



HAL
open science

Fibrogenèse pulmonaire induite par la toxicité de la bléomycine et son point de départ sous-pleural

Olivier Burgy

► **To cite this version:**

Olivier Burgy. Fibrogenèse pulmonaire induite par la toxicité de la bléomycine et son point de départ sous-pleural. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS009 . tel-01957432

HAL Id: tel-01957432

<https://theses.hal.science/tel-01957432>

Submitted on 17 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
U.F.R DES SCIENCES DE SANTÉ
Ecole Doctorale Environnements - Santé

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 13 décembre 2016

par

Olivier BURGY

**Fibrogenèse pulmonaire induite par la toxicité de la
bléomycine et son point de départ sous-pleural**

Membres du jury :

Pr. Nelly FROSSARD	Rapporteur
Dr. Christophe GUIGNABERT	Rapporteur
Dr. Isabelle COUILLIN	Examineur
Pr. Jean Noël BASTIE	Examineur
Dr. Carmen GARRIDO	Examineur
Pr. Philippe BONNIAUD	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le **Professeur Nelly Frossard** et le **Docteur Christophe Guignabert** d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que le **Professeur Jean-Noël Bastie** pour être examinateur de ce travail. Merci au **Docteur Isabelle Couillin**, qui a suivi mes travaux de thèse depuis le début et qui a également accepté d'examiner ces travaux.

Je tiens tout particulièrement à remercier le **Professeur Philippe Bonniaud** pour son encadrement durant ces dernières années. Merci de m'avoir tant appris et m'avoir fait découvrir le monde de la fibrose pulmonaire. Merci pour avoir eu confiance en mes capacités et m'avoir si intelligemment guider durant cette thèse tout en me laissant libre de conduire mes travaux en autonomie. Merci pour ton extraordinaire disponibilité et ta gentillesse. Merci pour m'avoir inclus et permis de participer à la rédaction des différents articles, revues et demandes de fond. Merci de m'avoir permis de présenter mes travaux à des congrès nationaux et internationaux. J'ai beaucoup appris à tes côtés et j'espère avoir de nouveau l'occasion de travailler avec toi.

Je remercie également le **Docteur Carmen Garrido** pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci d'avoir suivi mes travaux, de m'avoir aidé dans mes projets et dans la valorisation de mes travaux de thèse.

Pour l'implication et l'aide apportées dans mes différents travaux, je remercie : le **Professeur Bruno Crestani** et son équipe, le **Professeur Martin Kolb** et le **Docteur Ali Bettaieb** et son équipe.

Je remercie le **Fond de dotation Recherche en Santé Respiratoire** et la **Fondation du Souffle** pour avoir financé mes trois premières années de thèse et la **Ligue Contre le Cancer** pour m'avoir soutenu avec un financement de quatrième année.

Je remercie le **Docteur Melanie Könisghoff** de croire en mes capacités et de me permettre de faire un post-doc dans son équipe. Merci à la **European Respiratory Society** et la **European Molecular Biology Organization** de croire en notre projet et de me financer une année de post-doc.

Merci à la plateforme **Cellimap** d'**André Bouchot**. Merci à **Audrey** et aux **Amandines** pour les coupes histologiques. Merci pour vos conseils et votre aide, même dans l'urgence.

Merci à **Valérie Saint Giorgio** et à toute l'équipe de l'animalerie pour le temps accordé à mes précieuses souris. Merci pour votre aide.

Merci à **Alexandrine**, **Andreea** et **Lucile** pour m'avoir permis de faciliter mes différents déplacements en congrès. Merci pour votre calme et votre sourire.

Je remercie les différents membres de l'équipe Bonniaud, passés et actuels. Merci à **Nathalie** même si je ne t'ai pas beaucoup côtoyé. Tu avais raison : la zymographie est une belle galère... Merci à **Guillaume W.** pour m'avoir guidé durant mes premiers temps au labo. Merci pour tes conseils.

Pierre-Simon, dit le Magellan, merci ! Pour m'avoir encadré durant mon M2, puis pour ton aide durant la première partie de ma thèse. Je retiendrais ta gentillesse, ton esprit scientifique, ta rigueur et surtout ta rapidité ! J'ai passé de bons moments avec toi, tu m'as beaucoup appris et tu resteras un modèle pour moi. J'ai toujours beaucoup de plaisir à parler science avec toi. Tu as fait un beau post-doc et maintenant de retour à Dijon je te souhaite le meilleur. The Dijon Fibrosis Foundation est en marche !

Merci aussi à : **Julien** pour ton aide sur les IF, la microscopie, l'analyse d'image... Je ne ferai jamais de FLIM-FRET ! **Françoise**, the MCU-PH, merci pour tous tes conseils. Garde ton sérieux et ta bonne humeur et tout devrait rouler ! Just keep focused !! ;-)
Guillaume B., merci pour tous ces moments, j'espère que tu garderas un bon souvenir de ton M2, même avec TIF. Continues à faire de belles immunohisto ! TIF ça se publie ! En parlant de TIF, une pensée à **Juliette**, bon courage dans tes études de médecine. **Florent**, merci pour cette bonne ambiance... FT, FT !

Pierre-Marie, j'espère t'avoir bien formé dans ce laps de temps. Je suis confiant pour les manip *in vivo*, tu sais gérer maintenant. Garde toujours à l'esprit que transfecter des cellules avec 3 plasmides différents c'est bien, mais ça donne quoi dans la vraie vie ? Sois rigoureux, et oublie le coup des westerns étalés sur la semaine... ;-)

J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'équipe Garrido que j'ai côtoyé.

Merci à **Kevin**, pour tout ! Nous avons débarqués le même jour au labo, merci pour toutes nos discussions et tous ces moments. La péniche cancale ce n'était pas tout prêt... lol. Je te souhaite le meilleur pour ton post-doc !

Sébastien Causse, merci beaucoup pour ton aide ! Merci pour le programme de rouge sirius, le FISH TGF- β 1. Merci de m'avoir appris l'analyse d'image post-acquisition ! ;-)

Merci à notre **Arlette** internationale ! Merci pour m'avoir aidé dans mes manip de cytométrie, et d'histologie. Merci pour ton écoute et ta patience, même si « ça sèche »... ;-)

Je remercie **Olivier Micheau** (merci d'avoir accepté de suivre cette thèse), **Oleg** (merci pour toutes les souris !), **Gaétan** (une boîte de cellules tombe au fond d'un tank d'azote chaque jour dans le monde...), **Renaud**, **Guillaume M.** (le M1, M2 et maintenant la thèse), **Nicolas**, **Sophie**, **Sarah**, **Jessica**, **Gustavo**, **Daniel**, **Antoine**, **Victor**, **Christophe**, **Thibault**, **Marine**, **Burhan**, **Kilian**, **Gaétan**, **Margaux**...

Merci à tous ceux au 3^{ème} étage que j'ai côtoyé, **Mélanie**, **Valentin**, **Cédric** et **Angélique**, merci pour vos conseils, **Catherine**, **Lucile**, **Arthur**, **Jean**, **Hélène**, **Jennifer**, **Flavie** etc...

Je terminerai par remercier ma **famille**, notamment **mes parents**. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir poussé dans la vie avec beaucoup d'intelligence et de m'avoir soutenu durant toutes ces années. Je n'en serai pas là sans votre aide. Mon grand frère **Eric** qui forme le club des « 3E » avec mes neveux **Evan** et **Enzo**.

Enfin, je te remercie **Cindy**, pour ton amour. Merci pour toute ton aide, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu... Ça compte beaucoup pour moi, je t'aime. Je n'en serai pas là sans toi.

