrease), endogenous TGF- β 1 RNA (2.7 fold decrease, Figure 4A) after AdTGF- β 1

intrapleural administration, suggesting a direct effect of α B-crystallin in the autoactivation loop of TGF- β 1.

We confirmed these results *in vitro* on Met5A pleural mesothelial cells. In α B-crystallin-deleted cells (using RNA interference against α B-crystallin), we found a strong decrease in the expression of rTGF- β 1-induced genes, such as PAI-1, TGF- β 1 and α -SMA (Figure 4B). Indeed, the known ability of TGF- β 1 to up-regulate α -SMA in mesothelial cells (51) was countered by α B-crystallin inhibition (Figure 4B). Accordingly with our results we hypothesized that α B-crystallin inhibition, was able to inhibit the TGF- β 1 signalling pathway in mesothelial cells.

The lack of α B-crystallin KO impairs Smad4 nuclear localisation and pleural cell migration.

α B-crystallin has already been demonstrated to inhibit Smad4 nuclear export by inhibiting Smad4 monoubiquitination by TIF1 γ thus favoring TGF- β 1 signalling pathway in lung epithelial cells and fibroblasts (my ref). Here we show that α B-crystallin inhibition in pleural mesothelial cell hampers Smad4 nuclear localisation induced by rTGF- β 1 (Figure 5A). Therefore we hypothesized that α B-crystallin function was similar in pleural cells than in lung epithelial cells and fibroblasts. Mesothelial cells are known to be able to invade in the lung parenchyma during pleural fibrosis induced by TGF- β 1. In line with our hypothesis, we show that the down-regulation of α B-crystallin limited the migration of mesothelial cells *in vitro* (Figure 5B) without affecting cell proliferation.

Mesothelial cells are known to be able to invade in the lung parenchyma during pleural fibrosis induced by TGF- β 1. *In vivo*, we stained mesothelial cells with β -galactosidase (blue staining) using intrapleural injection of AdLacZ in association with AdTGF- β 1 to induce pleural fibrosis. Therefore we were able to determine mesothelial cell fate. We demonstrated that pleural cell invasion was largely impaired in α B-crystallin deficient mice in comparison to WT mice after pleural fibrosis induction (Figure 6).

Discussion

Mesothelial cells are capable of plasticity and have the ability to change their phenotype in a similar way to the epithelial cells. Indeed, in culture mesothelial cells lose their "epithelial" markers such as cytokeratin and adopt a phenotype close to fibroblasts (51, 54). This mechanism appears similar to epithelial cells EMT (17). This mechanism is characterized by an increase in α -SMA and vimentin and a decrease in expression of E-cadherin and cytokeratin (55, 56). In animal models, the induction of mesothelial cell EMT was also correlated with an increase in collagen expression by mesothelial cells showing their potential involvement in the fibrotic process (57).

At the pleura, our team has shown that overexpression of TGF- β 1 by adenovirus administration within the pleural cavity induced a major pleural fibrosis with EMT induction of pleural mesothelial cells (17, 51, 58).

The role of the pleura in pulmonary fibrosis is suggested by the initiation and progression of IPF from the subpleural areas. This hypothesis is reinforced by models of pleural fibrosis induced by co-administration of bleomycin/carbon nanoparticles or AdTGF- β 1 developed in our team (15). A study recently showed that in lung biopsies of patients suffering from IPF, positive cells for calretinin, a marker of mesothelial cells, could be found in fibrotic areas into the lung (59). The number of mesothelial cells found in lung parenchyma was correlated with the severity of the disease. This same team then stained pleural mice mesothelial cells with GFP, while TGF- β 1 or NaCl (control mice) was administered intranasally to the same animals to create lung fibrosis. GFP labeled cells were found in the BAL of mice that received TGF- β 1 but not in mice that received NaCl. These results seem to confirm that the mesothelial cells have the ability to migrate from the pleural space to the lung parenchyma. Using the same model, they showed that some of the mesothelial cells found in the parenchyma expressed α -SMA, suggesting that these cells have underwent EMT.

In our study, we demonstrate that the lack of α B-crystallin protects mice from pleural fibrosis and reduce collagen deposition in the pleura. Further, EMT of α B-crystallin depleted mesothelial cells is inhibited as they no longer express α -SMA after rTGF- β 1 expression. As it was demonstrated in lung

fibrosis (my ref), α B-crystallin KO mice and α B-crystallin depleted mesothelial cells had a deficient TGF- β 1 pathway. Indeed, the TGF- β 1 pathway was inhibited in pleural cells by the enhancement of Smad4 nuclear export in cells lacking α B-crystallin. The disturbance in TGF- β 1 pathway inhibited the transformation of mesothelial cells through the EMT process and abrogated their migration *in vitro* and *in vivo* suggesting an important role of α B-crystallin in the invasion of parenchyma by mesothelial cells after pleural fibrosis.

The present study highlights a role of the small heat shock protein α B-crystallin in pleuro-pulmonary fibrosis. α B-crystallin could be an important biomarker for pleural fibrosis as it is strongly overexpressed in pleura of fibrotic lungs. Further, we think that it might be a potential therapeutic target to limit parenchymal invasion of mesothelial cells which might be at the origin of IPF. Our team already demonstrated the role of HSP27 inhibition on protection against pleuro-pulmonary fibrosis (51). However, mechanisms involved are different as HSP27 inhibition favors Snail degradation thus inhibiting subsequent EMT of mesothelial cells whereas α B-crystallin inhibition interferes with TGF- β 1 pathway through Smad4 nuclear export enhancement. Targeting both HSP27 and α B-crystallin might be of great interest to prevent lung fibrotic disorders initiation and progression.

Aknowledgement

The research leading to these results has received funding from the European Community 7th Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement HEALTH-F2-2007- 202224 eurIPFnet, Agence Nationale de la Recherche Blanc 11-BSV-011-01 meso-IPF and La Ligue Régionale Grand Est Contre le Cancer. PS. B and G. W are supported by the EU 7th Framework Programme (2007–2013 agreement HEALTH-F2-2007-202224 eurIPFnet.). G. W is supported by le Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire". O. B is supported by le Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire" (FRSR). C.G. team has the label from La Ligue National Contre le Cancer and LabEx LipSTIC.

We thank V. San Giorgio and all the team from the animal quarter and A. Bouchot and all the team from Cellimap for their invaluable and professional help.

References

1. Huggins JT, Sahn SA. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology (Carlton, Vic)* 2004;9:441-447.
2. Pfitzenmeyer P, Foucher P, Dennewald G, Chevalon B, Debieuvre D, Bensa P, Piard F, Camus P. Pleuropulmonary changes induced by ergoline drugs. *Eur Respir J* 1996;9:1013-1019.
3. Hamada K, Nagai S, Kitaichi M, Jin G, Shigematsu M, Nagao T, Sato A, Mishima M. Cyclophosphamide-induced late-onset lung disease. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 2003;42:82-87.
4. Malik SW, Myers JL, DeRemee RA, Specks U. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use. Two distinct patterns. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996;154:1851-1856.
5. American thoracic society. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. American thoracic society (ats), and the european respiratory society (ers). *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000;161:646-664.
6. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ. An official ats/ers/jrs/alat statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;183:788-824.
7. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, Gauldie J, Camus P, Bonniaud P. Tgf-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 2007;179:6043-6051.
8. Decolonne N, Wettstein G, Kolb M, Margetts P, Garrido C, Camus P, Bonniaud P. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *The European respiratory journal* 2010;35:176-185.
9. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:13180-13185.
10. Rock JR, Barkauskas CE, Crouse MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, Hogan BL. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:E1475-1483.
11. Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, Marchal-Somme J, Hazoume A, Gauldie J, Gunther A, Micheau O, Gleave M, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. Inhibition of hsp27 blocks fibrosis development and emt features by promoting snail degradation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013;27:1549-1560.
12. Welge-Lussen U, May CA, Eichhorn M, Bloemendal H, Lutjen-Drecoll E. Alphas-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Investigative ophthalmology & visual science* 1999;40:2235-2241.
13. Yu AL, Fuchshofer R, Birke M, Priglinger SG, Eibl KH, Kampik A, Bloemendal H, Welge-Lussen U. Hypoxia/reoxygenation and tgf-beta increase alphas-crystallin expression in human optic nerve head astrocytes. *Experimental eye research* 2007;84:694-706.
14. Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:8802-8806.

15. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of clinical investigation* 1997;100:768-776.
16. Brady JP, Garland DL, Green DE, Tamm ER, Giblin FJ, Wawrousek EF. Alphas-crystallin in lens development and muscle integrity: A gene knockout approach. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001;42:2924-2934.
17. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. Tgf-beta and smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 2005;175:5390-5395.
18. Foley-Comer AJ, Herrick SE, Al-Mishlab T, Prele CM, Laurent GJ, Mutsaers SE. Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing. *Journal of cell science* 2002;115:1383-1389.
19. Lv ZD, Na D, Ma XY, Zhao C, Zhao WJ, Xu HM. Human peritoneal mesothelial cell transformation into myofibroblasts in response to tgf-ss1 in vitro. *International journal of molecular medicine*;27:187-193.
20. Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, Kelly MM. Transient overexpression of tgf- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16:425-436.
21. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney international* 2003;63:1530-1539.
22. Nasreen N, Mohammed KA, Mubarak KK, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, Antony VB. Pleural mesothelial cell transformation into myofibroblasts and haptotactic migration in response to tgf-beta1 in vitro. *American journal of physiology* 2009;297:L115-124.
23. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, Hensel E, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, Nathan SD, Antony VB. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*.

Figure legends

Figure 1: *α B-crystallin is expressed in the pleura of fibrotic lungs.*

A) α B-crystallin immunohistochemistry. I- Representative non IPF patient (n=4), II- Pleura from IPF patients (n=6). Pleural cells are α B-crystallin positive. Magnification, 200x.

B) α B-crystallin immunohistochemistry on lung tissues from mice that received either a control adenovirus (AdDL, I) or the TGF- β 1 encoding adenovirus (AdTGF- β 1, II and III) intrapleurally. A representative image obtained at day 8 after adenovirus administration is shown (200x).

Figure 2 *α B-crystallin KO mice are protected from bleomycin/CB-induced pleural fibrosis.*

A) Representative histology of WT and α B-crystallin KO mice lungs 21 days after intrapleural administration of NaCl or Bleomycin/CB. Masson Trichrome staining 200x. (n=10). Polarised light photography of lung sections stained with Picrosirius Red (lower panel) from WT and KO mice at D21. Representative images are shown (n=8).

B) Collagen quantification using a histomorphometric method in lungs from WT and KO mice at D21. Mean \pm SEM, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, n=5/group. Measures were performed on the pleural, sub-pleural and parenchyma areas.

Figure 3 *α B-crystallin KO mice are protected from AdTGF- β 1-induced pleural fibrosis.*

A) Representative histology of WT and α B-crystallin KO mice lungs 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL (control). Masson Trichrome staining 200x. (n=8). Representative images are shown.

B) Total mouse TGF- β 1 was measured by ELISA on PLF from WT and KO mice 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL. Mean \pm SEM, *p \leq 0.05, n=6/group.

B) Collagen quantification using a Sircol assay and a histomorphometric method in lungs from WT and KO mice at D10. Mean \pm SEM, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, n=6/group. Measures were performed on the pleura.

D) HSP47 staining on lung sections from WT and KO mice 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL.

E) α -SMA staining on lung sections from WT and KO mice 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL.

Figure 4 *The lack of α B-crystallin KO impairs the TGF- β 1 pathway in vivo and in vitro.*

A) RNA levels of Human and mouse TGF- β 1, PAI-1, and α B-crystallin, were analyzed by quantitative PCR on lung tissues from WT and KO mice, 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL. Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, $n=3$ /group.

B) RNA levels of α B-crystallin, TGF- β 1, α -SMA and PAI-1 were analyzed by quantitative PCR after rTGF- β 1 treatment in Met5A cells transfected with either scrambled siRNA (control) or α B-crystallin specific siRNA. Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, $n=3$ /group.

Figure 5 *The lack of α B-crystallin KO impairs Smad4 nuclear localisation and pleural cell migration.*

A) Smad4's cellular localisation was determined by immunofluorescence on Met5A cells transfected with an α B-crystallin specific siRNA or scrambled siRNA (control) and/or treated with rTGF- β 1. Representative images are shown ($n=4$).

B) Scratch test performed on Met5A cells transfected with an α B-crystallin specific siRNA or scrambled siRNA (control) and treated with rTGF- β 1. Representative images at T0 and T48h are shown ($n=4$). Magnification x50 (I and II) and x100 (III and IV). Brdu test (lower panel) showing no effect of α B-crystallin inhibition on cell proliferation at T0 and T48.

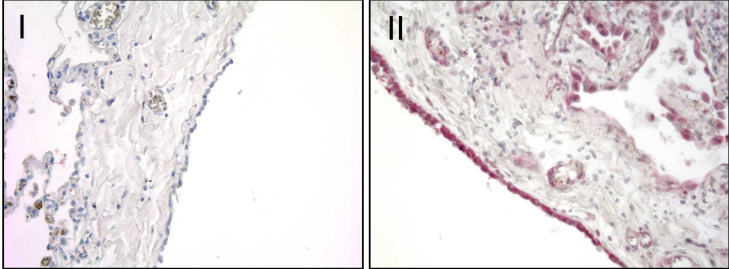
Figure 6 *The lack of α B-crystallin KO impairs pleural cell migration in vivo.*

Pleural cells were stained with β -galactosidase using intrapleural injection of AdLacZ combined to intrapleural injection of AdTGF- β 1 to induce pleural fibrosis. I- WT mice receiving AdLacZ + AdTGF- β 1. II- α B-crystallin KO mice receiving AdLacZ + AdTGF- β 1.