Résumé

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, sans traitement efficace, caractérisée par une prolifération de myofibroblastes responsables d'une synthèse excessive de matrice extracellulaire. La FPI est caractérisée par un départ sous-pleural suggérant un rôle de la plèvre dans l'initiation de la maladie. Le transforming growth factor (TGF)- β 1 est la cytokine clé du processus fibrosant. Ce facteur est capable d'induire un processus de transformation des cellules mésothéliales pleurales en cellules actives avec un phénotype de myofibroblaste. Les protéines de choc thermique peuvent réguler la voie du TGF- β 1. Le rôle de l'inflammation dans la FPI est controversé. L'importance de la voie caspase-1/IL-1 β , axe majeur de l'inflammation, a été décrite dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire.

Nous avons étudié le rôle de la protéine de stress α B-crystallin dans la fibrose pulmonaire au niveau des cellules mésothéliales avant de rechercher l'importance de l'axe caspase-1/IL-1 β au niveau des cellules structurales pulmonaires dans la toxicité de la bléomycine.

Nous montrons qu' α B-crystallin est surexprimée dans la FPI au niveau des cellules mésothéliales. Chez le rongeur, l'inhibition de cette petite protéine de stress empêche la transformation et la migration des cellules pleurales dans la fibrose pleuro-pulmonaire. Dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par injections intraveineuses répétées de bléomycine, la voie caspase-1 est activée dans les régions pleurales. *In vitro*, l'inhibition de la caspase-1 interfère avec la transformation des cellules mésothéliales. En parallèle, l'activation de la caspase-1 induit une transformation de ces cellules et entraîne une réaction fibrosante chez la souris. Dans une autre partie de ce travail, nous montrons que l'injection chez le rongeur d'une forme déglycosylée de la bléomycine, incapable d'entraîner une activation de la caspase-1, n'induit pas de toxicité pulmonaire tout en gardant une activité anti-cancéreuse. Contrairement à la bléomycine, la déglyco-bléomycine n'entraîne par la mort par pyroptose, processus dépendant de la caspase-1, des cellules épithéliales alvéolaires.

Ce travail confirme l'importance des cellules mésothéliales dans la fibrose pulmonaire. Nos résultats suggèrent qu' α B-crystallin et la voie caspase-1/IL-1 β pourraient être des cibles thérapeutiques dans les maladies fibrosantes comme la FPI ou dans les cas de toxicité pulmonaire de la bléomycine. Enfin, nous apportons une preuve de concept de l'utilisation de la déglyco-bléomycine comme alternative non toxique à la bléomycine.

Mots-clés : Fibrose pulmonaire idiopathique, bléomycine, cellules mésothéliales pleurales, transition épithélio-mésenchymateuse, α B-crystallin, caspase-1.

Table des matières

Résumé	1
Liste des figures	5
Liste des abréviations.....	7
Liste des annexes	10
INTRODUCTION	11
ETAT DE L'ART.....	14
I. LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE (FPI)	15
II. LES MECANISMES DE LA FIBROSE.....	17
II.1. <i>Mécanismes généraux de la cicatrisation</i>	17
II.2. <i>Inflammation et fibrose</i>	21
II.2.1. Place de l'inflammation dans la fibrogenèse.....	21
II.2.2. Origine de l'inflammation	22
II.2.3. Conséquence de l'inflammation.....	22
II.3. <i>L'axe caspase-1/IL-1β</i>	23
II.3.1. Présentation.....	23
II.3.2. Voies d'activation de la caspase-1.....	24
A. Les inflammasomes « classiques »	25
B. L'inflammasome NLRP3.....	26
C. Voies d'activation « non classiques »	27
D. L'inflammasome ; un système d'amplification.....	27
II.3.3. Les mécanismes effecteurs	28
A. La maturation de l'IL-1 β	28
B. La pyroptose.....	30
C. Régulation génique	33
II.3.4. Axe caspase-1/IL-1 β et fibrose pulmonaire.....	33
II.4. <i>Les voies de signalisation de la fibrogenèse</i>	34
II.4.1. Le signal Wingless/integrase-1 (WNT).....	35
II.4.2. Le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)	36
A. Présentation.....	36
B. Activation du TGF- β	38
C. Implication dans le processus fibrosant	39
II.4.3. La signalisation du TGF- β 1.....	39
A. Les récepteurs du TGF- β	40
B. La voie des Smad	41
C. Régulation de la voie des Smad.....	43
II.5. <i>Le myofibroblaste</i>	44
II.5.1. Présentation.....	44
II.5.2. Origine.....	45
A. Les fibroblastes pulmonaires résidents.....	46

B.	Les fibrocytes	46
C.	Les cellules alvéolaires épithéliales	46
III.	LA PLEVRE	49
III.1.	<i>Présentation</i>	49
III.2.	<i>La cellule mésothéliale</i>	51
III.3.	<i>L'importance de la plèvre dans la FPI</i>	53
IV.	LA BLEOMYCINE	56
IV.1.	<i>Mécanisme d'action</i>	57
IV.2.	<i>Utilisation en cancérologie</i>	59
V.	LES MODELES ANIMAUX DE FIBROSE PULMONAIRE	60
V.1.	<i>Le modèle classique de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine</i>	61
V.2.	<i>Le modèle par transfert de gène (Il-1β et TGF-β1)</i>	63
V.3.	<i>Les modèles de fibrose pleuro-pulmonaires</i>	66
V.3.1.	Le modèle AdTGF- β 1 intra-pleural	66
V.3.2.	Le modèle de co-administration bléomycine et noir de carbone	67
VI.	LES OPTIONS THERAPEUTIQUES DE LA FPI	68
VI.1.	<i>Les thérapies anti-inflammatoires et immunomodulatrices</i>	68
VI.2.	<i>Les molécules anti-fibrotiques approuvées</i>	69
VI.2.1.	Pirfenidone	69
VI.2.2.	Nintédanib	70
VI.3.	<i>Les stratégies en cours de développement</i>	71
VII.	LES PROTEINES DE STRESS ET LA FIBROSE	72
VII.1.	<i>Présentation des « Heat Shock Proteins »</i>	73
VII.2.	<i>Les systèmes chaperons</i>	75
VII.2.1.	Le système HSP70	75
VII.2.2.	Le système HSP90	76
VII.2.3.	Le système des chaperonnines	77
VII.2.4.	HSP27	78
VII.2.5.	α B-crystallin	80
VII.3.	<i>HSPs et fibrose</i>	82
VII.3.1.	HSP et signalisation du TGF- β 1	82
A.	HSP70	82
B.	HSP90	84
C.	HSP47	85
D.	HSP27	85
E.	α B-crystallin	86
VIII.	OBJECTIFS DE LA THESE	88
	RESULTATS	89
I.	ARTICLE 1. L'INHIBITION D' α B-CRYSTALLIN A DES EFFETS ANTI-FIBROTIQUES DANS LA FIBROSE PLEURO-PULMONAIRE .	90