Figures

Figure 1

A



B

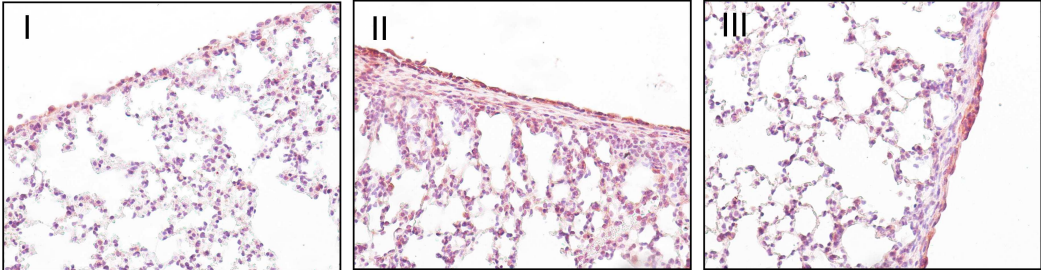


Figure 2

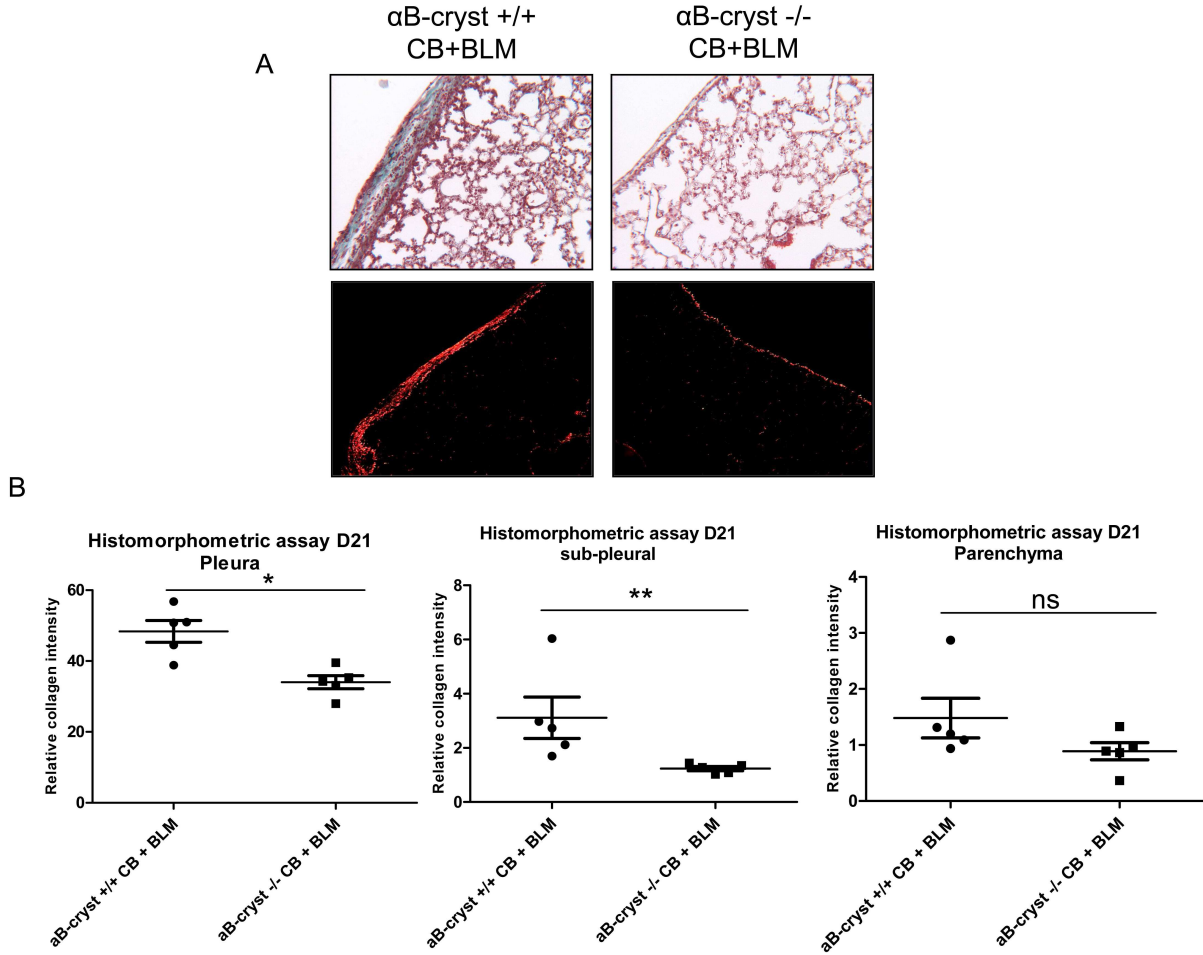


Figure 3

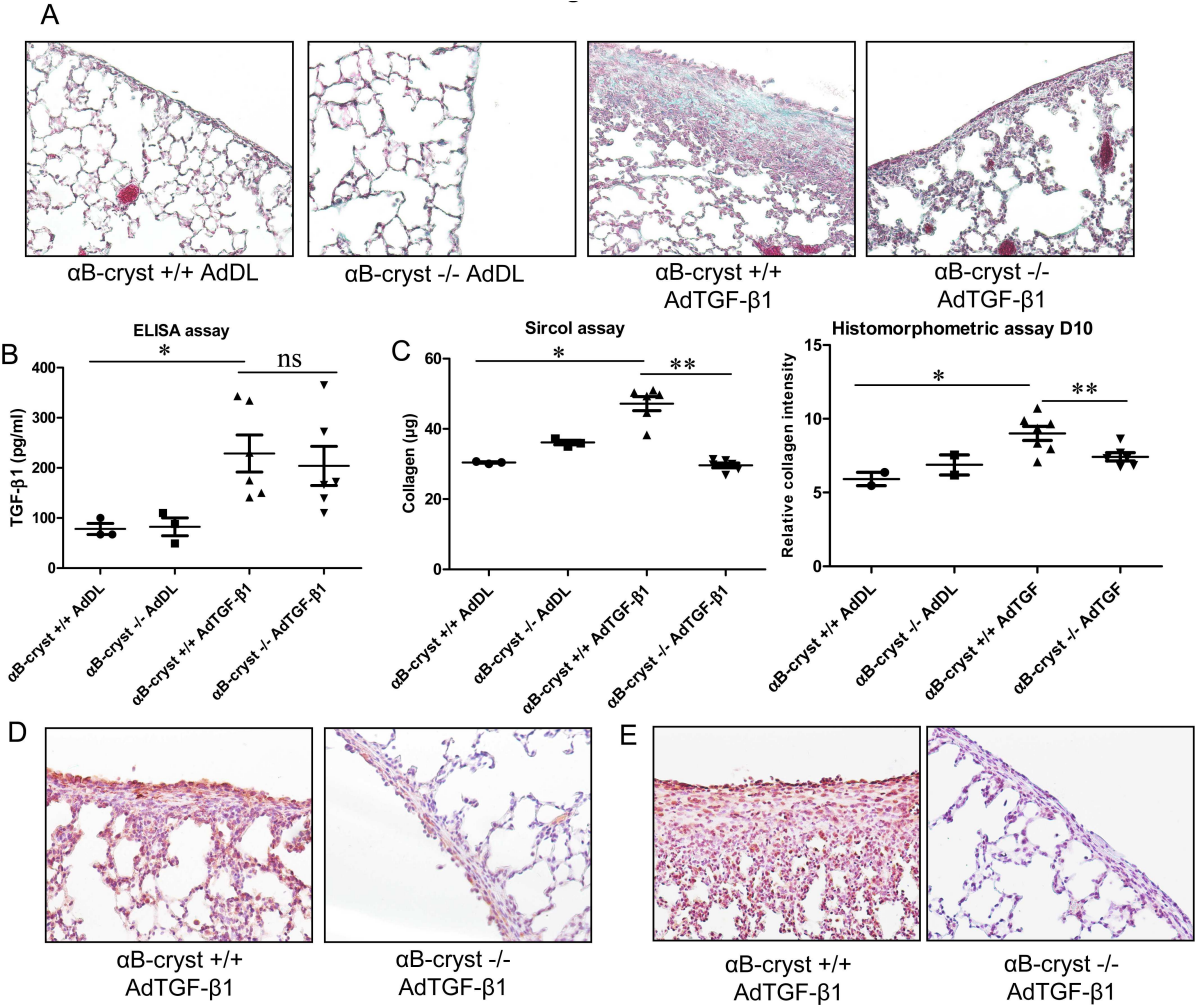


Figure 4

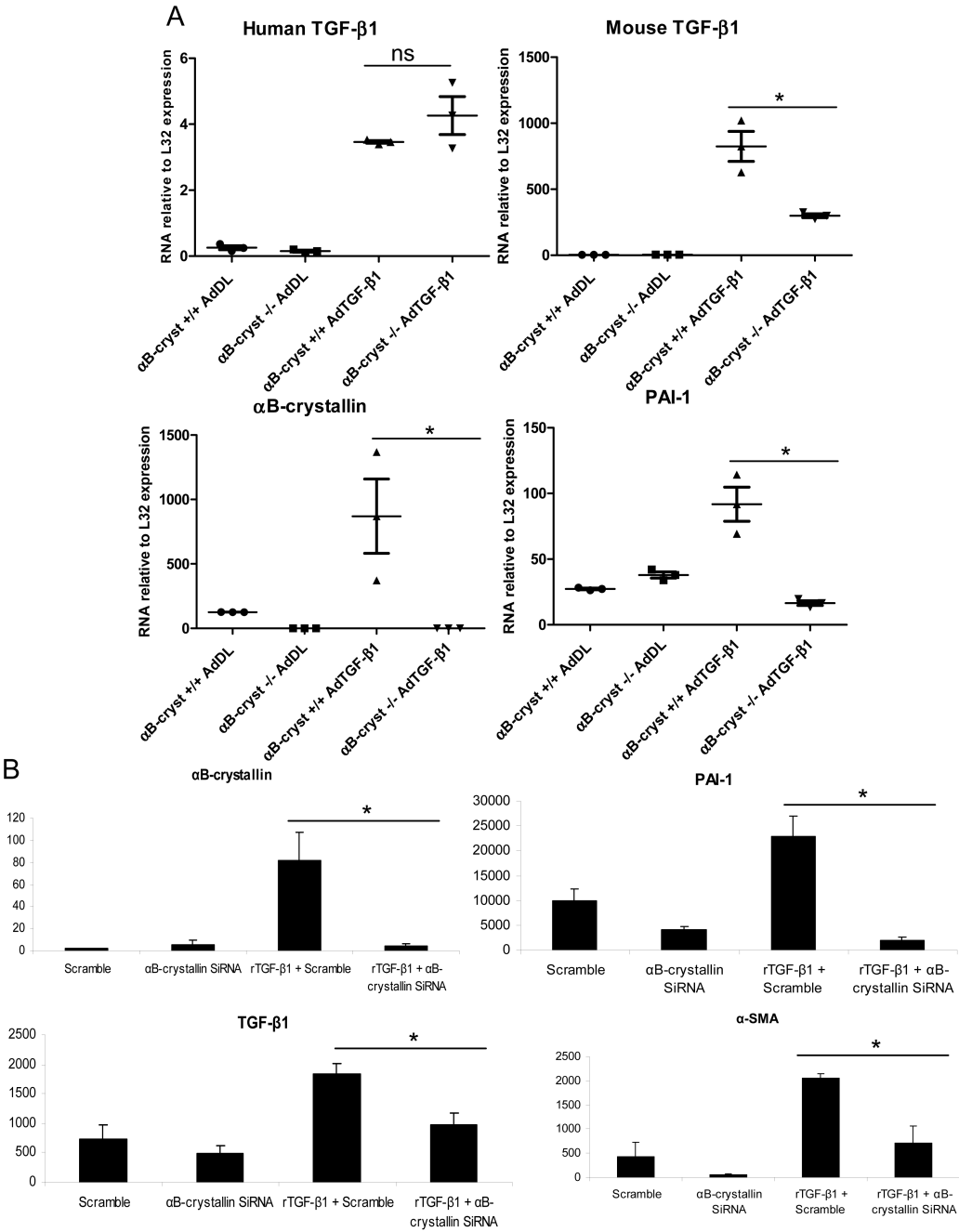


Figure 5

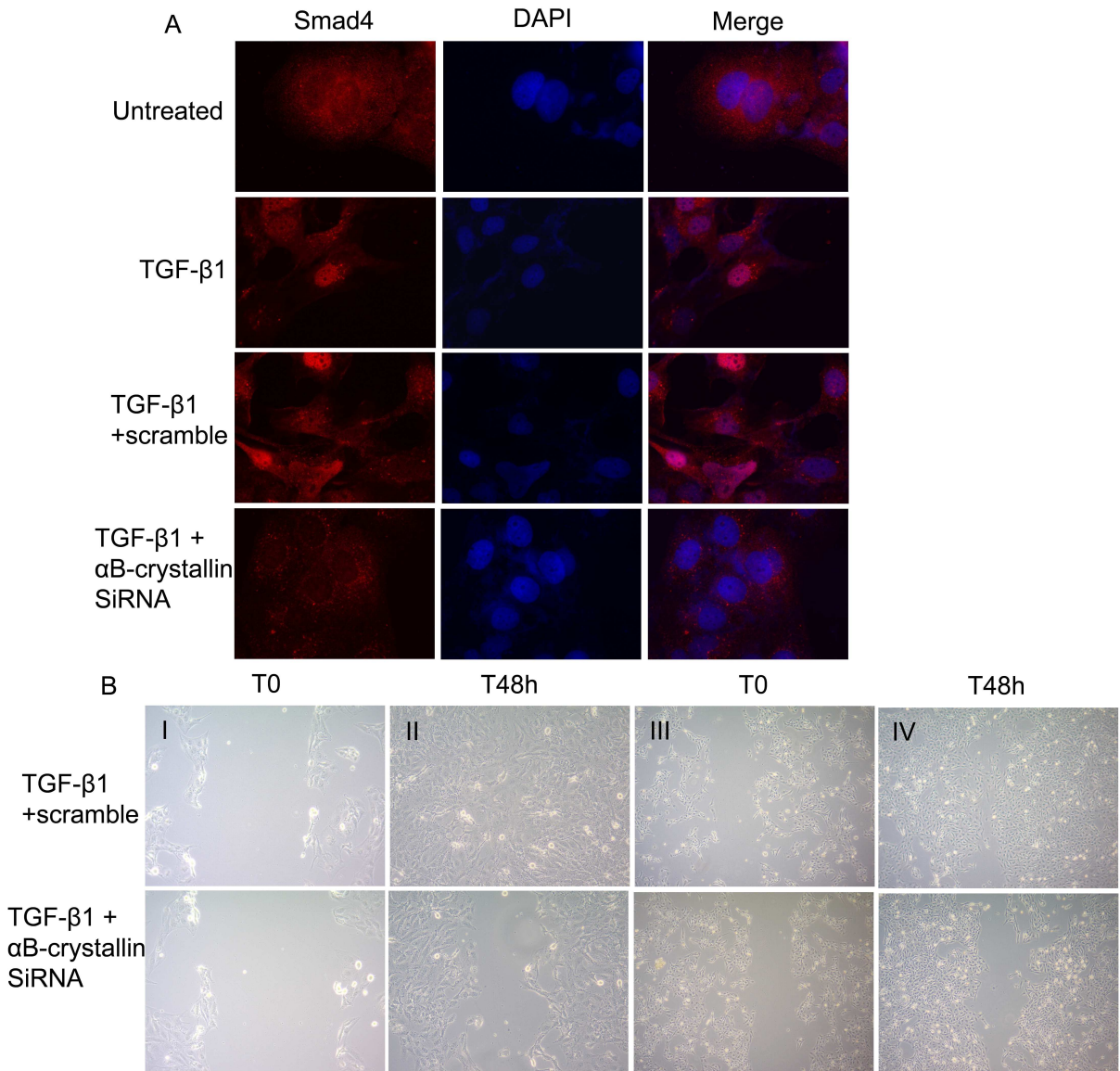
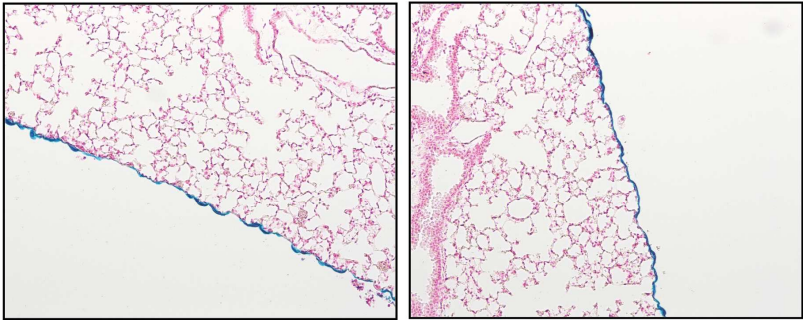
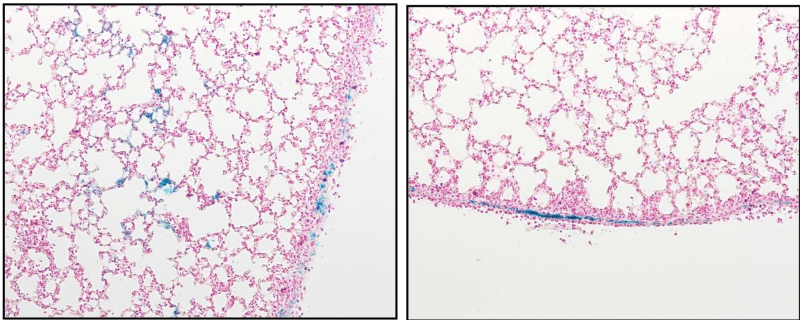


Figure 6



α B-cryst +/+ AdDL

α B-cryst -/- AdDL



α B-cryst +/+ AdTGF- β 1

α B-cryst -/- AdTGF- β 1

Heat shock proteins and fibrosis: good or evil?

Bellaye Pierre-Simon, Burgy Olivier, Causse Sébastien, Garrido Carmen, Bonniaud Philippe

Introduction

Fibrosis is an essential process of tissue healing promoting wound repair, re-epithelialization and restoration of the normal function of affected organs in cases of chronic injury. This protective mechanism can be highly deleterious when it is out of control, leading to organ failure and diseases such as, for example liver, cardiac, renal or pulmonary fibrosis. Whereas the process of fibrogenesis can be slightly different depending on the affected organ, the major steps remain identical (60, 61). Epithelial cell injury and apoptosis appeared to be one of the triggering events of the process. Epithelial cell death results in inflammatory cell recruitment and important pro-fibrotic cytokine secretion such as Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1). This pro-fibrotic environment leads to neighbouring cells activation and contributes to fibrosis progression. One of the major events during fibrosis is an abnormal and massive increase in extracellular matrix (ECM) deposition with notably collagen accumulation. Myofibroblasts are considered to be the key cells of the fibrotic process since they are the main responsible for ECM synthesis and are associated with disease progression (62). Several hypotheses have been proposed to explain the origin of these aggressive cells. Resident fibroblasts and circulating mesenchymal cells derived from bone marrow (fibrocytes) are thought to contribute to the pool of myofibroblast and ECM deposition (60, 63) under TGF- β 1 stimulation. Epithelial cells are also a major player in fibrogenesis since they can trans-differentiate to acquire a myofibroblastic phenotype and thus contribute to the accumulation of ECM in the lung tissue. This transformation, called Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT), is initiated by the Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), a growth factor essential for fibrotic processes. The fibrotic process is thus supported by both the apoptosis of epithelial cells leading to pro-fibrotic cytokines production, mainly TGF- β 1, but also by the myofibroblasts apoptosis inhibition producing excess ECM causing the

disease. This "paradox" has been widely discussed in the literature and the action of TGF- β 1 has been demonstrated (64, 65). Cells acquiring myofibroblastic properties are characterized by the up-regulation of myofibroblastic marker such as α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) and the loss of their epithelial markers such as E-cadherin (27).

Although TGF- β inhibits cellular proliferation of several cell types, it stimulates most mesenchymal cells, induces the secretion of ECM, inhibits myofibroblasts apoptosis and is therefore strongly pro-fibrotic (66). On the contrary, the ability of TGF- β to induce epithelial cell apoptosis may be another mechanism whereby fibrosis is promoted, since impaired epithelial repair is increasingly recognized as an important mechanism in fibrogenesis (67). Further, TGF- β 1 is found to be increased in fibrotic lung tissue from patient affected with pulmonary fibrosis (68) and the induction of severe prolonged pulmonary fibrosis in rodents by the overexpression of active TGF- β in the lung is a confirmation of its central role in fibrogenesis (53).

TGF- β is a 25 kDa protein consisting of two identical 12.5 kDa subunit chains joined covalently by disulphide bonds. There is at least three mammalian isoforms of TGF- β , designed β 1, β 2 and β 3 which all signal through the same surface receptors. The isoform TGF- β 1 is the most common secreted isoform, and is consistently found to be upregulated in fibrotic diseases (69). TGF- β signalling occurs essentially through two main receptors: TGF- β receptors type I and II, T β RI and T β RII respectively. These receptors are serine/threonine kinases. T β RII is constitutively active and after binding of its ligand, it activates T β RI via phosphorylation (70). In turn, T β RI activates a large number of intracellular signalling pathways through kinase activation, including the Smad pathway essential for fibrogenesis, to initiate gene expression (71, 72). Smad proteins are direct effectors of the activated TGF- β receptor complex and mediate signalling from cell surface receptors to the nucleus (73, 74). They can be grouped in three classes: Receptor-activated Smad (R-Smad: Smad1, 2,3, 5 and 8); common-mediator Smad (Co-Smad: Smad4) and inhibitory Smad (I-Smad: Smad6 and 7). Transphosphorylation of T β RI activates its kinase domain and phosphorylates R-Smads. Once activated, R-Smads bind to Smad4 and translocate to the nucleus to regulate transcription of a large

number of genes. The control of R-Smads activation is mediated in the cytoplasm by I-Smads that prevent binding/phosphorylation of R-Smad by the activated TGF- β receptor. Post-transcriptional levels of R-Smads are controlled, in part, by ubiquitin- proteasome-mediated degradation. Smurf proteins (Smurf 1 and 2) are E3-ubiquitin ligase able to ubiquitinate R-Smad and drive them to the proteasome system (75). Smad3 appears to be a crucial element in the signal transduction pathways involved in wound healing and fibrosis (76-78). Indeed, Smad3 deficient mice are protected against radiation-induced skin fibrosis (79) and against bleomycin-induced (80) and TGF- β 1-induced pulmonary fibrosis (19).

Cells are constantly exposed to several aggressions caused by many environmental factors (heat shock, oxidative stress, UV), pharmacologic agents exposition (heavy metal, alcohol, chemotherapy) or certain pathological conditions. Protective mechanisms should establish in cells in order to maintain their proper functions. The “heat shock response” was first highlighted in 1964 in drosophila by Ritossa (81, 82) and is characterized by the expression of a particular protein family, the Heat Shock Proteins (HSPs). HSPs are cellular proteins highly conserved in many species such as yeast, bacteria, plants, animals and humans.