II. ARTICLE 2. L'INHIBITION PLEURALE DE L'AXE CASPASE-1/IL-1B DIMINUE LA TOXICITE PRO-FIBROTIQUE DE LA BLEOMYCINE.....	101
III. ARTICLE 3. LA BLEOMYCINE DEGLYCOSYLEE POSSEDE L'ACTIVITE ANTI-TUMORALE DE LA BLEOMYCINE SANS TOXICITE PULMONAIRE.....	127
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	139
I. AB-CRYSTALLIN : REGULATEUR DE LA VOIE DES SMAD	140
II. INTERET DE LA MISE AU POINT D'UN NOUVEAU MODELE DE FIBROSE PLEURO-PULMONAIRE	142
III. ROLE DE L'AXE CASPASE-1/IL-1B DANS LA FIBROSE PULMONAIRE.....	143
IV. IMPLICATION DE LA FORME DEGLYCOSYLEE DE LA BLEOMYCINE	145
V. CONCLUSION GENERALE.....	147
REFERENCES.....	148
ANNEXES	176
Article 1. Données supplémentaires publiées en ligne	177
Article 2. Données supplémentaires soumises pour publication en ligne.	189
Article 3. Données supplémentaires publiées en ligne	196
Curriculum Vitae	204
Autres publications issues des travaux de thèse.....	207

Liste des figures

- Figure 1. Schéma de la progression de la FPI.
- Figure 2. Le cycle de la réparation tissulaire : entre cicatrisation et fibrose.
- Figure 3. L'administration de signaux de mort cellulaire entraîne une réaction de fibrogenèse.
- Figure 4. Modèle d'amplification de la fibrose par les cellules immunitaires.
- Figure 5. Découverte des fragments de la caspase-1 active p20 et p10.
- Figure 6. Les principaux inflammasomes et leur stimuli activateurs.
- Figure 7. Les étapes de la production d'IL-1 β .
- Figure 8. Le phénomène de pyroptose.
- Figure 9. Les caractéristiques morphologiques et moléculaires de la pyroptose et de l'apoptose.
- Figure 10. Modèle du rôle de la gasdermin D dans le processus de pyroptose proposé par He et collaborateurs.
- Figure 11. Représentation de la voie WNT classique.
- Figure 12. Schéma des étapes de la production du TGF- β .
- Figure 13. Cinétique de production et d'activation du TGF- β .
- Figure 14. Modèle de la structure du complexe extracellulaire TGF- β /récepteurs.
- Figure 15. Schéma de la voie classique de signalisation du TGF- β .
- Figure 16. Régulation de la localisation subcellulaire de Smad4.
- Figure 17. Les foyers fibroblastiques.
- Figure 18. Les compartiments cellulaires impliqués dans la population de myofibroblastes.
- Figure 19. Les marqueurs de l'EMT.
- Figure 20. Evidence du phénomène d'EMT des cellules épithéliales alvéolaire dans la FPI.
- Figure 21. Représentation schématique de la plèvre.
- Figure 22. Structure de la plèvre viscérale chez l'homme.
- Figure 23. Les différentes fonctions des cellules mésothéliales.
- Figure 24. La FPI débute classiquement depuis les régions sous-pleurales.
- Figure 25. Les cellules mésothéliales peuvent subir une EMT in vivo.
- Figure 26. Mécanisme d'activation de la bléomycine.
- Figure 27. Avantages et limites des principaux modèles de fibrose pulmonaire chez le rongeur.

- Figure 28. Cinétique du développement de la fibrose après injection intratrachéale de bléomycine.
- Figure 29. Histologie de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.
- Figure 30. Différences histologiques de la fibrose induite par la bléomycine en fonction du mode d'injection.
- Figure 31. Fibrose pulmonaire induite par injection intratrachéale d'adénovirus codant la forme humaine de l'IL-1 β .
- Figure 32. Modèle de fibrose pulmonaire induite par injection d'adénovirus codant la forme humaine du TGF- β 1 actif.
- Figure 33. Modèle du suivi de la localisation des cellules pleurales par injection intra-pleurale d'AdLacZ.
- Figure 34. Modèle de fibrose pleurale induite par injection intra-pleurale d'AdTGF- β 1.
- Figure 35. Modèle de fibrose pleurale induite par co-administration intra-pleurale de bléomycine et de noir de carbone.
- Figure 36. Suivi de la capacité vitale forcée lors de l'essai de phase III ASCEND.
- Figure 37. Analyse des suivis de capacité vitale forcée des essais TOMORROW et IMPULSIS.
- Figure 38. Nomenclature des différentes HSP.
- Figure 39. Le rôle des HSP dans la « unfolded protein response ».
- Figure 40. Schéma du cycle d'HSP70.
- Figure 41. Schéma du cycle d'HSP90.
- Figure 42. Cycle de repliement du système GroEL-GroES.
- Figure 43. Structure et organisation d'HSP27.
- Figure 44. HSP70 est un régulateur important du signal TGF- β 1.
- Figure 45. L'inhibition d'HSP90 interfère avec la voie du TGF- β 1.
- Figure 46. HSP27 stabilise le facteur de transcription Snail et favorise l'EMT.
- Figure 47. α B-crystallin favorise l'EMT en augmentant la voie du TGF- β 1.
- Figure 48. L'inhibition de la caspase-1 interfère avec la transformation induite par le TGF- β 1.

Liste des abréviations

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

AdDL : empty adenovector

AdIL-1 β : Adenovector encoding IL-1 β

AdLacZ : Adenovector encoding β -galactosidase

ADP : Adenosine diphosphate

AdTGF- β 1: Adenovector encoding TGF- β 1

AEC : Alveolar Epithelial Cells

AEC II : type 2 Alveolar Epithelial Cells

AIM2 : Absent in melanoma 2

ALK5 : Activin like kinase-5

ASC : Associated speck-like protein containing a CARD

ATP : Adenosine triphosphate

BAFF : B-cell activating factor

CARD : Caspase Activation Recruitment Domain

DAMP : Danger-Associated Molecular Pattern

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

GSDMD : Gasdermin-D

HAT : Histone acetyltransferases

HDAC : Histone deacetylases

HSE : Heat Shock Element

HSF : Heat Shock Factors

HSP : Heat Shock Protein

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

ICE : IL-1 β Converting Enzyme

IFN- γ : Interferon gamma

IL1-ra : InterLeukin-1 receptor antagonist

LAP : Latency associated peptide

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LDH : Lactate dehydrogenase

LLC : Large Latent Complex

LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein

LRR : Leucine-Rich Repeat

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MMP : Matrix metalloproteinases

NLR : NOD-Like Receptor

NLRC4 : NLR, CARD domain-containing protein 4

NLRP3 : NOD-like receptor, pyrin domain containing 3

NOD : Nucleotide-binding domain

PAI : Plasminogen Activator Inhibitor

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PARP-1 : Poly [ADP-ribose] polymerase 1

PRR : Pattern Recognition Receptor

PYD : Pyrin domain

ROS : Reactive Oxygen Species

SARA : Smad Anchor for Receptor Activation

SBE : Smad-binding element

SLC : Small Latent Complex

SMAD : Mothers Against Decapentaplegic Homolog

TGF- β RI : Récepteurs au TGF- β de type I

TIF-1 γ : Transcription Intermediary Factor 1 gamma

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase

TLR : Toll Like Receptor

TRAIL : TNF-alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand

uPA-R : urokinase Plasminogen Activator Receptor

α -SMA : Alpha-Smooth Muscle Actin

Liste des annexes

- Article 1. Données supplémentaires publiées en ligne.
- Article 2. Données supplémentaires soumises pour publication en ligne.
- Article 3. Données supplémentaires publiées en ligne.
- Curriculum Vitae
- Autres publications issues des travaux de thèse :
 - Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, Besnard V, Joannes A, Colas J, Causse S, Marchal-Somme J, Fabre A, Crestani B, Kolb M, Gauldie J, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. The small heat-shock protein α B-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. J Pathol. 2014 Mar ; 232(4):458-72.
 - Bellaye PS, Burgy O, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? Pharmacol Ther. 2014 Aug ; 143(2):119-32. (revue)
 - Bellaye PS, Burgy O, Colas J, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Small Heat Shock Proteins and Fibrosis. The Big Book on Small Heat Shock Proteins (Part III) 2015. Volume 8 of the series Heat Shock Proteins pp 315-334. (chapitre de livre)

INTRODUCTION

La fibrose est la conséquence d'un mécanisme normal de cicatrisation développé par l'organisme pour lutter contre les diverses agressions tissulaires auxquelles il est soumis. Dans certains cas, ce processus de cicatrisation peut ne pas se résoudre. Il devient alors pathologique pouvant être responsable d'une dégradation des fonctions du tissu concerné. La fibrose pulmonaire, qui peut provenir de plusieurs origines, est une maladie invalidante pouvant conduire à une forte altération des fonctions respiratoires. Cette pathologie se caractérise par une production et une accumulation disproportionnée de matrice extracellulaire, principalement de collagène, dans le parenchyme pulmonaire détruisant la structure alvéolaire des poumons.

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), qui comme son nom l'indique n'a pas d'étiologie connue, est une maladie fatale avec une prévalence de 19,3/100 000 et une médiane de survie de 2 à 5ans après diagnostique (1). Deux molécules, la prifénidone et le nintedanib, ont été approuvées pour la prise en charge de la FPI et permettent un ralentissement modéré de la maladie. Cependant, aucune option thérapeutique n'a fait preuve d'efficacité pour contrecarrer le processus fibrosant. Le besoin de comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place de la FPI demeure donc aujourd'hui primordial. Le développement clinique de la FPI est hétérogène associant périodes stables à des épisodes d'aggravation menant rapidement à la mort (2). Une caractéristique clé de la FPI est l'origine sous-pleurale des lésions qui progressent ensuite vers l'intérieur du parenchyme. Cette spécificité de la maladie suggère un rôle de la plèvre dans la genèse de la FPI. Parmi les cellules essentielles de la fibrogénèse, les myofibroblastes sont considérés comme les cellules clés du processus de fibrose puisqu'ils sont les responsables essentiels de la synthèse de collagène et sont associés à la progression de la maladie. Les cellules épithéliales constituent également un acteur important lors de la fibrose pulmonaire puisqu'elles peuvent s'activer et acquérir un phénotype myofibroblastique et ainsi participer à l'accumulation de collagène 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.

La bléomycine est un agent de chimiothérapie utilisé dans le traitement de différents cancer comme le lymphome de Hodgkin (3). La toxicité pulmonaire de la bléomycine est un frein majeur à son utilisation (www.pneumotox.com) (4, 5). Chez l'homme, dans les cas de fibrose pulmonaire induite la bléomycine, les atteintes toxiques et fibrosantes débutent aussi classiquement au niveau de la plèvre (régions sous-pleurales) (6). La bléomycine est largement

utilisée chez l'animal comme modèle afin d'induire une fibrose pulmonaire. Ce modèle a la particularité d'être associé à une inflammation importante, au moins les premiers jours. Le rôle de l'inflammation dans l'initiation de la fibrogenèse est bien établi mais reste discuté dans la FPI même si plusieurs arguments montrent une phase d'inflammation dans la maladie (7-10). L'axe caspase-1/IL- β est une signalisation clé dans le phénomène d'inflammation (11). Récemment, l'implication de cellules pulmonaires structurales dans la production d'IL- β a été montrée dans des cellules épithéliales alvéolaires primaires dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (12).

Pour lutter contre les agressions auxquelles elles sont soumises, les cellules développent des mécanismes de protection afin de maintenir leurs fonctions. Les protéines de choc thermique (HSP) sont des protéines cellulaires capables d'interagir avec des protéines pour permettre leur stabilisation, leur transport vers les organites ou leur renouvellement (13). Les HSP sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires essentiels tels que l'induction des cytokines, l'inflammation, l'homéostasie du cytosquelette (14) mais aussi dans le cancer (15). De nombreuses études ont attribué des rôles à différentes HSP dans les maladies fibrosantes (16).

Ce travail de thèse est articulé autour de plusieurs projets. Après un état de l'art sur les différents facteurs évoqués ci-dessus nous décrirons les travaux que nous avons menés pendant cette thèse. Tout d'abord, nous avons recherché les effets de l'inhibition d' α B-crystallin dans différents modèles de fibrose pleuro-pulmonaire chez la souris avec une attention particulière au phénomène de transformation des cellules mésothéliales. Par la suite, dans un modèle de fibrose induite par injections intraveineuses de bléomycine, nous nous sommes intéressés à l'implication de la plèvre et des cellules mésothéliales dans l'axe caspase-1/IL- β au niveau pleural et son rôle dans la fibrogenèse. Enfin, dans une dernière étude, nous avons étudié le potentiel thérapeutique d'une forme déglycosylée de la bléomycine avec une étude de ses propriétés anticancéreuses de la bléomycine et de sa toxicité pulmonaire.

ETAT DE L'ART

Après une introduction sur la fibrose pulmonaire idiopathique, nous décrirons les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la fibrogenèse. Les processus initiateurs seront détaillés en insistant sur l'inflammation, avec une description de l'axe caspase-1/IL-1 β , avant d'introduire les acteurs et facteurs de la fibrose avec une attention sur la signalisation du TGF- β 1. La place de la plèvre dans la fibrose pulmonaire sera abordée avant de détailler l'impact toxique de la bléomycine sur le poumon. Nous présenterons les principaux modèles animaux utilisés au cours de ces travaux afin de comprendre les choix que nous avons fait dans nos expériences. Enfin, après avoir discuté les quelques thérapeutiques actuelles indiquées dans la fibrose pulmonaire idiopathique, nous détaillerons l'implication des protéines de choc thermique dans la fibrose pulmonaire et les cibles thérapeutiques potentielles que représentent ces molécules.

I. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

Le poumon peut être le siège de nombreux désordres. Dans certaines conditions pathologiques, le poumon peut devenir fibreux sous l'effet de divers facteurs comme certains médicaments tels que certaines chimiothérapies. Lorsqu'aucun facteur déclenchant n'est identifié, la fibrose pulmonaire est dite idiopathique (FPI). La FPI est un désordre chronique spécifique caractérisé par un phénomène de cicatrisation progressif et une fibrose au niveau pulmonaire causant une perte irréversible de la fonction respiratoire (17). La FPI est une maladie mortelle avec une médiane de survie de 2 à 5 ans après diagnostique (18). Le taux de mortalité des patients souffrant de FPI a été estimé à environ 13/100 000 (19). La prévalence de la FPI semble variable mais tendrait à augmenter avec le temps. Aux Etats-Unis, la prévalence est passée de 13,4/100 000 en 2005 à 18,2/100 000 personnes en 2010 (1). Cette augmentation peut être expliquée par une conscience plus élevée de la FIP de la part des cliniciens et par l'évolution des techniques d'imagerie. L'incidence de cette maladie augmente en fonction de l'âge : de 1,1 pour les 18-34 ans à 19,3/100 000 personnes par an pour les 55-64 ans (1). La FPI a un développement clinique hétérogène associant périodes stables, ou de progression lente de la maladie, à des épisodes d'aggravation (Figure 1) (2). Différents groupes de patients peuvent être définis entre ceux avec une progression lente et ceux montrant une progression rapide des symptômes menant rapidement à la mort. De plus, la progression de la FPI peut être ponctuée de phénomènes d'exacerbation aiguës (ou « acute exacerbation » en anglais) significativement délétères sur le plan clinique pour les patients et pouvant rapidement

mener à la mort. Ils sont définis comme des épisodes de progression brutale sans cause évidente identifiée (20). La cause de ces processus d'exacerbation est encore incomprise même si des infections virales semblent y être associés (21, 22). De même, des études ont montré que les patients fumeurs atteints de FPI développent également de l'emphysème (2).