In normal conditions HSP are able to interact with mature and immature proteins, to help folding of proteins synthesised *de novo*, to stabilize them, helping them to reach organelles such as the mitochondria or the endoplasmic reticulum, and participate to the protein turn-over (83). During stress the proper folding of proteins can be affected leading to a loss of protein function. The accumulation of misfolded proteins enhances the formation of aggregates which disrupt the cellular machinery and can lead to cell death. HSPs are able to support misfolded proteins in order to give them their proper folding. When refolding is impaired, misfolded proteins can also be driven by HSPs through the proteasome system where defective proteins will be destroyed (84, 85). While HSPs represent already 2-3% of total cellular protein at baseline, their expression is strongly induced after stress. This induction occurs through specific transcription factors, heat shock factors (HSF), which

have the ability to bind DNA at specific sites called Heat Shock Elements (HSE) found in promoter of HSPs genes (86). In normal conditions HSF-1 is sequestered in the cytoplasm by HSP70, HSP90 and several co-chaperones (87, 88). In stress conditions, the HSPs release HSF-1 to bind misfolded proteins causing the phosphorylation, the activation and the trimerisation of HSF-1 which migrates into the nucleus, interacts with HSE and finally induces the transcriptional activation of HSPs.

In mammals, heat shock proteins are classified into six major families according to their molecular weight: HSP47, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 and the small Heat Shock Protein family (sHSP) (89). Although HSPs share many common properties, each family has specific particularities in their cellular localization, their dependence of ATP to operate, their substrate specificity and the type of disease in which they may be involved.

According to their chaperon activity, HSPs are involved in many essential cellular mechanisms. For instance, several studies have shown that HSPs could inhibit apoptosis by interacting with proteins involved in this process such as cytochrome c, caspases or Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) (90-93). HSPs can also be involved in cytokines induction (94), inflammation (95) and cytoskeleton related diseases (96). Recruitment of inflammatory cells, abundant secretion of profibrotic cytokines, mainly TGF- β 1, increases in oxidative stress, apoptosis and degradation via the proteasom system are events occurring during fibrogenesis and that are prone to involve HSPs.

HSPs have been largely described to be involved in the pathogenesis of cancer (97). HSPs take part in several molecular mechanisms of cancerous cells, including proliferation (98), invasiveness (99) and angiogenesis (100, 101). In several reports, HSPs appeared beneficial for cancerous cells and thereby deleterious for patients affected by a wide range of cancer types (102). HSPs inhibition then appears to be of great interest to improve chemotherapy efficiency and cancer outcome (103-105). Fibrogenesis and cancer share several properties as both pathogenesis are characterized by genetic alterations, uncontrolled cell proliferation, altered cell interactions and communication and tissue invasion (106). The current review will discuss the involvement of HSPs in the process of fibrogenesis

and in established organ fibrosis and will show that although HSPs share several essential properties; their role in fibrotic diseases can sometimes be conflicting.

HSP90

HSP90 is the most abundant protein in eucaryotic cells as it represents 1% of the total pool of cellular proteins (107). The HSP90 family is composed of 4 main members: HSP90 α , HSP90 β , GP96 and TRAP1. All members belonging to the HSP90 family require ATP for their activity and are induced by several stresses.

GP96 (Glycosylated Protein 96) is a molecular chaperon localised in the endoplasmic reticulum (ER) which is responsible for protein maturation and proper folding of newly synthesised proteins. Recently GP96 has been shown to act on the immune system activation. Therefore, some studies report that GP96 could participate to antigen presentation especially by antitumoral antigen chaperoning (108). GP96 has also been demonstrated to have a role in reticulum endoplasmic stress (ER-stress(109)). Recent articles showed an implication of ER-stress in epithelial injury at the origin of fibrosis (110, 111). However, the involvement of GP96 in ER-stress and fibrosis has not been investigated yet.

The role of TRAP1, Tumor necrosis factor Receptor-Associated Protein 1, is not well understood. It is known to be localised into the mitochondria. Nonetheless, despite its similarity to HSP90 it does not interact with usual client proteins of the HSP90 family.

HSP90 α (HSP86) and HSP90 β (HSP84) are the two main member of the HSP90 family. Both isoforms result from a duplication of the original gene and share 86% of homology. Three domains are composing HSP90: the N-terminal domain serve to bind ATP and the central domain is required for ATPase activity and client proteins whereas the C-terminal domain is necessary to allow HSP90 dimerisation. HSP90 acts mainly as homodimers (α - α or β - β), even if it can also form heterodimers (α - β) or monomers. Briefly, as a flexible dimer HSP90 is able to bind a client protein, then the hydrolysis of an ATP molecule by HSP90 results in a conformational change stabilising the client protein (112).

HSP90 is also involved in cytoskeleton stabilisation by binding actin and tubulin. This interactions preserve the cellular integrity after stresses and the intra-cytoplasmic localisation of proteins (113) suggesting a role of HSP90 in cytoskeletal changes often observed during fibrogenesis.

The recent finding of specific inhibitors gave new clinical interest about HSP90. 17-AAG (17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin), derivated from the geldanamycin, is a chemical compound able to specifically bind the ATP-binding site of HSP90 thereby inhibiting its activity. 17-AAG is now on clinical trial phase III for its anti-tumoral properties. This compound has a high therapeutic potential as by inhibiting HSP90 it could sensitize cells to cytotoxic agents used for chemotherapy. Furthermore, in cancer cell, the affinity of HSP90 for ATP is increased by 100 fold. As 17-AAG mimics ATP, its affinity in tumoral cells is enhanced giving an anti-tumoral specificity to this inhibitor (114).

Although the number of studies linking HSP90 and fibrogenesis is limited, some recent articles relate a beneficial effect of HSP90 inhibitors on tissue fibrosis. Noh *et al.* nicely demonstrated that 17-AAG was able to prevent fibrotic events, such as α -smooth muscle actin (α -SMA, myofibroblast marker), ECM components (fibronectin and collagen I) upregulation and E-cadherin (epithelial marker) downregulation, *in vitro* using kidney cells lines stimulated with rTGF- β 1 and a murine model of renal fibrosis in obstructed kidney (115). Similar results were found in liver fibrosis where the HSP90 inhibitor hampered the activation and reduce survival of hepatic stellate cells (HSCs), the major participants in hepatic fibrosis. Indeed, 17-AAG downregulated collagen I and α -SMA expression levels and induced apoptosis of HSCs *in vitro* (116). Further, HSP90 inhibitor totally abrogated EMT in lung epithelial cells (A549 and H658) by inhibiting TGF- β 1 induced E-cadherin downregulation and blocked N-cadherin, α -SMA and vimentin up-regulation. These results were correlated with inhibition of TGF- β 1-induced changes in cell morphology and stress fiber formation in lung epithelial A549 cells which might be of importance in context of fibrosis (117).

Several mechanisms have been proposed to explain the role of HSP90 in fibrotic processes. Recent articles based on kidney and lung cell lines showed that 17-AAG was able to block the entire TGF- β 1 signalling pathways abrogating Smad2/3, Akt, GSK-3 β , and ERK phosphorylation (115, 117-119). Indeed, HSP90 inhibition prevented the transcription of TGF- β 1 target genes thus inhibiting the EMT process (117, 118). Authors demonstrated that HSP90 inhibition by 17-AAG countered the protective role of HSP90 on TGF- β 1 receptors (mainly TGF- β type II receptor, T β RII) by decreasing the interaction between HSP90 and T β RII and leading to T β RII degradation by the ubiquitin-proteasome system. They also identified that Smurf2 was responsible for T β RII degradation in absence of HSP90 (115, 118, 119).

As activated hepatic stellate cells (HSCs) have been demonstrated to be the major participants in hepatic fibrosis, inactivation and apoptosis induction of those cells has become an important antifibrotic therapeutic strategy. Regarding the anti-apoptotic functions of HSPs, HSP90 inhibitors (17-AAG, VER-49009 and VER-49009M) have been demonstrated to inhibit proliferation (120) and favour apoptosis (116) of activated hepatic stellate cells (HSCs). Activated HSCs are the most important ECM producer during hepatic fibrosis and NF κ B is an essential mediator for HSCs activation and survival (121). During HSCs activation, HSP90 chaperons the Glucocorticoid receptor (GR) which is a binding partner of both HSP90 and NF κ B. This sequestration of GR by HSP90 liberates NF κ B and favours its nuclear translocation resulting in HSCs activation. In this context, the inhibition of HSP90 by 17-AAG enhances GR/NF κ B complex formation and prevents NF κ B signalling activation (116). In addition, 17-AAG inhibited the activation of the HSP90 client protein Akt which also participates to NF κ B activation (116, 120). Therefore, HSP90 inhibition was able to induce HSCs apoptosis by disrupting NF κ B signalling through two distinct ways, inducing GR/NF κ B complex formation and inactivating Akt. Furthermore, 17-AAG also suppressed HSCs activation prior to apoptosis induction as it reduced α -SMA expression and TGF- β -induced collagen synthesis (116).

The chaperon activity of HSP90 on both TGF- β and the Glucocorticoid receptor participates to fibrotic signalling activation (TGF- β and NF κ B pathways). The inhibition of this HSP thus may prevent fibrotic events and might be of interest in new drug development to limit fibrotic disorders.

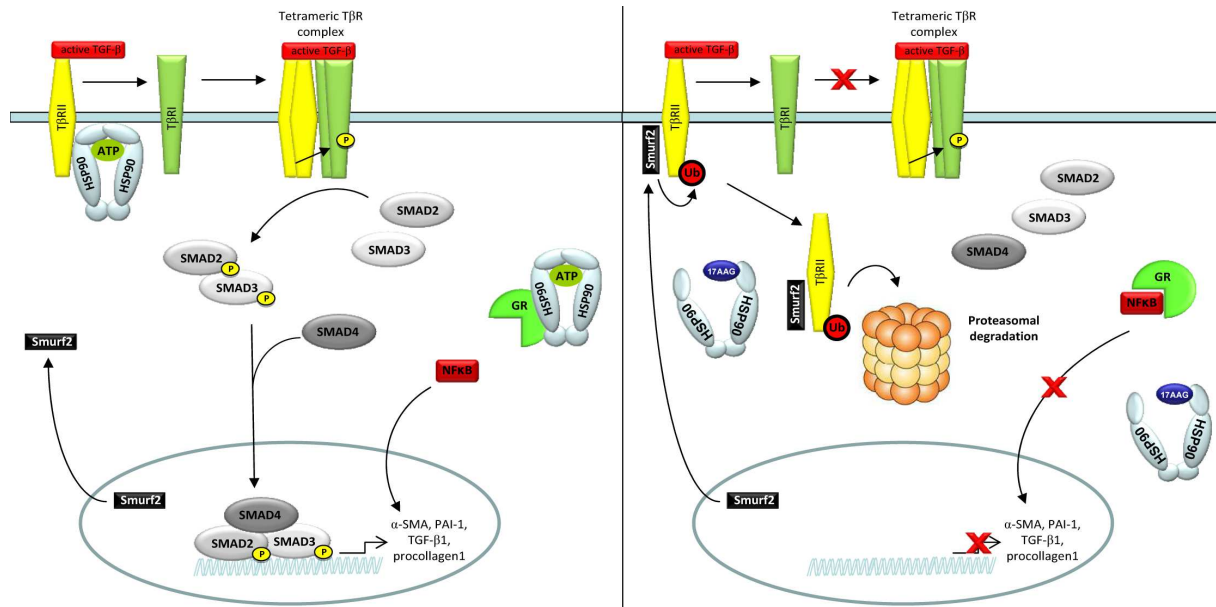


Figure 1: HSP90 inhibition hampers the TGF- β 1 pathway

Left: HSP90 forms a complex with T β R11 inhibiting its ubiquitination and degradation by the proteasome. In parallel, HSP90 binds the Glucocorticoid Receptor (GR) enabling NF κ B nuclear translocation and activity. Right: 17 AAG binds the ATP-binding domain of HSP90 and therefore inhibits its activity. The disruption of the HSP90/T β R11 complex allows the binding of Smurf2 on T β R11 thus inducing its ubiquitination and degradation. 17AAG also disturbs GR/HSP90 complex enabling the interaction between GR and NF κ B. This induces the sequestration of NF κ B in the cytoplasm and inhibits its activity.

HSP70

There are eight members composing the HSP70 family which have high homologies and are well conserved in several organisms from bacteria to human. HSP70 family proteins are certainly the most studied HSP concerning immunity, cancer and fibrosis. Among HSP70 family, HSC70 (Heat Shock Cognate 70), HSP70.2, GRP75 (Glucose-Regulated Protein 75), GRP78 and HSP70 are constitutively expressed and participate to cellular homeostasis whereas HSP70 (HSP72) and HSP70-6 are inducible in stress conditions (122).

HSP70 (HSP72) is the major member of the family and its function is ATP-dependant. It participates to protein aggregation prevention by redirecting unfolded or misfolded proteins to the proteasomal degradation system. This HSP also has a role on apoptosis and participates, under stress conditions, to ribosome translocation and assembly (123).

HSP70 operates in cooperation with a co-chaperon, HSP40, which helps client proteins to bind the peptide binding domain of HSP70. The hydrolysis of ATP at the ATP-binding domain of HSP70 induces a conformational change which allows HSP70 to capture client proteins. The fixation of another ATP molecule to HSP70 releases the client protein properly folded (124). If the client protein is not functional it can bind again to HSP70 or other HSP, or it can be driven to the proteasome system for degradation.

The main studied function of HSP70 concerns its anti-apoptotic role as it is able to bind several molecules that are involved in multiple apoptotic pathways. Thus, HSP70 has been shown to inhibit both caspase-dependant and independant apoptotic pathways by inactivating Apaf-1 and AIF (apoptosis-inducing factor), two key factors of caspase-dependent and caspase-independent apoptosis respectively (125).

HSP70 is highly overexpressed in cancerous cells protecting them from apoptosis. For instance, it has also been linked to mitochondrial apoptosis by its ability to block Bax translocation to the mitochondria and mitochondrial protein release (126) and by increasing the stability of Bcl-2 (127). For these reasons HSP70 inhibition has become of major interest to improve anti-tumoral therapy.

Unlike HSP90, HSP70 inhibitors are recent and their number is limited. Peptidic aptamers inhibiting HSP70 have been recently developed (105) and a pharmacologic molecule, gefitinib, an EGFR inhibitor utilized in cancer therapy, has been demonstrated to inhibit HSP70 expression (128). However, most recent studies demonstrate a protective role of HSP70 against fibrogenesis. Thus, several methods have been developed to induce HSP70 using, for instance, HSP70 transgenic mice, hyperthermia or pharmacologic agents such as geranylgeranylacetone (GGA).

The protective role of HSP70 on fibrotic processes has been recently well documented. In 2007, Wakisaka *et al.* demonstrated *in vitro* on primary cardiac fibroblast and *in vivo* that heat shock prevented Angiotensin-II-induced cardiac fibrotic response in the atrium via HSP70 up-regulation. Cardiac atrial fibrosis is known to be driven by an increased activity of ERK activating kinases MEK1/2 leading to ERK1/ERK2 phosphorylation exacerbation (129). Angiotensin-II activates MEK-ERK cascade through binding to AT1-receptor causing fibroblast proliferation and activation favouring atrial fibrosis (130). HSP70 up-regulation induced by heat shock could lead to attenuation of Angiotensin-II-induced signals resulting in a negative regulation of ERK1/ERK2 phosphorylation and finally inhibits fibroblasts differentiation into myofibroblasts by preventing α -SMA expression, TGF- β 1 secretion and ECM synthesis (131).

GGA is an anti-ulcer drug that has been reported to induce HSP70 *in vitro* and *in vivo* resulting in fibrosis outcome improvement concerning several organs such as lung and kidney (132-134). GGA has been demonstrated to prevent most important events occurring during fibrotic processes. It reduces significantly organ damages after lung and kidney fibrosis induction and leads to the limitation of ECM deposition. *In vivo*, GGA-mediated HSP70 up-regulation also prevented myofibroblasts differentiation and EMT followed by a decreased number of α -SMA positive cells (132, 133). In line with its cytoprotective role, HSP70 up-regulation prevented epithelial apoptosis in lung and kidney, one of the major triggering events of fibrogenesis. In a study performed in 2009 based on HSP70 induction by GGA in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model, authors demonstrated a decrease in the number of recruited inflammatory cells. Indeed, the expression level

of MIP-2, the most specific chemokine for neutrophils recruitment, was dramatically decreased by GGA treatment after lung fibrosis induction. HSP70 up-regulation in mice also protects lung epithelial cells from apoptosis and inflammation induced by bleomycin thus preventing fibrosis (133).

In vivo evaluation of GGA effects on obstructed kidney models showed limited damages and reduction in ECM deposition. TGF- β 1 induced myofibroblasts differentiation via EMT also appeared limited by HSP70 up-regulation *in vitro* and *in vivo* correlated with E-cadherin expression preservation and α -SMA production prevention. Apoptosis is a part of triggering events in fibrogenesis. Interestingly, Mao *et al.* also reported that HSP70 up-regulation via GGA in a kidney fibrosis model reduced renal tubular TGF- β 1-induced apoptosis, in accordance with its well known cytoprotective effect (135).

In 2010, Tanaka *et al.* demonstrated that transgenic mice overexpressing HSP70 (tgHSP70) were protected from lung inflammation and fibrotic lesions caused by bleomycin. Authors showed that TGF- β 1 production and pro-inflammatory cytokines expression after bleomycin administration was lower in tgHSP70 mice compared to WT mice explaining the limited fibrosis observed in mice that overexpress HSP70. *In vitro*, HSP70 inhibition was able to favour the EMT process induced by TGF- β 1 but could not activate fibroblasts (132). The same team showed in 2011 that administration of an HSP70 inhibitor, gefitinib, in mice lungs exacerbates pulmonary fibrosis induced by bleomycin (128).

In a model of kidney fibrosis, Zhou *et al.* proposed a mechanism of action of HSP70 on TGF- β pathway explaining the protective effect of this HSP on fibrogenesis. They showed that HSP70 induction via GGA *in vivo* and *in vitro* inhibited phosphorylation and nuclear translocation of Smad3 abrogating EMT and fibrosis (134). Apparently the peptide binding domain (PDB) of HSP70 was necessary for the protective function of HSP70 since the overexpression of a HSP70 mutant lacking the PBD was not able to prevent neither EMT nor fibrosis in their model. This suggests that HSP70 act as a chaperon on Smad3 via the PBD and sequestered it in the cytoplasm hampering the TGF- β 1 pathway necessary for fibrogenesis (134). Interestingly, another study revealed a similar effect of HSP70 on phosphorylation and nuclear translocation of Smad2 on a kidney cell line (136).

Another *in vitro* study showed an inhibitory effect of HSP70 induction on TGF- β 1 pathway in which authors proposed a different mechanism involving a direct role of HSP70 on TGF- β receptors I and II (T β RI and T β RII). Indeed, they showed that HSP70 upregulation by Geldanamycin decreased the endogenous expression level of T β RI and T β RII in a time and dose-dependent manner (137). Geldanamycin induced the formation of a complex between HSP70 and TGF- β receptors causing T β RI and T β RII ubiquitination and proteasomal degradation. The precise mechanism involved is not clearly defined yet but authors suggest the role of the protein CHIP, a chaperon-dependent E3 ubiquitin ligase. Indeed, CHIP is known to regulate T β RI stability and to interact with HSP70 (138).

Further, Kahloon *et al.* recently highlighted a role of an autoimmune response in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) severity in humans. Indeed, they demonstrated an increase in HSP70 autoantibodies in patient affected by IPF which was correlated with more severe Forced Vital Capacity (FVC) decline and a significantly higher mortality at one year (139). Authors found that anti-HSP70 autoantibodies of IPF patients interfere with the normal immune response and cause pro-inflammatory reaction in lungs. Indeed, anti-HSP70 autoantibodies were able to activate monocytes and lymphocytes leading to an increase in IL-8 and IL-4 production, two cytokines involved in pulmonary fibrosis progression (139). For the first time, autoimmune response against HSp70 has been linked to fibrosis outcome in human individuals. These findings suggest that the study of autoimmune response against HSP70 autoantibodies could give useful clinical information in IPF patients, and could help for the understanding of IPF progression (139, 140). Further, Cai *et al.* demonstrated that extracellular HSP70 had a role on cardiac fibrosis in a pressure overload model. Indeed, inhibition of extracellular HSP70 by an anti-HSP70 antibody reduced cardiac hypertrophy and fibrosis. Therefore, extracellular and intracellular HSP70 appear to have contradictory functions as extracellular HSP70 aggravated cardiac fibrosis whereas intracellular HSP70 had a protective effect on fibrogenesis (141). Extracellular HSP70 inhibition limited the binding of HSP70 to TLR4 thus reducing macrophage infiltration, inflammation and TGF- β 1 production in the heart. Authors presented extracellular HSP70 as a new therapeutic target against cardiac fibrosis (141).

The number of study revealing a role of HSP70 up-regulation on the TGF- β pathway might explain the interest of researchers for this HSP in the context of fibrogenesis. The inhibition of this major pathway of fibrogenesis is, indeed, a key for regulating myofibroblasts differentiation and subsequent ECM deposition causing fibrotic diseases. HSP70 seemed to be involved at several step of TGF- β pathway including Smad2 and Smad3 phosphorylation and TGF- β receptors stability. From this, chemical agents inducing HSP70 expression could represent interesting molecules for further therapeutic therapy triggering fibrotic disorders.

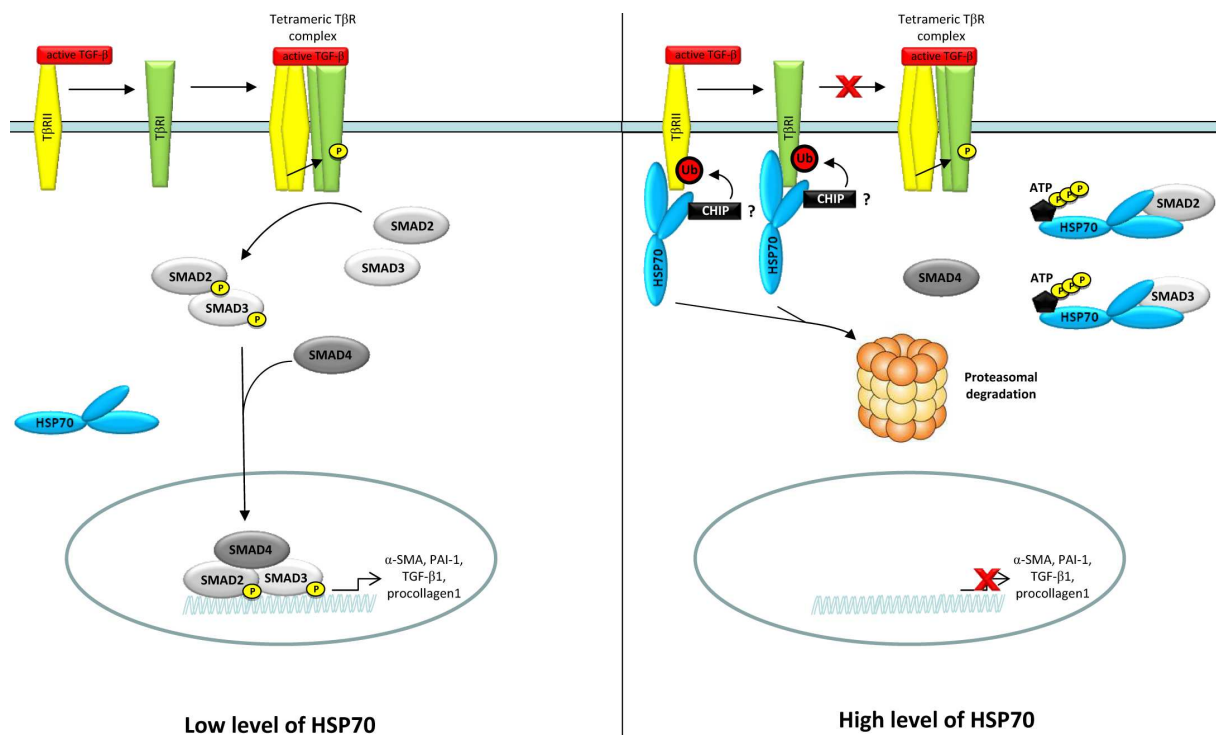


Figure 2: HSP70 induction disturbs the TGF- β 1 pathway

Left: In case of low HSP70 level the TGF- β 1 pathway is not affected. Right: HSP70 is able to bind Smad2 and Smad3 limiting their phosphorylation and nuclear translocation hampering the TGF- β 1 signalisation. HSP70 is also able to bind T β R1 and T β R2 to induce their ubiquitination and proteasomal degradation. Even if the mechanism is not fully understood, authors suggest the role of the E3-ubiquitin ligase CHIP in this process.

HSP110

High-weight HSPs constitute a heterogeneous group of stress protein belonging to the HSP70 superfamily (142). Divers HSPs of 110kDa are encoded in mammary: HSPA4, HSPA4L, HSP105 and HSP110 are cytosolic proteins while GRP175 is related to the endoplasmic reticulum. HSP110 are inducible chaperons contrary to HSP4A. These stress proteins are largely conserved from yeast to human (143).

Their structure is close to HSP70 and is essentially composed of a peptide binding domain (PBD) and a nucleotide binding domain able to bind ATP. HSP110 chaperones seem to share different functions. *In vitro* HSP110 can prevent protein aggregation (144) and some studies showed that HSP110 plays a role in protein refolding in mammalian cells (145).

HSP105, a member of HSP110 family, has been shown to interact with HSP70 in a murine cell model. In this complex, HSP105 is shown to be an important factor in the HSP70 refolding machinery by acting as nucleotide exchange factor (146, 147).

Proteins belonging to the HSP110 family seem to be involved in many human diseases; however their role in fibrosis remains poorly described. Using a cardiac pressure overload murine model, Mohamed *et al.* highlighted the role of HSPA4 in cardiac hypertrophy and fibrosis. The expression of HSPA4 has been found to be upregulated in pressure overloaded hearts. Cardiac fibrosis induced by pressure overload was aggravated in HSPA4^{-/-} mice and correlated with an increase in interstitial fibrosis and an enhanced expression of collagen III and TGF- β 1 (148). The lack of HSPA4 was associated with the activation of several signaling pathways involved in cardiac hypertrophy development such as gp130/STAT3, CaMKII and calcineurin-NFAT (149). The authors also showed an increase of misfolded proteins in HSPA4^{-/-} cardiac cells causing an accumulation of polyubiquitinated proteins as a consequence of the alteration of chaperone activity normally driven by HSPA4 (148).

HSP47

HSP47 represents the most largely studied heat shock protein in the context of fibrogenesis in regards of its role on collagen biosynthesis. To date, this ATP-independent ER-glycoprotein is the only substrate-specific HSP. The C-terminus ER-retention signal RDEL-sequence drives HSP47 cellular localisation in the ER (150, 151). Even though HSP47 interact with other proteins (PDI, GRP78 and GRP94 (glucose-regulated HSPs) in the ER, its major role mainly concerns collagen maturation, biosynthesis and secretion. Its expression is always found in parallel to collagen biosynthesis and is totally excluded from non-collagen secreting cells (22, 152). The literature reveals that HSP47 could act at several steps during collagen maturation, preventing newly-formed procollagen chains aggregation and degradation in the ER (152), promoting stability of the triple-helical region of procollagen and aiding collagen secretion (22, 153, 154). An increase in HSP47 expression has been shown to be correlated with collagen deposition in fibrotic disorders affecting either liver (155), kidneys (156) and lungs (157). HSP47 as also become both a biomarker and a therapeutic target of great interest in fibrogenesis.

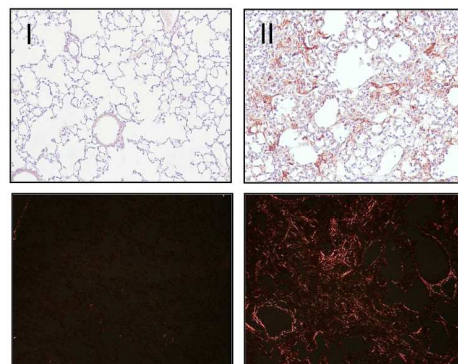


Figure 3: *HSP47 staining in fibrotic lung correlated with collagen up-regulation*

HSP47 is up-regulated in association with collagen during pulmonary fibrosis. I- Lung section from mice receiving NaCl intratracheally at D21. II- Lung section from mice receiving bleomycin intratracheally to induce pulmonary fibrosis at D21. Hsp47 immuno-staining (upper panel) and picosirius red staining for collagen (lower panel).

As collagen accumulation is the hallmark of fibrotic diseases, HSP47 has largely been used as a marker of fibrotic lesions and fibrosis progression. In rats, HSP47 has been shown to be link with collagen expression in fibrosis models affecting several organs. HSP47 mRNA has been demonstrated

to be upregulated in parallel with collagen I and III mRNAs during liver fibrosis (155). Likewise, elevated levels of HSP47 were found during kidney and peritoneal fibrosis also correlated with collagen deposition and disease progression (158-160). Concerning lung fibrosis, a study driven on a mouse model showed an increase in HSP47 level in cells expressing α -SMA and vimentin (myofibroblastic markers) (23). Another study has shown that HSP47 mRNA was also upregulated in myofibroblasts expressing α -SMA, in type II pneumocytes and in macrophages present in fibrotic areas (161). These results suggest that myofibroblasts may synthesize procollagen during the fibrotic process induced in lung through an upregulation of HSP47 mRNA which give an important role for this HSP in fibrogenesis. This association between HSP47 and collagen accumulation was confirmed in patient affected by Oral Submucous Fibrosis by Kaur *et al.* in 2001 (162). The co-expression of HSP47 and procollagens has also been shown in myofibroblasts and type II pneumocytes of individuals affected by pulmonary fibrosis (163).

More recently, researchers tried to better understand mechanisms involving HSP47 and tried to overcome HSP47 upregulation to develop new therapeutic strategies. The inhibition of HSP47 has thus become of great interest to limit or prevent fibrotic events *in vivo*. In 2007, Xia *et al.* designed a delivery system for HSP47 siRNA using cationized gelatin microspheres in an Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) model for kidney fibrosis. This delivery method prolonged the inhibitory effect of HSP47 expression compared to classical siRNA administration (14 days instead of 7 days). Localisation of the siRNA was found in tubular epithelial cells and in tubulointerstitial cells at days 7 and 14 in fibrotic mice. They demonstrated that the inhibition of HSP47 expression reduced type IV, III and I collagen expression and accumulation in mice affected by UUO and considerably ameliorated renal interstitial fibrosis (164). A similar method was used more recently showing impressive results on peritoneal fibrosis. Indeed, the delivery of HSP47 siRNA suppressed collagen and TGF- β 1 expression and macrophage infiltration therefore inhibiting the development of peritoneal fibrosis (165).

Similar results were found in intestinal fibrosis using IL-10 KO mice, which spontaneously develop colitis during aging. IL-10 KO mice develop characteristic fibrotic features with important collagen deposition associated with TGF- β 1 and HSP47 expression upregulation. Positive cells for HSP47 staining were found to be localized with collagen accumulation mainly in the lamina propria, muscularis mucosa, and submucosal area in the colonic tissues. Noting the correlation between HSP47 and collagen, the authors targeted HSP47 expression with HSP47 siRNA in IL-10 KO mice. As in renal fibrosis the local inhibition of HSP47 expression reduced drastically collagen deposition and ameliorated intestinal fibrosis (166).

Chen *et al.* also studied the role of HSP47 in keloid disease a fibroproliferative disorder affecting cutaneous cells. Their first study in 2006 was focused on keloid fibroblast cells transfected with an HSP47 siRNA. They demonstrated that following HSP47 inhibition intracellular and extracellular collagen was reduced (167). In 2010, the same authors studied HSP47 downregulation *in vivo* using a keloid animal model based on subcutaneously implantation of human keloid dermal tissues (168). After HSP47 downregulation *in vivo*, the volume of implants was reduced compared to control mice. This reduction was correlated with the reduction of collagen expression. From both studies they proposed that HSP47 overexpression in keloid fibroblasts and in keloid animal models could explain the excess of collagen deposition, therefore HSP47 inhibition could represent a new therapeutic approach *in vivo*.

In 2007 three other studies by Hagiwara *et al.* reported protective effect of HSP47 inhibition *in vivo* in several lung fibrosis models (169-171). Regardless the pulmonary fibrosis models used (paraquat-induced, bleomycin-induced, LPS-induced), HSP47 downregulation reduced lung injury and collagen deposition and improved lung morphology and function of rats. Even though in those study HSP47 siRNA were administrated after the induction of fibrosis, authors proposed that HSP47 inhibition might be of great interest to stop or even reverse the progress of fibrogenesis and resulting diseases.

Surprisingly, among the many publications highlighting the role of HSP47 in the process of fibrosis, few studies suggest a mechanism of action. A study performed in 2007 has shown a role of neutrophils in the HSP47 upregulation. The authors suggest that the α -defensins secreted by neutrophils during their recruitment to the site of tissue injury are capable of activating the MAPK pathway in neighboring epithelial cells thus inducing the increase of HSP47 expression (172). Furthermore, in a renal fibrosis model using human proximal tubular epithelial cells stimulated with TGF- β 1, Xiao *et al.* demonstrated that ERK1/2, JNK and MAPK inhibitors were able to block HSP47 expression induced by TGF- β 1. In their model, the inhibition of those pathways suppressed the overexpression of ECM proteins and PAI-1 thus limiting fibrogenesis. Authors suggest that during renal fibrosis TGF- β 1 would enhance HSP47 expression through ERK1/2 and JNK MAPK signalling pathways enhancing collagen synthesis (173). TGF- β 1 is not the only cytokine able to induce HSP47. IL1 β , an inflammatory cytokine, has been shown to upregulate, alone or in combination with TGF- β 1, HSP47 at the protein and mRNA level (174). TGF- β 1 and IL1 β were able to favor HSF1 nuclear localisation and enhance HSF1 trimerisation leading to an increase in HSF1 binding on specific gene response element such as HSP47 (Figure 4). The authors speculate that HSP47 could be a good target to prevent fibrogenesis as well as TGF- β 1 and IL1 β action, two important molecules during fibrogenesis development, able to induce HSP47 expression via HSF1 trimerisation (174).

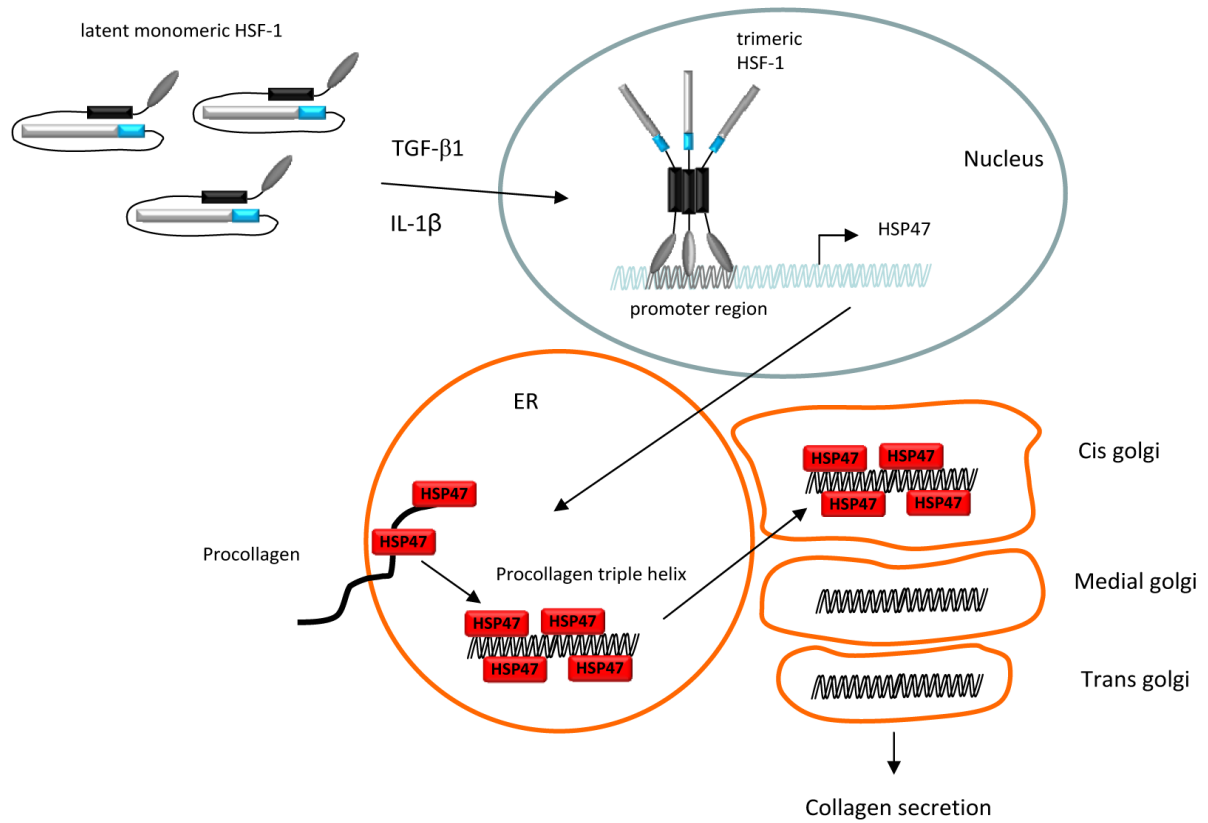


Figure 4: HSP47 favours fibrotic response through its role on collagen biosynthesis

Signal induced by TGF- β 1 and/or IL-1 β signalling triggers HSF1 nuclear translocation and trimerisation. HSF1 active trimers bind to response element on HSP47 promoter region and enhance HSP47 expression. HSP47 helps to procollagen stabilisation and procollagen triple helix formation. Therefore, HSP47 favours collagen secretion by activated cells promoting fibrosis.