Aucun traitement efficace de la FPI n'est connu à ce jour, les patients étant classiquement diagnostiqués à des étapes avancées de la maladie. A l'heure actuelle deux composés, la pirfenidone et le nintedanib, ont été approuvés pour le traitement de la FPI (23). Ces molécules permettent de ralentir la progression de la maladie même si leur efficacité reste encore limitée voire controversée. Le besoin de comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place et la progression de la FPI est donc primordial.

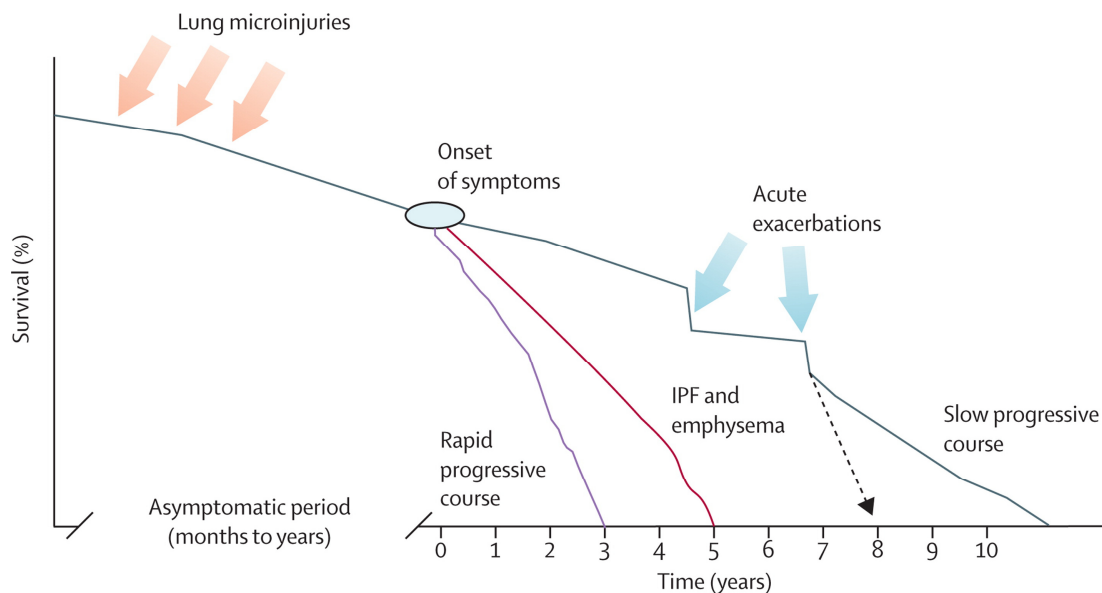


Figure 1. Schéma de la progression de la FPI. La progression de la FPI est hétérogène en fonction des patients. La maladie a une longue période (de quelques mois à plusieurs années) sans symptômes. Les patients sont diagnostiqués (temps 0 sur la figure) lorsque la sévérité des lésions pulmonaires provoque des symptômes cliniques. La plupart des patients suivent un schéma de progression lente du déclin des fonctions respiratoires. Environ 10% des patients peuvent présenter des épisodes d'exacerbation aiguës pouvant amener à la phase terminale de la maladie. Enfin certains patients montrent une progression rapide de la maladie menant rapidement à la mort (d'après King *et al.*, 2011 (2)).

Sur le plan histopathologique, la FPI est définie comme une pneumopathie interstitielle avec des lésions hétérogènes (2). L'observation de coupes de poumons fait apparaître une coexistence de zones normales avec des zones de fibrose cicatricielles, classiquement dans les régions sous-pleurales et regroupées en structures dites en « rayons de miel ». Dans ces régions pathologiques, on peut observer des zones de prolifération de myofibroblastes activés formant

des structures appelés foyer fibroblastiques (ou « fibroblastic foci ») entourés de pneumocytes de type II hyperplasiques.

II. Les mécanismes de la fibrose

II.1. Mécanismes généraux de la cicatrisation

Après une lésion tissulaire, le processus de réparation comporte de manière générale plusieurs étapes (Figure 2) (7). Premièrement, le tissu lésé entraîne une phase d'inflammation avec recrutement de cellules immunitaires capables d'éliminer les débris cellulaires et productrices de cytokines. Une phase de cicatrisation se déroule secondairement où le tissu d'origine est localement remplacé par une matrice extracellulaire provisoire avec prolifération de fibroblastes activés responsables de la contraction de la blessure. Dans des conditions non pathologiques, une phase de retour à la normale permet une restauration de la composition physiologique de la matrice extracellulaire et l'élimination programmée des fibroblastes activés. Dans certains cas encore mal compris, ce processus est dérégulé empêchant ce phénomène de retour à la normale et aboutissant à une situation pathologique comme par exemple la fibrose. La fibrose, résultant d'un processus de cicatrisation incontrôlé, est donc caractérisée par les mêmes grands mécanismes : lésion (épithélium et/ou endothélium), recrutement de cellules immunitaires, sécrétion de cytokines (inflammatoires, profibrosantes) et synthèse de matrice extracellulaire.

L'ensemble des phénomènes impliqués dans la fibrogenèse fait intervenir plusieurs types cellulaires. Les cellules épithéliales alvéolaires sont les composants de base de l'épithélium pulmonaire et sont en direct relation avec la lumière alvéolaire, constituant la première barrière contre les pathogènes ou molécules chimiques contenus dans l'air. Les lésions de cet épithélium sont considérées comme un facteur clé dans le déclenchement dans la FPI (24-26). Les échanges gazeux au niveau pulmonaire sont possibles grâce à une relation étroite entre cellules épithéliales alvéolaires et cellules endothéliales. Parallèlement à la lésion de l'épithélium pulmonaire, l'agression des cellules endothéliales peut également jouer un rôle important dans l'initiation de la fibrogenèse pulmonaire. Lors de l'induction d'une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rongeur, une activation de la voie extrinsèque de l'apoptose dans les cellules endothéliales pulmonaire avec augmentation de la transcription des récepteurs au tumor

necrosis factor (TNF) a été décrite (27). Les cellules endothéliales contribuent à la réaction fibrosante en favorisant le recrutement de macrophages au niveau pulmonaire (28).