HSP27

HSP27 belongs to a heat shock proteins family of low molecular weight, the small heat shock proteins (sHSP). It is the most studied and the most expressed at specific stages of development and cellular differentiation. Its basal expression is relatively low but largely increased during heat shock and various cellular stresses. HSP27 is constitutively expressed in the cytoplasm (175) but in case of heat shock it immediately translocates into the nucleus (176). The N-terminal domain contains a WDPF motif required for the formation of oligomers whereas the C-terminal domain is involved in the stabilisation of those oligomers. In the cell there is equilibrium between the dimeric forms of HSP27 and its oligomeric state. Oligomerisation is a dynamic process driven by the phosphorylation status of HSP27 (177). Phosphorylated HSP27 forms dimers and the dephosphorylated status of HSP27 drives its oligomerisation (178, 179). HSP27 can be phosphorylated on three serines located at the position 15, 78 and 82. This phosphorylation is regulated by MK2 (MAPKAP Kinase 2) and p38MAPK (180).

HSP27 is known to be involved in cytoskeleton dynamics. Indeed, the dephosphorylated form of HSP27 is able to bind to the terminal end of actin filaments inhibiting their polymerisation, whereas its phosphorylated form separates from actin allowing polymerisation (181).

Besides its role on actin, HSP27 has been shown to promote cell survival and to have anti-apoptotic properties. It can, for instance, favour protein ubiquitination and proteasomal degradation in stress conditions (182). HSP27 is able to drive the ubiquitination and degradation of the NF- κ B inhibitor, I- κ B α , thus allowing nuclear translocation of NF- κ B and activation of target genes promoting cell survival such as Bcl-2, Bcl-X_L and IAP (inhibitor of Apoptosis Protein) (182).

HSP27 has also been demonstrated to be overexpressed in cancerous cells protecting them from apoptosis and favouring their proliferation (183). In addition, HSP27 seemed to promote metastases formation through its role on cytoskeleton components and to favour resistance to chemotherapeutic agents (184-186). Choi *et al.* showed that HSP27 expression was directly responsible of colorectal cancer cell resistance to the chemotherapeutic agent irinotecan. By inhibiting HSP27 authors could decrease the resistance of those cells to the treatment (187).

Moreover, Zhuang *et al.* demonstrated that HSP27 inhibition sensitized lung cancerous cells, A549, to apoptosis induced by TRAIL (Tumor necrosis factor- α -Related Apoptosis-Inducing Ligand) (188).

The number of study investigating the role of HSP27 in fibrogenesis is limited. However, the up-regulation of HSP27 in lungs from patients affected by pulmonary fibrosis has been reported in cells located nearby fibroblastic foci, particular regions where ECM-producing cells are found during the disease (189). Another study showed that HSP27 was up-regulated in epithelial cells located around fibroblastic foci. They suggested that epithelial cell proliferation and migration could play a role in morphologic changes occurring in lung during pulmonary fibrosis (190). Two other articles showed that HSP27 was involved in the process of EMT. Vargha *et al.* showed in 2008 that HSP27 was upregulated *in vitro* during EMT observed in mesothelial cells from peritoneum whereas it was diminished *in vivo* during chronic EMT in dialysis induced peritoneal fibrosis. Authors suggested that the discordant HSP27 expression between *in vivo* and *in vitro* EMT might be correlated to morphological changes that are more important during *in vitro* TGF- β 1-induced EMT. Indeed, in their model, during *in vivo* EMT induced by peritoneal dialysis fluids cells underwent EMT but only some cells presented morphological changes into fibroblast like cells. *In vitro*, TGF- β 1 was associated with large morphological changes and α -SMA up-regulation. The correlation between α -SMA and HSP27 up-regulation might reflect the alteration of cytoskeleton induced by TGF- β 1 during the myofibroblast transformation of mesothelial cells. *In vitro*, HSP27 up-regulation protected cells from apoptosis induced by peritoneal dialysis fluids (191). Vidyasagar *et al.* suspected the involvement of HSP27 in renal fibrosis via its role on EMT. They showed that HSP27 was overexpressed during kidney fibrosis and that it was co-localised with TGF- β 1, α -SMA and E-cadherin. *In vitro*, they overexpressed HSP27 in renal epithelial cells and found that it induced E-cadherin expression and repressed the expression of Snail, the major transcription factor promoting EMT. Authors concluded that HSP27 had a protective role against fibrosis and that its up-regulation could slow down fibrosis and EMT processes (9). The same authors demonstrated in 2013 that *in vivo* HSP27 upregulation in tubular epithelial cells, using transgenic mice, lead to decreased fibrogenesis associated with declines in

phosphorylated p38MAPK, collagen III, and α -SMA following renal fibrosis induction. In their model, E-cadherin remained unchanged in tubular cells after fibrosis induction (192).

A recent study has investigated the role of HSP27 in pulmonary fibrosis. Authors highlighted the overexpression of HSP27 during EMT of epithelial and mesothelial cells during pulmonary and pleural fibrosis. Moreover, HSP27 was upregulated within fibroblastic foci *in vivo* in patient affected by pulmonary fibrosis. HSP27 induced phenotypic changes in cells which acquired a myofibroblast-like shape correlated with α -SMA upregulation and E-cadherin downregulation. Further, the inhibition of HSP27 *in vivo*, with OGX-427 an antisense oligonucleotides already in clinical trial in cancer therapy (193), protected rats from pleural fibrosis induced by TGF- β 1 overexpression. In addition to the inhibition of fibrosis, repression of HSP27 also inhibited the migration of pleural mesothelial cells transformed into myofibroblasts within the lung parenchyma as it is usually the case in the *in vivo* model of TGF- β 1 induced pleural fibrosis. The use of OGX-427 against pleuro-pulmonary fibrosis led to the establishment of a patent for further use in human therapy.

HSP27 has a protective role of the transcription factor essential for the induction of EMT, Snail. Indeed, HSP27 protected Snail from degradation by the proteasome leading to its nuclear accumulation and activation of these target genes inducing EMT (Figure 5). Thus, inhibition of HSP27 *in vivo* induced degradation of Snail and inhibited EMT making HSP27 a new therapeutic target for pulmonary fibrosis (51).

The role of HSP27 in fibrogenesis remains however uncertain and might be dependant of the organ affected as it seemed to have a protective function on renal fibrosis whereas its expression was deleterious in pleuro-pulmonary fibrosis.

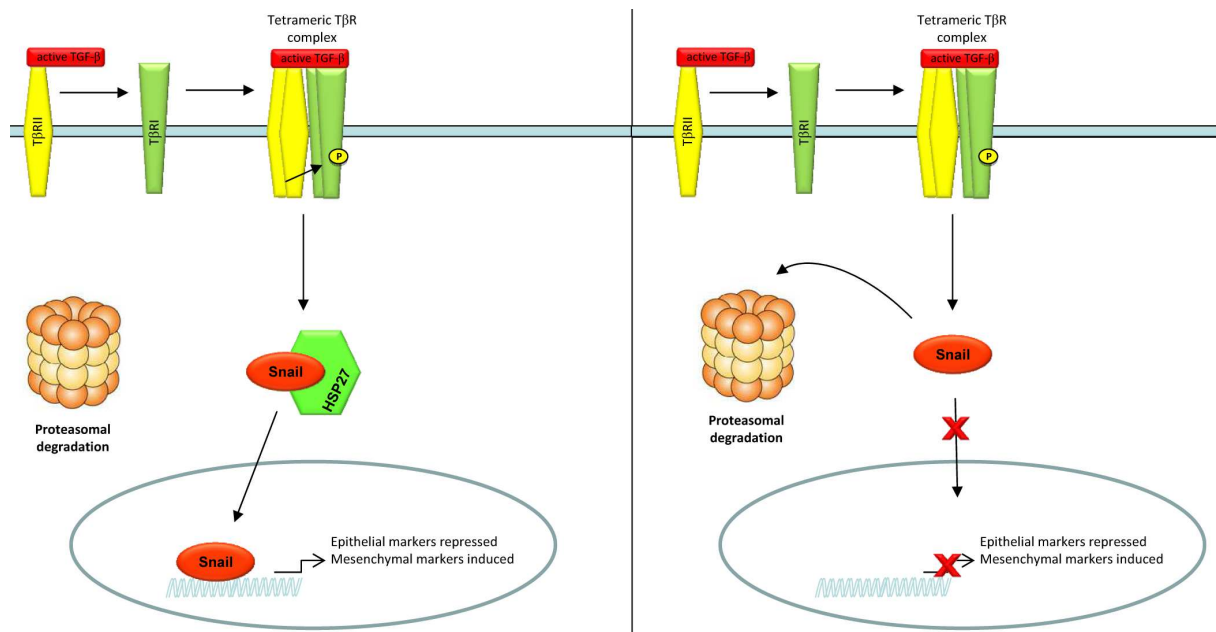


Figure 5: HSP27 stabilises the transcription factor Snail and favours EMT

Left: HSP27 is able to bind Snail and protects it against proteasomal degradation. After TGF- β signalling pathway activation, Snail translocates to the nucleus and induces EMT genes transcription. Right: In case of HSP27 inhibition, Snail degradation by proteasome is enhanced inhibiting the EMT process and favouring fibrosis prevention.

α B-crystallin

α B-crystallin is a sHSP highly inducible under stress conditions in many organs such as brain, heart, smooth muscles and lungs (13). HSP27 and α B-crystallin are two closely related proteins and it has been shown that they co-localized in many organs in normal and pathological conditions. Some publications even report a synergistic role of these two sHSP that are able to interact with each other (194). In 2001 a study showed that HSP27 prevented structural changes and aggregation of α B-crystallin induced by heat shock and thus may have a role in its stabilization (195). Like HSP27, α B-crystallin has a chaperone activity and is able to bind the hydrophobic parts at the surface of misfolded proteins preventing their aggregation and protecting cellular integrity (196). α B-crystallin function is modulated by its oligomerisation and its phosphorylation at three serine residues, the serine 19, 45 and 59. α B-crystallin has a role in many physiological and pathological processes independent of heat shock such as cell growth and cell differentiation, apoptosis, tumorigenesis, signal transduction and the modulation of cytoskeleton proteins including intermediate filaments (96).

Interaction with intermediate filaments is one of the most important functions of α B-crystallin (197-199). Indeed, α B-crystallin is known to interact with intermediate filaments allowing the maintenance of their homeostasis. The importance of these interactions was demonstrated by the damages caused by mutations of α B-crystallin on cell cytoskeleton architecture which sometimes lead to severe disease in humans (96).

The role of α B-crystallin in skeletal and cardiac muscle was also demonstrated in mice by Brady *et al.* in 2001 through the study of deficient mice for the gene encoding α B-crystallin (21). Surprisingly, the lens structure of α B-crystallin deficient mice was normal suggesting that the development and maintenance of lens transparency do not strictly require the presence of this chaperon. Although the lens does not seem affected by the absence of α B-crystallin, this mutation causes a severe phenotype in aged mice characterized by a hunched posture, a significant loss of body after 40 weeks, and muscle cell degeneration. α B-crystallin is also expressed at high levels during early

embryonic development of the heart and also in the fully formed heart. However, the heart structure of α B-crystallin deficient mice appeared normal even during aging (21).

α B-crystallin is involved in many cellular processes, including apoptosis. Several studies have demonstrated that α B-crystallin overexpression had a protective effect against a wide range of apoptotic stimuli, whereas its inhibition significantly sensitizes cells to programmed cell death (200-202). The anti-apoptotic effect of α B-crystallin has been demonstrated to involve the inhibition of the caspase-3, a key apoptosis effector protein (200, 202-204). It has been demonstrated that α B-crystallin interacted with procaspase-3 thereby inhibiting its cleavage and activation. This effect of α B-crystallin is critical to explain its anti-apoptotic function. Morrison *et al.* demonstrated on cardiomyocyte that phosphorylation of α B-crystallin on serine 59 appeared necessary and sufficient to ensure maximum protection against apoptosis (204). α B-crystallin was also able to bind to pro-apoptotic proteins such as Bax, Bcl-Xs (205) and p53 (206) to prevent their translocation into the mitochondria thus inhibiting apoptosis.

Another recently identified function of α B-crystallin is its ability to facilitate the degradation of specific proteins by the ubiquitin/proteasome system (207). Protein ubiquitination and degradation is mediated by the 26S subunit of the proteasome; a multicatalytic protease composed of a 20S catalytic subunit and two regulatory 19S subunits (208) which is essential for the proper assembly/disassembly of protein complexes to prevent adverse interactions and aggregation.

Phosphorylated form of α B-crystallin on serine 19 and 45 is able to interact with FBX4, a component of the SCF ubiquitin-ligase (SKP1/CUL1/F-box) which ubiquitinates client proteins to address them to the proteasome (209). The α B-crystallin/FBX4 complex regulates specific ubiquitination of various substrates inducing their degradation.

α B-crystallin has been shown to be upregulated in several human diseases (210-214) but its role on fibrogenesis remains elusive. In a model of liver fibrosis, it has been shown *in vitro* and *in vivo*, that α B-crystallin was quickly upregulated after HSCs (hepatic stellate cells) activation correlated with a nuclear and cytoplasmic localization in heat shock conditions. α B-crystallin was totally absent from

the non-activated HSCs suggesting its role in the activation of these cells, a key step during liver fibrosis (215, 216). Rezzani *et al.* also showed an overexpression of α B-crystallin in a model of vascular fibrosis induced by cyclosporine A (CsA). CsA has a direct toxicity on the structure and the spatial arrangement of the cytoskeleton and especially on the expression of vimentin and desmin. The authors therefore suggested that α B-crystallin expression is induced in order to protect cells from toxic effects caused by the remodeling of the cytoskeleton thus protecting from vascular fibrosis (8). Interestingly, different studies showed that α B-crystallin expression can be induced by TGF- β 1 (11, 12) and an article published in 2013 by Huang *et al.* showed a role of α B-crystallin in the EMT process in a cancer model of hepatocellular carcinoma. The authors showed that α B-crystallin formed a complex with the protein 14-3-3 ζ , protecting it from degradation by the proteasome. This results in an increase in the "pool" of 14-3-3 ζ in the cell leading to activation of the ERK signalling pathway (Figure 6). Therefore, α B-crystallin allowed the activation of the ERK phosphorylation cascade inducing the activation of the transcription factor Slug, an inducer of EMT (217). This process highlighted in this article in a model of hepatic carcinoma may be particularly important in fibrogenesis since EMT is a process involved in fibrosis.

In 2013, another study demonstrated a role of α B-crystallin in pulmonary fibrosis. For the first time α B-crystallin was shown to be overexpressed in hyperplastic alveolar epithelial cells and also within fibroblastic foci in lungs from patients affected by pulmonary fibrosis. Further, α B-crystallin was upregulated during fibrogenesis in mouse models of pulmonary fibrosis induced by several agents including bleomycin, TGF- β 1 and IL-1 β . Mice lacking α B-crystallin were not able to over produce TGF- β 1 in a proper way and we identified a direct role of α B-crystallin on the TGF- β 1 pathway. Indeed, α B-crystallin was able to modulate the localisation of the protein Smad4 which is responsible for the translocation of Smad2 and Smad3 into the nucleus where they can activate TGF- β 1 responsive genes. The lack of α B-crystallin abrogated Smad4 nuclear localisation therefore it inhibited the TGF- β 1 pathway and subsequent fibrosis (Figure 6, my ref). The nuclear localisation of Smad4 is driven by its monoubiquitination by TIF1 γ . *In vitro*, the overexpression of α B-crystallin

disrupted the interaction between TIF1 γ and SMAD4 inhibiting Smad4 nuclear export. In this context Smad4 was sequestered in the nucleus favoring TGF- β pathway and subsequent fibrosis (Figure 6, my ref).

Those different studies highlight α B-crystallin as a new potential therapeutic target and put a new interest into α B-crystallin inhibitor development.

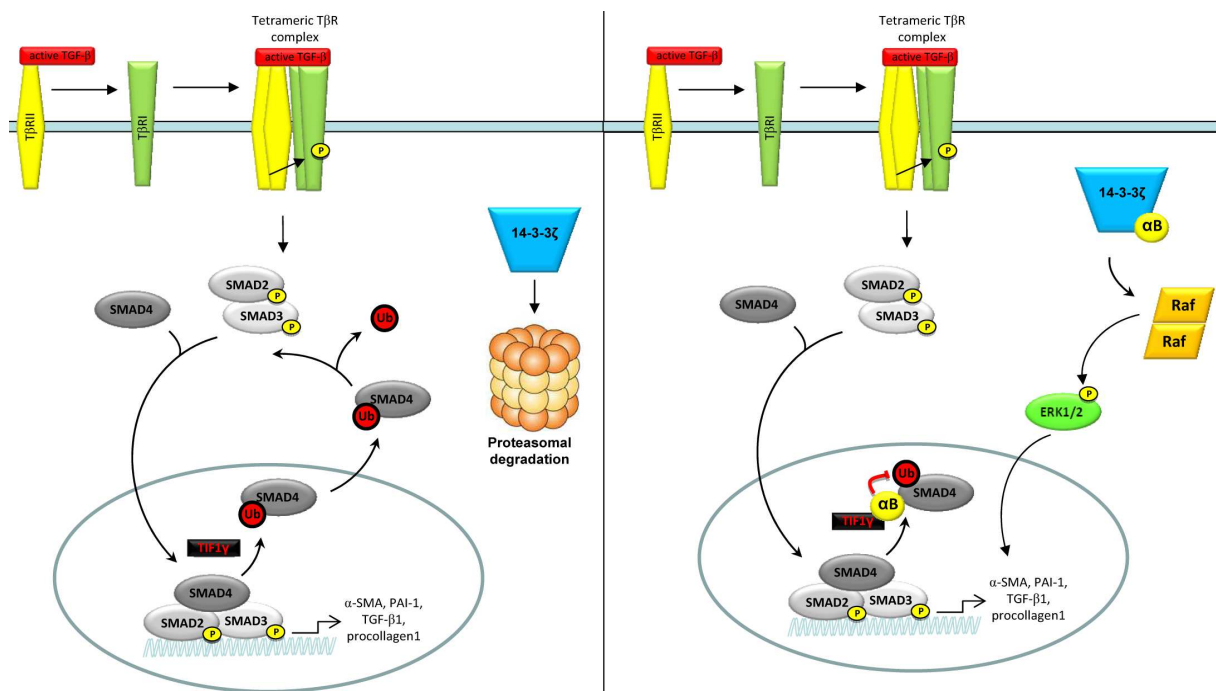


Figure 6: *α B-crystallin inhibition favours Smad4 nuclear export*

Left: In absence of α B-crystallin Smad4 is monoubiquitinated by TIF1 γ enhancing Smad4 nuclear export. Right: α B-crystallin reduces the protein level of TIF1 γ thus limiting Smad4 monoubiquitination and nuclear export. The TGF- β 1 pathway is therefore inhibited. In parallel, α B-crystallin interacts with the protein 14-3-3 ζ allowing Raf dimerisation and ERK phosphorylation cascade.

Conclusion

Heat shock proteins are involved in several cellular processes and display a wide range of functions. Their roles in fibrogenesis remain to be investigated but recent publications demonstrate their potential interest in fibrotic disease therapeutic approaches. Despite their similarities, HSPs appeared to have contradictory effects on fibrotic processes. Indeed, HSP110 and HSP70 have been demonstrated to be beneficial in context of fibrosis whereas HSP90, HSP47, HSP27 and α B-crystallin have been demonstrated to favour fibrogenesis. Except HSP47 which acts directly on collagen stability and synthesis thus promoting collagen deposition and fibrosis, most important role of HSPs have been shown to affect the TGF- β 1 pathway. Indeed, HSP90, HSP27 and α B-crystallin were able to enhance TGF- β 1 pathway either by stabilizing TGF- β receptors (HSP90) or transcription factor Snail (HSP27) either by favouring Smad nuclear localisation. In this context, inhibition of those HSPs appeared to be of interest to prevent fibrogenesis in several animal models of tissue fibrosis. On the contrary, HSP70 has been demonstrated to induce TGF- β receptor degradation thus limiting Smad phosphorylation and abrogating TGF- β pathway. As the major role of TGF- β pathway has been largely documented, modulation of HSPs expression and activity might represent a new therapeutic approach for further treatment in tissue fibrosis. We believe that the role of HSP on inflammation and immunomodulation may also have an important role in the process of fibrogenesis but still remains to be investigated.

References

1. Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., et al. 2011. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183:788-824.
2. Camus, P.H., Foucher, P., Bonniaud, P.H., and Ask, K. 2001. Drug-induced infiltrative lung disease. *Eur Respir J Suppl* 32:93s-100s.
3. Cooper, J.A., Jr., White, D.A., and Matthay, R.A. 1986. Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs. *Am Rev Respir Dis* 133:321-340.
4. Blobe, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-1358.
5. Bonniaud, P., Margetts, P.J., Kolb, M., Haberberger, T., Kelly, M., Robertson, J., and Gauldie, J. 2003. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:770-778.
6. Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., and Chapman, H.A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13180-13185.
7. Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Crouse, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W., and Hogan, B.L. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1475-1483.
8. Rezzani, R., Rodella, L., Buffoli, B., Giugno, L., Stacchiotti, A., and Bianchi, R. 2005. Cyclosporine A induces vascular fibrosis and heat shock protein expression in rat. *Int Immunopharmacol* 5:169-176.
9. Vidyasagar, A., Reese, S., Acun, Z., Hullett, D., and Djamali, A. 2008. HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F707-716.
10. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Kolb, M., Hammann, A., Crestani, B., Soler, P., Marchal-Somme, J., Hazoume, A., Gauldie, J., Gunther, A., et al. 2013. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J*.
11. Welge-Lussen, U., May, C.A., Eichhorn, M., Bloemendal, H., and Lutjen-Drecoll, E. 1999. AlphaB-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2235-2241.
12. Yu, A.L., Fuchshofer, R., Birke, M., Priglinger, S.G., Eibl, K.H., Kampik, A., Bloemendal, H., and Welge-Lussen, U. 2007. Hypoxia/reoxygenation and TGF-beta increase alphaB-crystallin expression in human optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res* 84:694-706.
13. Bhat, S.P., and Nagineni, C.N. 1989. alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158:319-325.
14. Iwaki, T., Iwaki, A., Tateishi, J., and Goldman, J.E. 1994. Sense and antisense modification of glial alpha B-crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. *J Cell Biol* 125:1385-1393.
15. Decolgne, N., Wettstein, G., Kolb, M., Margetts, P., Garrido, C., Camus, P., and Bonniaud, P. 2010. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* 35:176-185.
16. Bonniaud, P., Margetts, P.J., Ask, K., Flanders, K., Gauldie, J., and Kolb, M. 2005. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 175:5390-5395.
17. Decolgne, N., Kolb, M., Margetts, P.J., Menetrier, F., Artur, Y., Garrido, C., Gauldie, J., Camus, P., and Bonniaud, P. 2007. TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 179:6043-6051.

18. Rice, W.R., Conkright, J.J., Na, C.L., Ikegami, M., Shannon, J.M., and Weaver, T.E. 2002. Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L256-264.
19. Bonniaud, P., Kolb, M., Galt, T., Robertson, J., Robbins, C., Stampfli, M., Lavery, C., Margetts, P.J., Roberts, A.B., and Gauldie, J. 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 173:2099-2108.
20. Janssen, L.J., Farkas, L., Rahman, T., and Kolb, M.R. 2009. ATP stimulates Ca(2+)-waves and gene expression in cultured human pulmonary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2477-2484.
21. Brady, J.P., Garland, D.L., Green, D.E., Tamm, E.R., Giblin, F.J., and Wawrousek, E.F. 2001. AlphaB-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2924-2934.
22. Mala, J.G., and Rose, C. 2010. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci* 87:579-586.
23. Razzaque, M.S., Hossain, M.A., Kohno, S., and Taguchi, T. 1998. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows Arch* 432:455-460.
24. Santana, A., Saxena, B., Noble, N.A., Gold, L.I., and Marshall, B.C. 1995. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:34-44.
25. Phan, S.H., Gharaee-Kermani, M., Wolber, F., and Ryan, U.S. 1991. Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *J Clin Invest* 87:148-154.
26. Kolb, M., Margetts, P.J., Anthony, D.C., Pitossi, F., and Gauldie, J. 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107:1529-1536.
27. Zeisberg, M., and Neilson, E.G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119:1429-1437.
28. Heldin, C.H., and Moustakas, A. 2012. Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res* 347:21-36.
29. Yao, X., Chen, X., Cottonham, C., and Xu, L. 2008. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. *J Biol Chem* 283:22867-22874.
30. Pierreux, C.E., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. 2000. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 20:9041-9054.
31. Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. 2000. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* 1:176-182.
32. Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunnicardi, F.C., and Feng, X.H. 2003. SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 278:31043-31048.
33. Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., and Piccolo, S. 2005. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121:87-99.
34. Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A.P., Gillet, G., Mikaelian, I., et al. 2011. Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 12:665-672.
35. Gauldie, J. 2002. Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1205-1206.
36. Strieter, R.M. 2002. Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1206-1207; discussion 1207-1208.
37. Collard, H.R., and King, T.E., Jr. 2001. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the rise and fall of corticosteroids. *Am J Med* 110:326-328.

38. Sime, P.J., Marr, R.A., Gauldie, D., Xing, Z., Hewlett, B.R., Graham, F.L., and Gauldie, J. 1998. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol* 153:825-832.
39. Chaudhuri, V., Zhou, L., and Karasek, M. 2007. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis. *J Cutan Pathol* 34:146-153.
40. Doerner, A.M., and Zuraw, B.L. 2009. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* 10:100.
41. Kampinga, H.H., and Garrido, C. 2012. HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1706-1710.
42. Christians, E.S., Ishiwata, T., and Benjamin, I.J. 2012. Small heat shock proteins in redox metabolism: implications for cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1632-1645.
43. Hisatomi, K., Mukae, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Kakugawa, T., Hara, S., Fujita, H., Nakamichi, S., Oku, H., Urata, Y., et al. 2012. Pirfenidone inhibits TGF-beta1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm Med* 12:24.
44. Kakugawa, T., Mukae, H., Hayashi, T., Ishii, H., Abe, K., Fujii, T., Oku, H., Miyazaki, M., Kadota, J., and Kohno, S. 2004. Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 24:57-65.
45. Choi, K., Lee, K., Ryu, S.W., Im, M., Kook, K.H., and Choi, C. 2012. Pirfenidone inhibits transforming growth factor-beta1-induced fibrogenesis by blocking nuclear translocation of Smads in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Mol Vis* 18:1010-1020.
46. Huggins, J.T., and Sahn, S.A. 2004. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology* 9:441-447.
47. Pfitzenmeyer, P., Foucher, P., Dennewald, G., Chevalon, B., Debieuvre, D., Bensa, P., Piard, F., and Camus, P. 1996. Pleuropulmonary changes induced by ergoline drugs. *Eur Respir J* 9:1013-1019.
48. Hamada, K., Nagai, S., Kitaichi, M., Jin, G., Shigematsu, M., Nagao, T., Sato, A., and Mishima, M. 2003. Cyclophosphamide-induced late-onset lung disease. *Intern Med* 42:82-87.
49. Malik, S.W., Myers, J.L., DeRemee, R.A., and Specks, U. 1996. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use. Two distinct patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1851-1856.
50. 2000. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161:646-664.
51. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Kolb, M., Hammann, A., Crestani, B., Soler, P., Marchal-Somme, J., Hazoume, A., Gauldie, J., Gunther, A., et al. 2013. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 27:1549-1560.
52. Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L., and Graham, F.L. 1994. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8802-8806.
53. Sime, P.J., Xing, Z., Graham, F.L., Csaky, K.G., and Gauldie, J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100:768-776.
54. Foley-Comer, A.J., Herrick, S.E., Al-Mishlab, T., Prele, C.M., Laurent, G.J., and Mutsaers, S.E. 2002. Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing. *J Cell Sci* 115:1383-1389.
55. Lv, Z.D., Na, D., Ma, X.Y., Zhao, C., Zhao, W.J., and Xu, H.M. Human peritoneal mesothelial cell transformation into myofibroblasts in response to TGF-ss1 in vitro. *Int J Mol Med* 27:187-193.

56. Margetts, P.J., Bonniaud, P., Liu, L., Hoff, C.M., Holmes, C.J., West-Mays, J.A., and Kelly, M.M. 2005. Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 16:425-436.
57. Yang, A.H., Chen, J.Y., and Lin, J.K. 2003. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 63:1530-1539.
58. Nasreen, N., Mohammed, K.A., Mubarak, K.K., Baz, M.A., Akindipe, O.A., Fernandez-Bussy, S., and Antony, V.B. 2009. Pleural mesothelial cell transformation into myofibroblasts and haptotactic migration in response to TGF- β 1 in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L115-124.
59. Mubarak, K.K., Montes-Worboys, A., Regev, D., Nasreen, N., Mohammed, K.A., Faruqi, I., Hensel, E., Baz, M.A., Akindipe, O.A., Fernandez-Bussy, S., et al. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*.
60. Kisseleva, T., and Brenner, D.A. 2008. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:109-122.
61. Wynn, T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117:524-529.
62. Phan, S.H. 2002. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122:286S-289S.
63. Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., and Cerami, A. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81.
64. Thannickal, V.J., and Horowitz, J.C. 2006. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 3:350-356.
65. Drakopanagiotakis, F., Xifteri, A., Polychronopoulos, V., and Bouros, D. 2008. Apoptosis in lung injury and fibrosis. *Eur Respir J* 32:1631-1638.
66. Border, W.A., and Noble, N.A. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292.
67. Barbas-Filho, J.V., Ferreira, M.A., Sesso, A., Kairalla, R.A., Carvalho, C.R., and Capelozzi, V.L. 2001. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol* 54:132-138.
68. Coker, R.K., Laurent, G.J., Jeffery, P.K., du Bois, R.M., Black, C.M., and McAnulty, R.J. 2001. Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax* 56:549-556.
69. Khalil, N., O'Connor, R.N., Flanders, K.C., and Unruh, H. 1996. TGF- β 1, but not TGF- β 2 or TGF- β 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:131-138.
70. Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347.
71. Massague, J., and Wotton, D. 2000. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745-1754.
72. Wells, R.G. 2000. Fibrogenesis. V. TGF- β signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G845-850.
73. Eickelberg, O. 2001. Endless healing: TGF- β , SMADs, and fibrosis. *FEBS Lett* 506:11-14.
74. Schiller, M., Javelaud, D., and Mauviel, A. 2004. TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35:83-92.
75. Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol Cell* 6:1365-1375.
76. Roberts, A.B. 2002. The ever-increasing complexity of TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:3-5.
77. Roberts, A.B., Piek, E., Bottinger, E.P., Ashcroft, G., Mitchell, J.B., and Flanders, K.C. 2001. Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 120:43S-47S.

78. Verrecchia, F., Chu, M.L., and Mauviel, A. 2001. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276:17058-17062.
79. Flanders, K.C., Sullivan, C.D., Fujii, M., Sowers, A., Anzano, M.A., Arabshahi, A., Major, C., Deng, C., Russo, A., Mitchell, J.B., et al. 2002. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* 160:1057-1068.
80. Zhao, J., Shi, W., Wang, Y.L., Chen, H., Bringas, P., Jr., Datto, M.B., Frederick, J.P., Wang, X.F., and Warburton, D. 2002. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L585-593.
81. Ritossa, F.M. 1964. Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res* 35:601-607.
82. Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84:389-398.
83. Gething, M.J., and Sambrook, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45.
84. Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., and Garrido, C. 2010. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal* 10:1543-1552.
85. Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., and Morange, M. 1992. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* 48:629-634.
86. Arrigo, A.P. 2005. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* 21:619-625.
87. Voellmy, R. 2006. Feedback regulation of the heat shock response. *Handb Exp Pharmacol*:43-68.
88. Conde, R., Belak, Z.R., Nair, M., O'Carroll, R.F., and Ovsenek, N. 2009. Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochem Cell Biol* 87:845-851.
89. Vos, M.J., Hageman, J., Carra, S., and Kampinga, H.H. 2008. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 47:7001-7011.
90. Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., and Green, D.R. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2:469-475.
91. Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., et al. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2:645-652.
92. Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., and Garrido, C. 2006. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*:171-198.
93. Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., and Alnemri, E.S. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2:476-483.
94. Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., and Calderwood, S.K. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6:435-442.
95. Tamura, Y., Torigoe, T., Kutomi, G., Hirata, K., and Sato, N. 2012. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Curr Mol Med* 12:1198-1206.
96. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., and Bonniaud, P. 2012. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? *Int J Biochem Cell Biol* 44:1680-1686.
97. Jegu, G., Hazoume, A., Seigneuric, R., and Garrido, C. 2013. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 332:275-285.
98. Ghosh, J.C., Dohi, T., Kang, B.H., and Altieri, D.C. 2008. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 283:5188-5194.

99. Lemieux, P., Oesterreich, S., Lawrence, J.A., Steeg, P.S., Hilsenbeck, S.G., Harvey, J.M., and Fuqua, S.A. 1997. The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis* 17:113-123.
100. Sanderson, S., Valenti, M., Gowan, S., Patterson, L., Ahmad, Z., Workman, P., and Eccles, S.A. 2006. Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 5:522-532.
101. Thuringer, D., Jego, G., Wettstein, G., Terrier, O., Cronier, L., Yousfi, N., Hebrard, S., Bouchot, A., Hazoume, A., Joly, A.L., et al. 2013. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J*.
102. Rappa, F., Farina, F., Zummo, G., David, S., Campanella, C., Carini, F., Tomasello, G., Damiani, P., Cappello, F., EC, D.E.M., et al. 2012. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer Res* 32:5139-5150.
103. Goloudina, A.R., Demidov, O.N., and Garrido, C. 2012. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett* 325:117-124.
104. Dorard, C., de Thonel, A., Collura, A., Marisa, L., Svrcek, M., Lagrange, A., Jego, G., Wanherdrick, K., Joly, A.L., Buhard, O., et al. 2011. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 17:1283-1289.
105. Rerole, A.L., Gobbo, J., De Thonel, A., Schmitt, E., Pais de Barros, J.P., Hammann, A., Lanneau, D., Fourmaux, E., Deminov, O., Micheau, O., et al. 2011. Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Res* 71:484-495.
106. Vancheri, C., Failla, M., Crimi, N., and Raghu, G. 2010. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology. *Eur Respir J* 35:496-504.
107. Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., and Nardai, G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79:129-168.
108. Multhoff, G. 2006. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol*:279-304.
109. Rolhion, N., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. 2011. The endoplasmic reticulum stress response chaperone: Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli. *Gut Microbes* 2:115-119.
110. Mahavadi, P., Korfei, M., Henneke, I., Liebisch, G., Schmitz, G., Gochuico, B.R., Markart, P., Bellusci, S., Seeger, W., Ruppert, C., et al. 2010. Epithelial stress and apoptosis underlie Hermansky-Pudlak syndrome-associated interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 182:207-219.
111. Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.M., Seeger, W., et al. 2008. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 178:838-846.
112. Pearl, L.H., and Prodromou, C. 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75:271-294.
113. Czar, M.J., Welsh, M.J., and Pratt, W.B. 1996. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 70:322-330.
114. Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M.F., Fritz, L.C., and Burrows, F.J. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425:407-410.
115. Noh, H., Kim, H.J., Yu, M.R., Kim, W.Y., Kim, J., Ryu, J.H., Kwon, S.H., Jeon, J.S., Han, D.C., and Ziyadeh, F. 2012. Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor-beta type II receptor. *Lab Invest* 92:1583-1596.
116. Myung, S.J., Yoon, J.H., Kim, B.H., Lee, J.H., Jung, E.U., and Lee, H.S. 2009. Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 330:276-282.