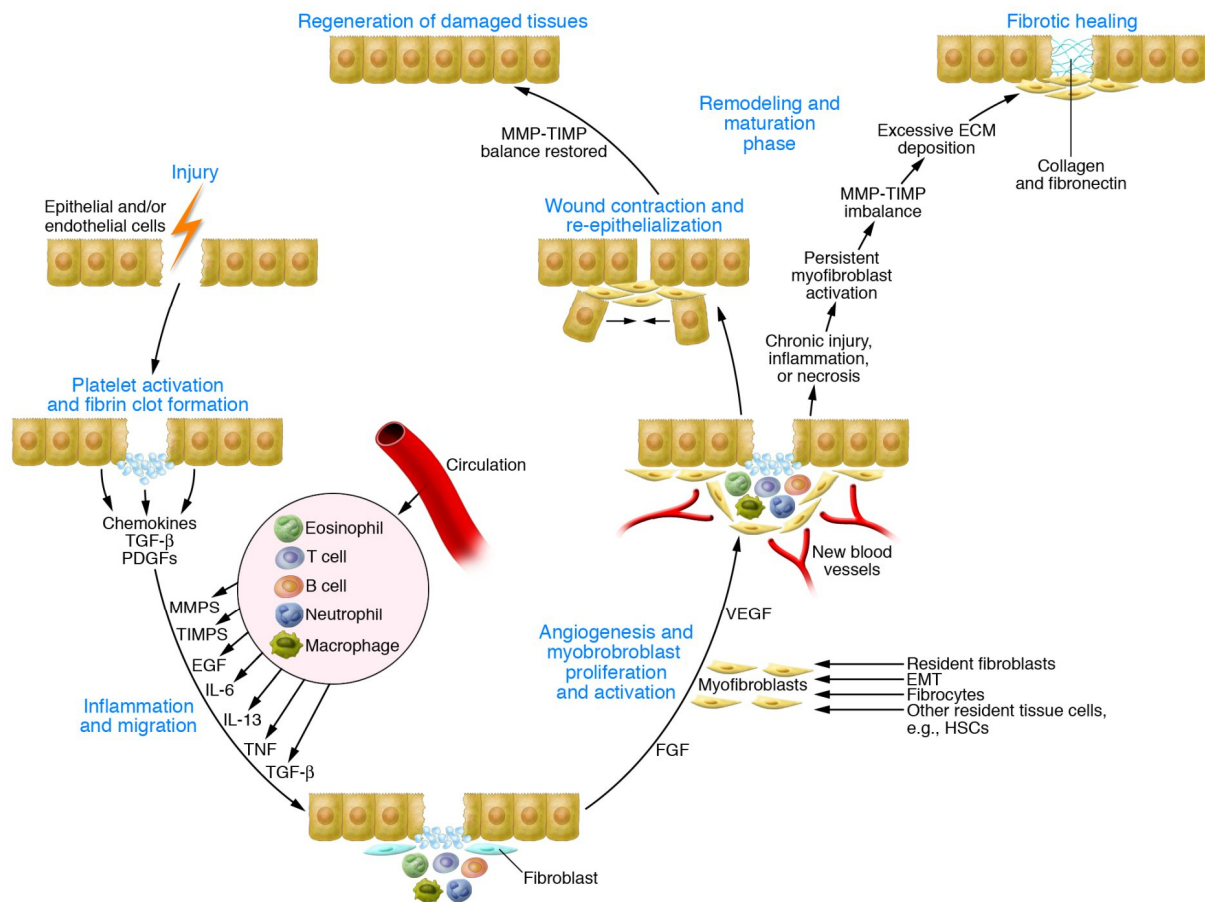


Figure 2. Le cycle de la réparation tissulaire : entre cicatrisation et fibrose. Après un événement initiateur comme une lésion, les cellules épithéliales et/ou endothéliales produisent des facteurs responsables du recrutement de cellules immunitaires au niveau de la lésion. Cette phase d'inflammation entraîne une étape de remodelage puis d'une ré-épithélisation conduisant à la régénération du tissu atteint. Dans certaines conditions, une inflammation chronique entraîne une activation persistante des myofibroblastes amenant à une situation pathologique fibrosante (d'après Wynn, 2007 (7)).

L'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires semble aussi jouer un rôle clé dans l'initiation de pathologies comme la FPI (29). Dans les poumons de patients atteints de FPI et comparé à des patients contrôles, le nombre de cellules épithéliales en apoptose est augmenté (30). Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'apoptose massive observée dans le modèle serait à l'origine d'une activation du système Fas/FasL par surexpression de l'ARN messager de FasL (31). L'inhibition du phénomène de mort cellulaire, par inhibition des caspases ou déficience d'expression de la protéine pro-apoptotique bid, protège les souris de la fibrose induite par la bléomycine (32, 33). De plus, plusieurs études ont montré que le phénomène de mort cellulaire entraîne la réaction de fibrogénèse (31, 34, 35).

Chez la souris, l'injection intra-trachéale de molécules associées à la mort cellulaire tels que l'annexine-V, ou le Fas ligand soluble pour directement induire un phénomène de mort cellulaire induit une fibrose pulmonaire (Figure 3 (34, 35)). De plus, l'injection intra-trachéale de cellules en apoptose induit une inflammation puis une réaction fibrosante chez le rat (36). Si l'apoptose des cellules épithéliales est décrit comme un facteur déclenchant de la fibrose, la résistance à l'apoptose des myofibroblastes est également impliquée dans ces processus de fibrogenèses pathologiques (37, 38).

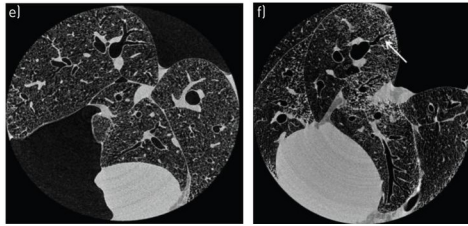


Figure 3. L'administration de signaux de mort cellulaire entraîne une réaction de fibrogenèse. Tomodensitométrie de souris injectée par voie intratrachéale avec de l'annexine-V (droite) ou le contrôle (gauche) (d'après Buckley *et al.*, 2015 (34)).

La lésion de l'épithélium et/ou de l'endothélium pulmonaire est donc un élément initiateur clé du processus de cicatrisation. Dans un contexte normal, ces lésions de l'épithélium et/ou de l'endothélium pulmonaire entraînent le recrutement de cellules immunitaires. Les macrophages et les neutrophiles sont recrutés sur le site des lésions par les signaux apoptotiques. Ils produisent des facteurs pro-fibrosant, comme le transforming growth facteur (TGF)- β , le tumor necrosis factor (TNF)- α , le connective tissue growth factor (CTGF) ou des ligand Wnt, induisant la synthèse de matrice extracellulaire mais aussi sa dégradation en produisant des métallo-protéase de la matrice et de l'élastase (39-41). Les lymphocytes ont également un rôle dans le contrôle de l'environnement cytokinique pouvant mener à la fibrose. Ils peuvent être responsable de la production de TGF- β et d'IL-4 favorisant la production de matrice extracellulaire (42). Cet environnement cytokinique favorise l'activation de fibroblastes en cellules appelées myofibroblastes. Dans un contexte normal, ces cellules permettent la contraction de la lésion et synthétise une matrice extracellulaire provisoire contenant des facteurs entraînant une phase de régénération des épithéliums ou endothéliums (43).

L'établissement de l'environnement cytokinique lors de la phase d'inflammation doit être bien contrôlé car sa dérégulation peut transformer un processus de cicatrisation en phénomène pathologique de fibrose chronique. Ainsi, les cellules immunitaires semblent avoir un rôle important dans les processus fibrosants pathologiques (Figure 4, (44-46)). Le transfert adoptif de lymphocytes T régulateurs (CD4⁺, CD25^{hi}, Foxp3⁺) à des souris aggrave la fibrose induite

par exposition à la bléomycine en favorisant la production de cytokines pro-fibrosantes de type Th2 (47). Néanmoins, la place du système immunitaire adaptatif n'est pas indispensable à la fibrogenèse induite par la bléomycine chez la souris (48). En effet, l'administration de bléomycine à des souris immunodéprimées (« nude » ou « severe combined immunodeficient » -SCID-) entraîne des réactions fibrosantes au niveau pulmonaire. La dérégulation de l'environnement cytokinique associée à la matrice extracellulaire favorise l'accumulation incontrôlée de myofibroblastes.