117. Reka, A.K., Kuick, R., Kurapati, H., Standiford, T.J., Omenn, G.S., and Keshamouni, V.G. 2011. Identifying inhibitors of epithelial-mesenchymal transition by connectivity map-based systems approach. *J Thorac Oncol* 6:1784-1792.
118. Wrighton, K.H., Lin, X., and Feng, X.H. 2008. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9244-9249.
119. Zhang, K., Lu, Y., Yang, P., Li, C., Sun, H., Tao, D., Liu, Y., Zhang, S., and Ma, Y. 2012. HIL1 inhibits TGF-beta signaling by interacting with Hsp90 and promoting TbetaR degradation. *PLoS One* 7:e41973.
120. Sun, X., Zhang, X.D., Cheng, G., Hu, Y.H., and Wang, H.Y. 2009. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation by heat shock protein 90 inhibitors in vitro. *Mol Cell Biochem* 330:181-185.
121. Mann, D.A., and Smart, D.E. 2002. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 50:891-896.
122. Daugaard, M., Rohde, M., and Jaattela, M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581:3702-3710.
123. Welch, W.J., and Suhan, J.P. 1986. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103:2035-2052.
124. Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16:574-581.
125. Sabirzhanov, B., Stoica, B.A., Hanscom, M., Piao, C.S., and Faden, A.I. 2012. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem* 123:542-554.
126. Yang, X., Wang, J., Zhou, Y., Wang, Y., Wang, S., and Zhang, W. 2012. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 321:137-143.
127. Jiang, B., Liang, P., Deng, G., Tu, Z., Liu, M., and Xiao, X. 2011. Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Stress Chaperones* 16:143-152.
128. Namba, T., Tanaka, K., Hoshino, T., Azuma, A., and Mizushima, T. 2011. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *PLoS One* 6:e27296.
129. Goette, A., Staack, T., Rocken, C., Arndt, M., Geller, J.C., Huth, C., Ansorge, S., Klein, H.U., and Lendeckel, U. 2000. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 35:1669-1677.
130. Booz, G.W., Carl, L.L., and Baker, K.M. 1999. Amplification of angiotensin II signaling in cardiac myocytes by adenovirus-mediated overexpression of the AT1 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 874:20-26.
131. Wakisaka, O., Takahashi, N., Shinohara, T., Ooie, T., Nakagawa, M., Yonemochi, H., Hara, M., Shimada, T., Saikawa, T., and Yoshimatsu, H. 2007. Hyperthermia treatment prevents angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation via induction of heat-shock protein 72. *J Mol Cell Cardiol* 43:616-626.
132. Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A., and Mizushima, T. 2010. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 80:920-931.
133. Fujibayashi, T., Hashimoto, N., Jijiwa, M., Hasegawa, Y., Kojima, T., and Ishiguro, N. 2009. 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.
134. Zhou, Y., Mao, H., Li, S., Cao, S., Li, Z., Zhuang, S., Fan, J., Dong, X., Borkan, S.C., Wang, Y., et al. 2010. HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 21:598-609.

135. Mao, H., Li, Z., Zhou, Y., Zhuang, S., An, X., Zhang, B., Chen, W., Nie, J., Wang, Z., Borkan, S.C., et al. 2008. HSP72 attenuates renal tubular cell apoptosis and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F202-214.
136. Li, Y., Kang, X., and Wang, Q. 2011. HSP70 decreases receptor-dependent phosphorylation of Smad2 and blocks TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Genet Genomics* 38:111-116.
137. Yun, C.H., Yoon, S.Y., Nguyen, T.T., Cho, H.Y., Kim, T.H., Kim, S.T., Kim, B.C., Hong, Y.S., Kim, S.J., and Lee, H.J. 2010. Geldanamycin inhibits TGF-beta signaling through induction of Hsp70. *Arch Biochem Biophys* 495:8-13.
138. Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J., and Patterson, C. 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3:93-96.
139. Kahloon, R.A., Xue, J., Bhargava, A., Csizmadia, E., Otterbein, L., Kass, D.J., Bon, J., Soejima, M., Levesque, M.C., Lindell, K.O., et al. 2013. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *Am J Respir Crit Care Med* 187:768-775.
140. Wells, A.U., and Kelleher, W.P. 2013. Idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis and novel approaches to immunomodulation: we must not be tyrannized by the PANTHER data. *Am J Respir Crit Care Med* 187:677-679.
141. Cai, W.F., Zhang, X.W., Yan, H.M., Ma, Y.G., Wang, X.X., Yan, J., Xin, B.M., Lv, X.X., Wang, Q.Q., Wang, Z.Y., et al. 2010. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc Res* 88:140-149.
142. Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., and Subject, J.R. 1995. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 270:15725-15733.
143. Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D., and Lindquist, S. 1991. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* 353:270-273.
144. Oh, H.J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y., and Subject, J.R. 1999. The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J Biol Chem* 274:15712-15718.
145. Yamagishi, N., Yokota, M., Yasuda, K., Saito, Y., Nagata, K., and Hatayama, T. 2011. Characterization of stress sensitivity and chaperone activity of Hsp105 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409:90-95.
146. Hatayama, T., and Yasuda, K. 1998. Association of HSP105 with HSC70 in high molecular mass complexes in mouse FM3A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248:395-401.
147. Andreasson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Mayer, M.P., and Bukau, B. 2008. Hsp110 is a nucleotide-activated exchange factor for Hsp70. *J Biol Chem* 283:8877-8884.
148. Mohamed, B.A., Barakat, A.Z., Zimmermann, W.H., Bittner, R.E., Muhlfeld, C., Hunlich, M., Engel, W., Maier, L.S., and Adham, I.M. 2012. Targeted disruption of Hspa4 gene leads to cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 53:459-468.
149. Frey, N., and Olson, E.N. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65:45-79.
150. Kambe, K., Yamamoto, A., Yoshimori, T., Hirayoshi, K., Ogawa, R., and Tashiro, Y. 1994. Preferential localization of heat shock protein 47 in dilated endoplasmic reticulum of chicken chondrocytes. *J Histochem Cytochem* 42:833-841.
151. Miyaishi, O., Sakata, K., Matsuyama, M., and Saga, S. 1992. Distribution of the collagen binding heat-shock protein in chicken tissues. *J Histochem Cytochem* 40:1021-1029.
152. Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H.P., and Nagata, K. 2006. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell* 17:2346-2355.
153. Nagata, K. 1998. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol* 16:379-386.

154. Hendershot, L.M., and Bulleid, N.J. 2000. Protein-specific chaperones: the role of hsp47 begins to gel. *Curr Biol* 10:R912-915.
155. Masuda, H., Fukumoto, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. 1994. Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha 1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 94:2481-2488.
156. Sunamoto, M., Kuze, K., Iehara, N., Takeoka, H., Nagata, K., Kita, T., and Doi, T. 1998. Expression of heat shock protein 47 is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Int J Exp Pathol* 79:133-140.
157. Becerril, C., Pardo, A., Montano, M., Ramos, C., Ramirez, R., and Selman, M. 1999. Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1020-1027.
158. Razzaque, M.S., and Taguchi, T. 1997. Collagen-binding heat shock protein (HSP) 47 expression in anti-thymocyte serum (ATS)-induced glomerulonephritis. *J Pathol* 183:24-29.
159. Razzaque, M.S., Ahsan, N., and Taguchi, T. 2000. Heat shock protein 47 in renal scarring. *Nephron* 86:339-341.
160. Mishima, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Ozono, Y., Shiohita, K., Xia, Z., Harada, T., Taguchi, T., Koji, T., and Kohno, S. 2003. Enhanced expression of heat shock protein 47 in rat model of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 23:14-22.
161. Kakugawa, T., Mukae, H., Hishikawa, Y., Ishii, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Fujii, T., Koji, T., and Kohno, S. 2010. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch* 456:309-315.
162. Kaur, J., Rao, M., Chakravarti, N., Mathur, M., Shukla, N.K., Sanwal, B.D., and Ralhan, R. 2001. Co-expression of colligin and collagen in oral submucous fibrosis: plausible role in pathogenesis. *Oral Oncol* 37:282-287.
163. Iwashita, T., Kadota, J., Naito, S., Kaida, H., Ishimatsu, Y., Miyazaki, M., Ozono, Y., and Kohno, S. 2000. 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.
164. Xia, Z., Abe, K., Furusu, A., Miyazaki, M., Obata, Y., Tabata, Y., Koji, T., and Kohno, S. 2008. Suppression of renal tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein 47. *Am J Nephrol* 28:34-46.
165. Obata, Y., Nishino, T., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Koji, T., Tabata, Y., and Kohno, S. 2012. HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Acta Biomater* 8:2688-2696.
166. Kitamura, H., Yamamoto, S., Nakase, H., Matsuura, M., Honzawa, Y., Matsumura, K., Takeda, Y., Uza, N., Nagata, K., and Chiba, T. 2011. Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 404:599-604.
167. Chen, J.J., Zhao, S., Cen, Y., Liu, X.X., Yu, R., and Wu, D.M. 2007. Effect of heat shock protein 47 on collagen accumulation in keloid fibroblast cells. *Br J Dermatol* 156:1188-1195.
168. Chen, J.J., Jin, P.S., Zhao, S., Cen, Y., Liu, Y., Xu, X.W., Duan, W.Q., and Wang, H.S. 2011. Effect of heat shock protein 47 on collagen synthesis of keloid in vivo. *ANZ J Surg* 81:425-430.
169. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., and Noguchi, T. 2007. An antisense oligonucleotide to HSP47 inhibits paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *Toxicology* 236:199-207.
170. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., and Noguchi, T. 2007. Antisense oligonucleotide inhibition of heat shock protein (HSP) 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respir Res* 8:37.
171. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matsumoto, S., and Noguchi, T. 2007. Introduction of antisense oligonucleotides to heat shock protein 47 prevents pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced pneumopathy of the rat. *Eur J Pharmacol* 564:174-180.
172. Yoshioka, S., Mukae, H., Ishii, H., Kakugawa, T., Ishimoto, H., Sakamoto, N., Fujii, T., Urata, Y., Kondo, T., Kubota, H., et al. 2007. Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts. *Life Sci* 80:1839-1845.

173. Xiao, H.B., Liu, R.H., Ling, G.H., Xiao, L., Xia, Y.C., Liu, F.Y., Li, J., Liu, Y.H., Chen, Q.K., Lv, J.L., et al. 2012. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF-beta1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:F757-765.
174. Sasaki, H., Sato, T., Yamauchi, N., Okamoto, T., Kobayashi, D., Iyama, S., Kato, J., Matsunaga, T., Takimoto, R., Takayama, T., et al. 2002. 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.
175. Lindquist, S., and Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
176. Arrigo, A.P., Suhan, J.P., and Welch, W.J. 1988. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol* 8:5059-5071.
177. Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S., and Inaguma, Y. 1994. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem* 269:11274-11278.
178. Mehlen, P., Hickey, E., Weber, L.A., and Arrigo, A.P. 1997. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241:187-192.
179. Mehlen, P., and Arrigo, A.P. 1994. The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *Eur J Biochem* 221:327-334.
180. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., and Gaestel, M. 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* 313:307-313.
181. Kostenko, S., Johannessen, M., and Moens, U. 2009. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal* 21:712-718.
182. Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E., and Garrido, C. 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 23:5790-5802.
183. Arrigo, A.P. 2000. sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol Biol (Paris)* 48:280-288.
184. Hino, M., Kurogi, K., Okubo, M.A., Murata-Hori, M., and Hosoya, H. 2000. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271:164-169.
185. Katoh, M., Koninkx, J., and Schumacher, U. 2000. Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Lett* 161:113-120.
186. Li, G.P., Wang, H., Lai, Y.K., Chen, S.C., Lin, M.C., Lu, G., Zhang, J.F., He, X.G., Qian, C.N., and Kung, H.F. Proteomic profiling between CNE-2 and its strongly metastatic subclone S-18 and functional characterization of HSP27 in metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Proteomics* 11:2911-2920.
187. Choi, D.H., Ha, J.S., Lee, W.H., Song, J.K., Kim, G.Y., Park, J.H., Cha, H.J., Lee, B.J., and Park, J.W. 2007. Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells. *FEBS Lett* 581:1649-1656.
188. Zhuang, H., Jiang, W., Cheng, W., Qian, K., Dong, W., Cao, L., Huang, Q., Li, S., Dou, F., Chiu, J.F., et al. Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis. *Lung Cancer* 68:27-38.
189. Korfei, M., Schmitt, S., Ruppert, C., Henneke, I., Markart, P., Loeh, B., Mahavadi, P., Wygrecka, M., Klepetko, W., Fink, L., 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.

190. Chilosi, M., Zamo, A., Doglioni, C., Reghellin, D., Lestani, M., Montagna, L., Pedron, S., Ennas, M.G., Cancellieri, A., Murer, B., et al. 2006. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 7:95.
191. Vargha, R., Bender, T.O., Riesenhuber, A., Endemann, M., Kratochwill, K., and Aufricht, C. 2008. Effects of epithelial-to-mesenchymal transition on acute stress response in human peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 23:3494-3500.
192. Vidyasagar, A., Reese, S.R., Hafez, O., Huang, L.J., Swain, W.F., Jacobson, L.M., Torrealba, J.R., Chammas, P.E., Wilson, N.A., and Djamali, A. 2013. Tubular expression of heat-shock protein 27 inhibits fibrogenesis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 83:84-92.
193. Zoubeidi, A., and Gleave, M. 2012. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1646-1656.
194. MacIntyre, D.A., Tyson, E.K., Read, M., Smith, R., Yeo, G., Kwek, K., and Chan, E.C. 2008. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology* 149:245-252.
195. Fu, L., and Liang, J.J. 2003. Enhanced stability of alpha B-crystallin in the presence of small heat shock protein Hsp27. *Biochem Biophys Res Commun* 302:710-714.
196. Markov, D.I., Pivovarova, A.V., Chernik, I.S., Gusev, N.B., and Levitsky, D.I. 2008. Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation. *FEBS Lett* 582:1407-1412.
197. Nicholl, I.D., and Quinlan, R.A. 1994. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J* 13:945-953.
198. Wisniewski, T., and Goldman, J.E. 1998. Alpha B-crystallin is associated with intermediate filaments in astrocytoma cells. *Neurochem Res* 23:385-392.
199. Launay, N., Goudeau, B., Kato, K., Vicart, P., and Lilienbaum, A. 2006. Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 312:3570-3584.
200. Kamradt, M.C., Chen, F., and Cryns, V.L. 2001. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem* 276:16059-16063.
201. Kamradt, M.C., Lu, M., Werner, M.E., Kwan, T., Chen, F., Strohecker, A., Oshita, S., Wilkinson, J.C., Yu, C., Oliver, P.G., et al. 2005. The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 280:11059-11066.
202. Kamradt, M.C., Chen, F., Sam, S., and Cryns, V.L. 2002. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277:38731-38736.
203. Mao, Y.W., Xiang, H., Wang, J., Korsmeyer, S., Reddan, J., and Li, D.W. 2001. Human bcl-2 gene attenuates the ability of rabbit lens epithelial cells against H₂O₂-induced apoptosis through down-regulation of the alpha B-crystallin gene. *J Biol Chem* 276:43435-43445.
204. Morrison, L.E., Hoover, H.E., Thuerauf, D.J., and Glembotski, C.C. 2003. Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ Res* 92:203-211.
205. Mao, Y.W., Liu, J.P., Xiang, H., and Li, D.W. 2004. 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.
206. Liu, S., Li, J., Tao, Y., and Xiao, X. 2007. Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 354:109-114.
207. Garrido, C. 2002. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ* 9:483-485.
208. Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* 17:7151-7160.

209. den Engelsman, J., Keijsers, V., de Jong, W.W., and Boelens, W.C. 2003. The small heat-shock protein alpha B-crystallin promotes FBX4-dependent ubiquitination. *J Biol Chem* 278:4699-4704.
210. Cherneva, R., Petrov, D., Georgiev, O., Slavova, Y., Toncheva, D., Stamenova, M., and Trifonova, N. 2010. Expression profile of the small heat-shock protein alpha-B-crystallin in operated-on non-small-cell lung cancer patients: clinical implication. *Eur J Cardiothorac Surg* 37:44-50.
211. Cherneva, R.V., Georgiev, O.B., Petrova, D.S., Trifonova, N.L., Stamenova, M., Ivanova, V., and Vlasov, V.I. 2012. The role of small heat-shock protein alphaB-crystalline (HspB5) in COPD pathogenesis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 7:633-640.
212. Aoyama, A., Steiger, R.H., Frohli, E., Schafer, R., von Deimling, A., Wiestler, O.D., and Klemenz, R. 1993. Expression of alpha B-crystallin in human brain tumors. *Int J Cancer* 55:760-764.
213. Lo, W.Y., Tsai, M.H., Tsai, Y., Hua, C.H., Tsai, F.J., Huang, S.Y., Tsai, C.H., and Lai, C.C. 2007. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clin Chim Acta* 376:101-107.
214. Pinder, S.E., Balsitis, M., Ellis, I.O., Landon, M., Mayer, R.J., and Lowe, J. 1994. The expression of alpha B-crystallin in epithelial tumours: a useful tumour marker? *J Pathol* 174:209-215.
215. Lang, A., Schrum, L.W., Schoonhoven, R., Tuvia, S., Solis-Herruzo, J.A., Tsukamoto, H., Brenner, D.A., and Rippe, R.A. 2000. Expression of small heat shock protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1333-1342.
216. van de Bovenkamp, M., Groothuis, G.M., Meijer, D.K., and Olinga, P. 2008. 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.
217. Huang, X.Y., Ke, A.W., Shi, G.M., Zhang, X., Zhang, C., Shi, Y.H., Wang, X.Y., Ding, Z.B., Xiao, Y.S., Yan, J., et al. 2013. alphaB-crystallin complexes with 14-3-3zeta to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*.

Figure legends

Figure 1: *HSP90 inhibition hampers the TGF- β 1 pathway*

Left: HSP90 forms a complex with T β RII inhibiting its ubiquitination and degradation by the proteasom. In parallel, HSP90 binds the Glucocorticoid Receptor (GR) enabling NF κ B nuclear translocation and activity. Right: 17 AAG binds the ATP-binding domain of HSP90 and therefore inhibits its activity. The disruption of the HSP90/T β RII complex allows the binding of Smurf2 on T β RII thus inducing its ubiquitination and degradation. 17AAG also disturbs GR/HSP90 complex enabling the interaction between GR and NF κ B. This induces the sequestration of NF κ B in the cytoplasm and inhibits its activity.

Figure 2: *HSP70 induction disturbs the TGF- β 1 pathway*

Left: In case of low HSP70 level the TGF- β 1 pathway is not affected. Right: HSP70 is able to bind Smad2 and Smad3 limiting their phosphorylation and nuclear translocation hampering the TGF- β 1 signalisation. HSP70 is also able to bind T β RI and T β RII to induce their ubiquitination and proteasomal degradation. Even if the mechanism is not fully understood, authors suggest the role of the E3-ubiquitin ligase CHIP in this process.

Figure 3: *HSP47 staining in fibrotic lung correlated with collagen up-regulation*

HSP47 is up-regulated in association with collagen during pulmonary fibrosis. I- Lung section from mice receiving NaCl intratracheally at D21. II- Lung section from mice receiving bleomycin intratracheally to induce pulmonary fibrosis at D21. Hsp47 immuno-staining (upper panel) and picosirius red staining for collagen (lower panel).

Figure 4: *HSP47 favours fibrotic response through its role on collagen biosynthesis*

Signal induced by TGF- β 1 and/or IL-1 β signalling triggers HSF1 nuclear translocation and trimerisation. HSF1 active trimers bind to response element on HSP47 promoter region and enhance HSP47 expression. HSP47 helps to procollagen stabilisation and procollagen triple helix formation. Therefore, HSP47 favours collagen secretion by activated cells promoting fibrosis.

Figure 5: *HSP27 stabilises the transcription factor Snail and favours EMT*

Left: HSP27 is able to bind Snail and protects it against proteasomal degradation. After TGF- β signalling pathway activation, Snail translocates to the nucleus and induces EMT genes transcription. Right: In case of HSP27 inhibition, Snail degradation by proteasome is enhanced inhibiting the EMT process and favouring fibrosis prevention.

Figure 6: *α B-crystallin inhibition favours Smad4 nuclear export*

Left: In absence of α B-crystallin Smad4 is monoubiquitinated by TIF1 γ enhancing Smad4 nuclear export. Right: α B-crystallin reduces the protein level of TIF1 γ thus limiting Smad4 monoubiquitination and nuclear export. The TGF- β 1 pathway is therefore inhibited. In parallel, α B-crystallin interacts with the protein 14-3-3 ζ allowing Raf dimerisation and ERK phosphorylation cascade.

b- Article original

- Wettstein, G., Bellaye, P.S., Kolb, M., Hammann, A., Crestani, B., Soler, P., Marchal-Somme, J., Hazoume, A., Gauldie, J., Gunther, A., et al. 2013. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 27:1549-1560.

Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation

Guillaume Wettstein,^{*,†} Pierre-Simon Bellaye,^{*,†} Martin Kolb,^{‡,§} Arlette Hammann,^{*,†} Bruno Crestani,^{||,¶} Paul Soler,^{||,¶} Joëlle Marchal-Somme,^{||,¶} Adonis Hazoume,^{*,†} Jack Gaudie,^{‡,§} Andreas Gunther,^{**} Olivier Micheau,^{*,†} Martin Gleave,^{††} Philippe Camus,^{*,†,‡,‡‡} Carmen Garrido,^{*,†,1} and Philippe Bonniaud^{*,†,‡,‡,1,2}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U866, Dijon, France; [†]Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon, France; [‡]McMaster Immunology Research Center and [§]Firestone Institute for Respiratory Health, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada; ^{||}INSERM, Unite 700, Paris, France; [¶]Université Paris Diderot, Pôle de Recherche et d'Enseignement (PRES) Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [#]Faculté de Médecine Bichat, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, Paris, France; ^{**}University of Giessen Lung Center, Giessen, Germany; ^{††}Department of Urology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada; and ^{‡‡}Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France

ABSTRACT Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease characterized by myofibroblast proliferation. Transition of epithelial/mesothelial cells into myofibroblasts [epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)] occurs under the influence of transforming growth factor (TGF)- β 1, with Snail being a major transcription factor. We study here the role of the heat-shock protein HSP27 in fibrogenesis and EMT. *In vitro*, we have up- and down-modulated HSP27 expression in mesothelial and epithelial cell lines and studied the expression of different EMT markers induced by TGF- β 1. *In vivo*, we inhibited HSP27 with the antisense oligonucleotide OGX-427 (in phase II clinical trials as anticancer agent) in our rat subpleural/pulmonary fibrosis models. We demonstrate that HSP27 is strongly expressed during the fibrotic process in patients with IPF and in different *in vivo* models. We showed that HSP27 binds to and stabilizes Snail and consequently induces EMT. Conversely, HSP27 knockdown leads to Snail proteasomal degradation, thus inhibiting TGF- β 1-induced EMT. Inhibition of HSP27 with OGX-427 efficiently blocks EMT and fibrosis development. Controls *in vivo* were an empty adenovirus that did not induce fibrosis and a control antisense oligonucleotide. The present work opens the possibility of a new therapeutic use for HSP27 inhibitors against IPF, for which there is no conclusively effective treatment.—Wettstein, G., Bellaye, P.-S., Kolb, M., Hammann, A.,

Crestani, B., Soler, P., Marchal-Somme, J., Hazoume, A., Gaudie, J., Gunther, A., Micheau, O., Gleave, M., Camus, P., Garrido, C., Bonniaud, P. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J.* 27, 000–000 (2013). www.fasebj.org

Key Words: epithelial-to-mesenchymal transition • mesothelial • pleura • transforming growth factor

IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS (IPF) is an incurable disease characterized by the progressive accumulation of extracellular matrix (1) with myofibroblasts being the main cellular component responsible for the tissue remodeling. The origin of these myofibroblasts is still being discussed; however, one hypothesis is that alveolar epithelial cells transdifferentiate to acquire a myofibroblastic phenotype (2). This process has been named the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT; ref. 3). Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) is considered to be a master switch for the induction of EMT (4, 5). The importance of EMT during lung fibrogenesis is still strongly debated (2, 6, 7).

It is to date unknown why the pathological changes observed in IPF typically start in subpleural lung regions (1, 8). We recently reported that overexpression of TGF- β 1 in the pleural space of rats induced progressive and abnormal collagen deposition within the subpleural lung parenchyma, as seen in IPF in humans. We demonstrated that mesothelial cells undergo transformation in

Abbreviations: α -SMA, α -smooth muscle actin; Ab, antibody; Ad, adenoviral; AddL, adenoviral delete; ASO, antisense oligonucleotide; ASOc, control antisense oligonucleotide; BAL, bronchoalveolar lavage; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; HRP, horseradish peroxidase; HSP27, heat-shock protein 27; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; PBS, phosphate-buffered saline; PFU, plaque-forming unit; PLF, pleural lavage fluid; TGF- β 1, transforming growth factor β 1

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: CHU du Bocage, 14 Rue Gaffarel, Dijon 21079, France. E-mail: philippe.bonnaud@chu-dijon.fr
doi: 10.1096/fj.12-220053

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

c- Articles didactiques

- Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., and Bonniaud, P. 2012. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? *Int J Biochem Cell Biol* 44:1680-1686.
- Bellaye PS, Wettstein G, Bonniaud P. Biologie cellulaire et maladies pulmonaires en 2012. *Rev Mal Respir* 2012 vol 4 100-108
- Bellaye PS, Wettstein G, Bonniaud P. Biologie cellulaire et maladies pulmonaires en 2011. *Rev Mal Respir* 2011 vol 3 3-11



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel



Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity?[☆]

G. Wettstein^{a,b}, P.S. Bellaye^{a,b}, O. Micheau^{a,b}, Ph Bonniaud^{a,b,c,*}

^a INSERM U866, University of Burgundy, Dijon 21033, France

^b Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France

^c Service de Pneumologie, CHU, Dijon 21079, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Heat shock protein
Cytoskeleton
Fibrosis
Cancer
Neurological diseases

ABSTRACT

The cytoskeleton is a highly complex network of three major intracellular filaments, microfilaments (MFs), microtubules (MTs) and intermediate filaments (IFs). This network plays a key role in the control of cell shape, division, functions and interactions in animal organs and tissues. Dysregulation of the network can contribute to numerous human diseases. Although small HSPs (sHSPs) and in particular HSP27 (HSPB1) or α B-crystallin (HSPB5) display a wide range of cellular properties, they are mostly known for their ability to protect cells under stress conditions. Mutations in some sHSPs have been found to affect their ability to interact with cytoskeleton proteins, leading to IF aggregation phenotypes that mimic diseases related to disorders in IF proteins (*i.e.* desmin, vimentin and neuro-filaments).

The aim of this review is to discuss new findings that point towards the possible involvement of IFs in the cytoprotective functions of sHSPs, both in physiological and pathological settings, including the likelihood that sHSPs such as HSPB1 may play a role during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) during fibrosis or cancer progression.

This article is part of a Directed Issue entitled: Small HSPs in physiology and pathology.

© 2012 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The cytoskeleton is a complex network of highly ordered intracellular filaments that play a central role in the control of cell shape, division, functions and interactions in animal organs and tissues. Regulation of this network involves a variety of mechanisms, and dysregulation of the network can contribute to numerous human diseases.

Heat shock proteins (HSPs), including small HSPs (sHSPs), are involved in a wide range of physiological cellular processes and are particularly known for their ability to help cells survive under stress conditions. The molecular mass of small heat shock proteins is low, ranging from 15 to 30 kDa, and they share high sequence homology within their crystallin domain (García-Ranea et al., 2002). In humans, 11 crystallin-related sHSPs have been identified so far and named HSPB1 to HSPB11 (Kampinga et al., 2009). Of these, only HSP27 (HSPB1) and α B-crystallin (HSPB5) are induced by heat shock. However, like HSP20 (HSPB6), they can be expressed in various tissues including the lens, lung,

kidney, bladder, stomach, skeletal muscle and skin, where HSPB1 and HSPB5 have been shown to play a physiological role in non-heat shock-dependent processes, such as cell growth (Garrido et al., 1997; Spector et al., 1993), cell differentiation (Mehlen et al., 1997; Shakoori et al., 1992), apoptosis (Garrido et al., 1999, 2006), tumorigenesis (Garrido et al., 1998), signal transduction and the modulation of cytoskeleton proteins (Lavoie et al., 1993b). The physiological functions of HSPB1 and HSPB5 are tightly regulated by the phosphorylation of serine residues, allowing the formation of either large (hypo-phosphorylated) or small (hyper-phosphorylated) oligomers. Consequently sHSPs are likely to be present in different flavors in the cells and thus to display any of the three well-known and interconnected properties or functions. First, a chaperone activity (Craig et al., 1994; Ellis, 1987; Ellis and van der Vies, 1991), which prevents client-protein aggregation, second, the ability to control the redox status (Federico et al., 2005; Guo et al., 2007) and third, the ability to regulate cytoskeleton dynamics (Landry and Huot, 1995; Mounier and Arrigo, 2002). The aim of this review is to provide an overview of the main cellular and molecular events involved in the control of cytoskeleton dynamics by sHSPs.

2. Cytoskeleton network: overview

In eukaryotic cells (Wickstead and Gull, 2011), the cytoskeleton is a dynamic structure composed of an interconnected

[☆] This article is part of a Directed Issue entitled: Small HSPs in physiology and pathology.

* Corresponding author at: Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France.
E-mail address: philippe.bonniaud@chu-dijon.fr (P. Bonniaud).



Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Biologie cellulaire et maladies pulmonaires

P.-S. Bellaye^{a,*}, G. Wettstein^a, P. Bonniaud^{a,b,c}

^aService de Pneumologie et INSERM U866, CHU du Bocage et Université de Bourgogne, Dijon, France

^bService de Pneumologie, CHU du Bocage, Dijon, France

^cUniversité de Bourgogne, Dijon, France

La présence d'auto-anticorps dirigés contre la périplakine est corrélée à la sévérité de la fibrose pulmonaire idiopathique

Taille C, Grootenboer-Mignot S, Boursier C, Michel L, Debray M-P, Fagart J, Barrientos L, Mailleux A, Cigna N, Tubach F, Marchal-Somme J, Soler P, Chollet-Martin S, et Crestani B. Identification of Perioplakin as a New Target for Autoreactivity in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:759-766

Introduction

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie agressive d'origine inconnue détruisant progressivement la structure du poumon [1]. Devant l'échec des thérapies basées sur l'administration de stéroïdes ou d'immunosuppresseurs, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est un axe de recherche nécessaire et important.

L'observation fréquente d'agrégats de lymphocytes B, de lymphocytes T, de cellules dendritiques matures ainsi que la surproduction d'auto-anticorps et de facteurs cytokiniques profibrosants comme l'IL10, le TGF- β 1 et le TNF- α par les lymphocytes B dans les poumons de patients atteints de FPI, amène certaines équipes à proposer un rôle de l'auto-immunité dans la genèse du processus fibrosant [2].

Dans cette étude les auteurs cherchent à identifier, chez des patients atteints de FPI, des anticorps circulants dirigés contre des antigènes de l'épithélium. Ils découvrent la présence d'auto-anticorps contre la périplakine (PPL), une protéine connue pour interagir avec les filaments intermédiaires.

Méthodes et résultats

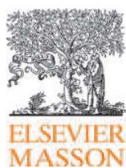
Afin d'identifier les auto-anticorps dirigés contre des antigènes épithéliaux et présents dans le sérum d'individus souffrants de FPI, les auteurs ont utilisé la technique de Western blotting. Ils ont séparé des protéines épithéliales issues d'extraits de placenta humains puis les ont transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes, contenant ainsi les protéines épithéliales, étaient ensuite incubées avec les sérums de patients atteints de FPI ($n = 40$) ou de patients sains ($n = 40$). Cette technique a permis de mettre en évidence que 40 % (16/40) des sérums des patients atteints de FPI contenaient un anticorps circulant d'environ 200 kDa dirigé contre une protéine issue des extraits de placenta humains. Aucun des 40 sérums de patients sains ne contenait cet anticorps.

En utilisant la spectroscopie de masse cette protéine était identifiée comme étant la PPL. Afin de confirmer ce résultat, les mêmes expériences de Western blotting ont été réalisées en utilisant une solution de PPL recombinante (rPPL) comme substrat à la place des extraits de placenta humains. Dans ces

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : philippe.bonniaud@chu-dijon.fr (P. Bonniaud).





Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Biologie cellulaire et maladies pulmonaires

Pierre-Simon Bellaye^a, Guillaume Wettstein^b, Philippe Bonniaud^{a,b,c,*}

^aINSERM U866 Dijon, France

^bService de Pneumologie et Réanimation Respiratoire et INSERM U866, CHU du Bocage, France

^cUniversité de Bourgogne, Dijon, France

Les protéines de choc thermique : bénéfiques ou néfastes ?

La réponse cellulaire au stress

L'état de stress des cellules peut être provoqué par des nombreux facteurs environnementaux (choc thermique, choc oxydatif, UV), l'exposition à des agents pharmacologiques (métaux lourds, alcool, agents oxydants, chimiothérapies anti-cancéreuses) ou encore certaines conditions pathologiques (fièvre, inflammation). Ces stress physiques, chimiques ou physiologiques induisent, dans la cellule, une modification de l'expression de certains gènes appelée *réponse de choc thermique* ou *réponse de stress*. Celle-ci a été mise en évidence en 1964 chez la drosophile [1]. Elle est caractérisée par l'expression d'une famille particulière de protéine, les protéines de choc thermique ou protéines de stress (*Heat shock proteins*, HSPs). Les HSPs sont des protéines cellulaires très conservées d'une espèce à l'autre et sont retrouvées aussi bien chez les bactéries, les levures, les plantes et les animaux que chez l'homme. Alors que les HSPs représentent déjà 2 à 3 % des protéines cellulaires totales à l'état basal, leur expression est fortement induite après un stress. Cette induction se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription, *heat shock factors* (HSF), qui ont la capacité de lier l'ADN sur des sites spécifiques, les *heat shock elements* (HSE), promoteurs des HSPs [2]. Lors d'un stress les agents ou conditions induisant la réponse au stress vont entraîner l'activation par phosphorylation et la trimérisation de HSF-1 qui va alors migrer dans le noyau et

interagir avec les éléments de réponse HSE induisant une activation transcriptionnelle des HSPs.

Lors d'un stress le repliement normal des protéines peut être affecté. L'accumulation de protéines mal repliées, donc dénaturées, dans le cytoplasme perturbe la machinerie cellulaire et entraîne la mort de la cellule. Il a été montré que l'expression des HSPs pouvait être induite par l'injection intracellulaire de ces protéines dénaturées [3]. De manière générale, les HSPs sont capables de prendre en charge ces protéines défectueuses et peuvent les aider à retrouver une conformation correcte ou encore, à l'inverse, les guider vers le protéasome où elles seront détruites afin de protéger la cellule et ainsi éviter sa mort [4]. Cette fonction commune des HSPs est caractérisée par le terme de « chaperon moléculaire » (Fig. 1). Ce chaperonnage par les HSPs peut exister également en dehors de conditions stressantes.

Par ailleurs, certaines HSPs ont aussi un rôle important dans le mécanisme de mort cellulaire programmée appelé apoptose, en régulant positivement ou négativement l'activité des protéines pro-apoptotiques comme les caspases. Ces activités permettent une protection de la cellule face aux agressions qu'elle subit.

Quelles sont les fonctions des différentes HSPs ?

Les HSPs ont été regroupées en plusieurs familles en fonction de leur masse moléculaire. Chez les mammifères les principales familles sont HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et les petites protéines de stress de faible masse moléculaire,

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : philippe.bonniaud@chu-dijon.fr (P. Bonniaud).