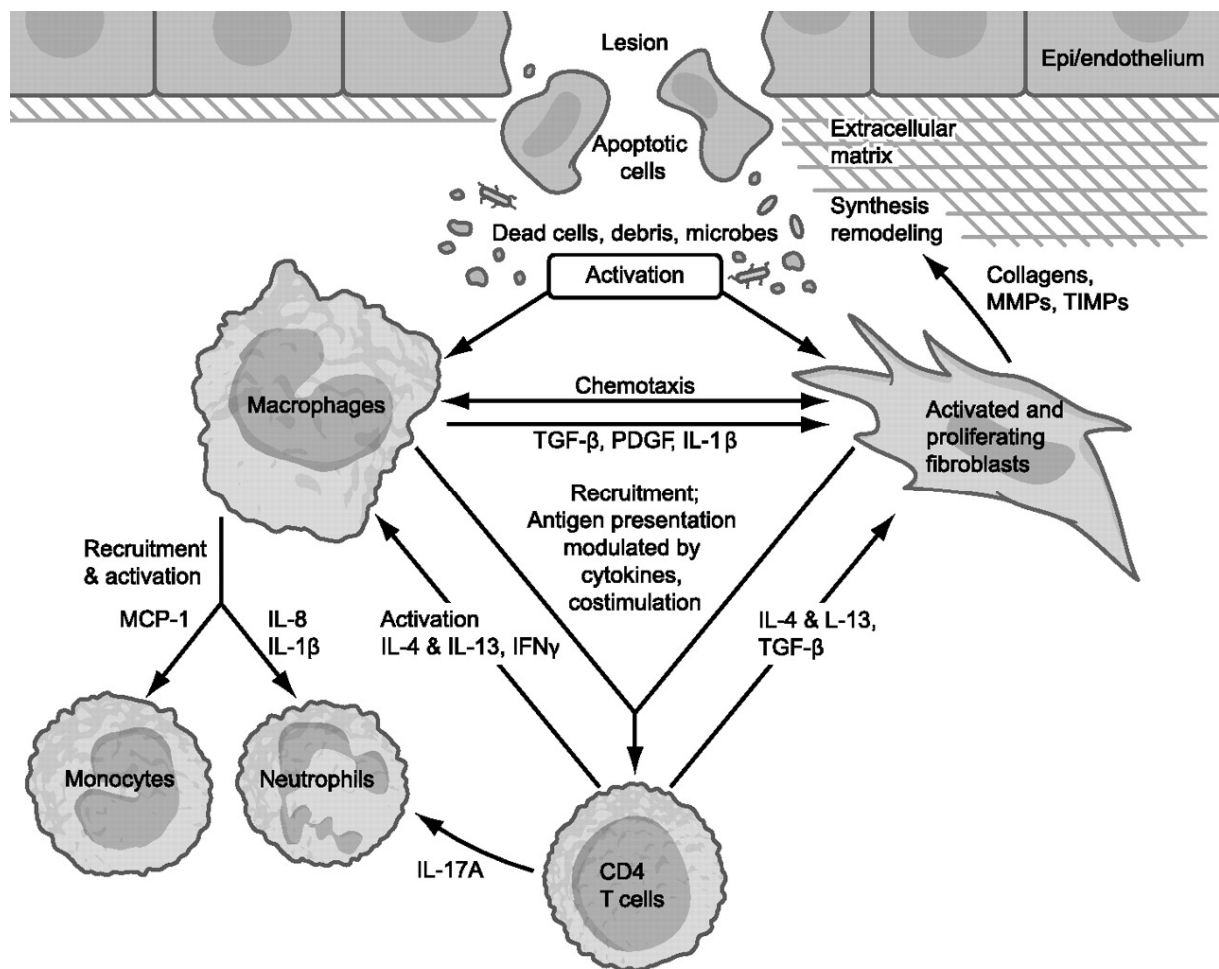


Figure 4. Modèle d'amplification de la fibrose par les cellules immunitaires. La lésion induit l'activation des fibroblastes et des macrophages. Les macrophages exacerbent la phase d'inflammation créée par la lésion, stimulant les fibroblastes. Les fibroblastes favorisent la production d'IL-17 par les lymphocytes T induisant le recrutement de polynucléaires neutrophiles pouvant activer les macrophages (d'après Barron *et al.*, 2011 (39)).

La suite détaillera le rôle de l'inflammation dans le contexte de la FPI avec en particulier la signalisation de l'IL-1β et l'axe de la caspase-1, particulièrement étudié au cours de cette thèse.

II.2. Inflammation et fibrose

II.2.1. Place de l'inflammation dans la fibrogenèse

L'implication de l'inflammation dans la fibrogenèse est bien établie (7). Ce phénomène joue un rôle important dans les processus de cicatrisation « normaux » ainsi que dans les situations de fibroses pathologiques. Dans le contexte de la FPI, le rôle de l'inflammation reste discuté (8-10). En effet, l'efficacité de molécules anti-inflammatoires ou anti-oxydantes en essais cliniques dans le traitement de la FPI n'a pas été démontrée chez l'homme (49). Néanmoins, il existe plusieurs preuves d'une phase d'inflammation dans la FPI. Des analyses du lavage broncho-alvéolaire (LBA) ont montré que les échantillons provenant de patients FPI ont un nombre de cellules immunitaires supérieur à des échantillons de sujets sains (fumeurs ou non-fumeurs) (50). De plus, cette étude montre une augmentation dans les LBA du nombre de cellules de l'immunité innée (macrophages et polynucléaires neutrophiles) mais aussi de lymphocytes. Dans la FPI, une augmentation du recrutement de polynucléaires éosinophiles a aussi été décrite dans les LBA (51). Au niveau pulmonaire, une infiltration par les cellules T CD8⁺ a été montrée. Cet infiltrat est corrélé à la sévérité de la maladie (52). Dans les poumons de patients FPI, des cellules immunitaires activées (lymphocytes T et B, cellules dendritiques) sont regroupées dans des structures lymphoïdes (53). Une étude sur 73 patients souffrant de FPI a analysé l'importance de l'inflammation dans la progression de la maladie mesurée par le déclin de la capacité vitale forcée. La présence et l'importance de l'infiltrat inflammatoire est corrélé à la progression de la maladie chez les patients (54). Durant les phases d'exacerbation aiguë de la FPI, le nombre de polynucléaires neutrophiles est augmenté dans les LBA des patients (55). Comparés à des sujets sains, les patients atteints de FPI ont un taux élevé de lymphocytes T CD4⁺ périphériques. Ces cellules T CD4⁺ expriment plus d'IL-10 et de TGF- β 1 et sont spécifiques d'auto-antigènes (56). Des anticorps dirigés contre la protéine de stress HSP70 ont été retrouvés chez les patients atteints de FPI. La présence de ces anticorps est un signe de mauvais pronostic (57). Chez le rongeur, le rôle du facteur d'activation des lymphocytes B (B-cell activating factor BAFF) a été montré dans la fibrogenèse induite par la bléomycine (58). BAFF est produit par les cellules de l'immunité innée et est surexprimé dans la FPI chez l'homme. Il favoriserait la fibrogenèse via la production de l'IL-17 par les lymphocytes Th17 et serait ainsi un lien entre immunité innée et immunité adaptative.

II.2.2. Origine de l'inflammation

Dans des conditions normales, ce sont les lésions qui sont à l'origine de l'initiation de la phase inflammatoire. Néanmoins, cette inflammation peut devenir chronique. Un phénomène de mort cellulaire massif a été avancé pour expliquer la persistance de cette phase d'inflammation dans la FPI (29, 59). Le phénomène d'apoptose a initialement été décrit comme un phénomène de mort cellulaire n'induisant pas d'inflammation (60). *In vivo*, les cellules engagées dans la voie de l'apoptose expriment des signaux dits « eat-me » à leur surface permettant la reconnaissance et la phagocytose par des cellules immunitaires comme les macrophages. Ce phénomène de clairance est appelé efferocytose. Cette clairance des corps apoptotiques empêche le relargage de contenus cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire qui peuvent être reconnus comme des signaux de danger. Lors de lésions répétées, qui peuvent entraîner un phénomène de cicatrisation chronique, l'apoptose massive ne peut pas être éliminée et l'efferocytose incomplète amène à l'établissement d'une phase d'inflammation (61). Des macrophages alvéolaires isolés de patients atteints de FPI ont une capacité d'efferocytose altérée comparé à des sujets atteints d'autres pneumopathies interstitielles (62). Ce défaut dans l'élimination des cellules apoptotiques peut donc largement contribuer à la persistance de la fibrogenèse dans la FPI.

II.2.3. Conséquence de l'inflammation

Dans les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire chez le rongeur, l'implication de l'inflammation a été clairement démontrée dans la réaction de fibrogenèse. La surexpression chez le rat de l'IL-1 β , une des principales cytokines de l'inflammation, entraîne une fibrose pulmonaire (63). Il a été montré que l'induction d'une phase d'inflammation au niveau pulmonaire entraîne directement un processus fibrosant en favorisant la production de TGF- β 1 (64). En effet, des animaux déficients pour Smad3, une protéine impliquée dans la signalisation du TGF- β 1 sont protégées de la fibrose induite par surexpression d'IL-1 β . L'accumulation d'une autre cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6, a également été décrite dans les LBA de patients atteints de FPI (65). L'inhibition de la signalisation de l'IL-6 interfère avec la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rongeur (66). Le TNF- α a lui aussi été décrit comme pro-fibrosant. En présence de cette cytokine, des fibroblastes pulmonaires surexpriment le TGF- β 1 (67) et les souris déficientes pour le récepteur TNF- α sont protégées de la fibrogenèse induite par l'amiante (68). Cependant, le rôle du TNF- α semble controversé. Une

étude a montré chez le rongeur que l'injection dans une cinétique thérapeutique de TNF- α améliore la résolution de la fibrose induite par la bléomycine (69). Le TNF- α a de nombreux rôles dans l'apoptose et l'administration de cet inducteur de mort cellulaire pourrait favoriser la résolution d'un processus fibrosant en augmentant l'élimination par apoptose de cellules effectrices comme les myofibroblastes ou les macrophages qui prolifèrent anormalement dans les situations de fibroses pathologiques.

II.3. L'axe caspase-1/IL-1 β

II.3.1. Présentation

L'interleukine(IL)-1 β est une des principales cytokines de l'inflammation avec le TNF- α et l'IL-6. La famille de l'IL-1 est composée de trois membres ; les deux agonistes IL-1 α et IL-1 β et le récepteur antagoniste IL-1ra (70). L'IL-1 β est synthétisée sous forme de précurseur de 31 kDa. Le passage de la forme précurseur inactif vers la forme mature active de 17 kDa se fait par clivage protéolytique et requiert la caspase-1 (71). Plus récemment, le clivage de l'IL-1 β par la caspase-8 a été montré dans des contextes d'activation des TLR ou des récepteurs Fas (72). Cependant, la caspase-8 serait moins efficace dans le processus d'activation de l'IL-1 β que la caspase-1.

La caspase-1, appelée également IL-1 converting enzyme (ICE), est une enzyme protéolytique nécessaire à l'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18 (71, 73, 74). Elle fait partie des caspases impliquées dans les processus d'inflammation incluant les caspase-4 et caspase-5 humaines, la caspase-11 murine et la caspase-12 (75). Toutes ces caspases inflammatoires possèdent un domaine CARD (« caspase activation recruitment domain ») impliqué dans les interactions protéiques. La caspase-1 a été premièrement découverte dans des cellules de l'immunité innée comme les monocytes et macrophages puis depuis largement étudiée dans ces types cellulaires (11, 71, 76-78). La caspase-1 est produite sous une forme précurseur inactif de 45 kDa (procaspase-1) qui peut être clivé en deux unités de 20 kDa (p20) et 10 kDa (p10) (Figure 5 (73)).

L'activation de la caspase-1 se fait dans des complexes protéiques nommés inflammasomes (79). L'assemblage de ces complexes multi-protéiques est initié par l'activation de récepteurs sensibles à des signaux de danger ou « pattern recognition receptor » (PRR). Ces signaux peuvent être associés aux pathogènes (« pathogen-associated molecular pattern »,

PAMP) ou des signaux de danger endogènes (« damage-associated molecular pattern », DAMP). Ils peuvent être membranaires comme la majorité des « Toll-like receptor » (TLR) ou cytoplasmiques comme les NOD-like receptor (NLR) qui sont plus particulièrement impliqués dans l'activation de la caspase-1. L'activation des PRR induit un changement de conformation entraînant, par homologie de domaines protéiques, le recrutement de protéines adaptatrices (80). Ces protéines dites d'échafaudage permettent le recrutement de la procaspase-1. La procaspase-1 s'autoactive par clivage protéolytique menant à la forme caspase-1 clivée active.

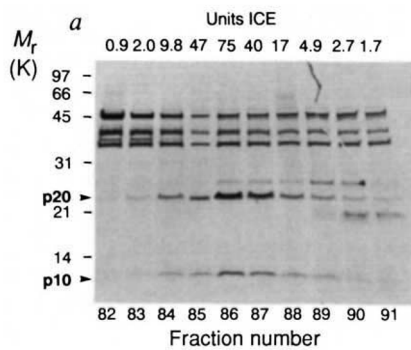


Figure 5. Découverte des fragments de la caspase-1 active p20 et p10. Les auteurs ont isolé la caspase-1 par HPLC à partir de macrophages THP.1. La présence des fragments de caspase-1 à 20 et 10 kDa est corrélée à l'activité caspase-1 mesurée pour chaque fraction (d'après Thornberry *et al.*, 1992 (73)).

II.3.2. Voies d'activation de la caspase-1

Le terme inflammasome a été avancé en 2002 par Tschopp et collaborateurs pour désigner des complexes multi-protéiques cytosoliques qui ont un rôle dans l'activation protéolytique de la caspase-1 (79). Depuis, de nombreux acteurs et voies d'activation de la caspase-1 ont été décrits. La formation de ces inflammasomes implique la reconnaissance de signaux de danger par des PRR cytosoliques. Plusieurs de ces récepteurs ont été décrits (75, 81). On trouve les récepteurs NLR contenant des domaines « nucleotide-binding domain » (NOD) et des séquences « leucine-rich repeat » (LRR), tels que NLRP1, NLRP3 et NLRC4. Ils sont tous composés d'un domaine « nucleotide-binding and oligomerisation domain » (NACHT) associé à des domaines « caspase activation and recruitment domain » (CARD) ou « pyrin domain » (PYD) permettant le recrutement de la protéine « apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD » (ASC). La présence des séquences LRR serait associée à la localisation cytoplasmique de ces récepteurs. NLRP1 est le seul membre incluant un domaine CARD et pouvant donc directement interagir avec la caspase-1. D'autres récepteurs à domaine HIN ou pyrin ont été décrit, comme « absent in melanoma 2 » (AIM2) et la pyrin (82). Ils forment avec les NLR un groupe d'inflammasomes dits classiques.

A. Les inflammasomes « classiques »

De nombreux récepteurs formant des structures de type inflammasome ont été décrits. Ces récepteurs sont activés par différents stimuli comme des PAMP ou des DAMP (Figure 6).

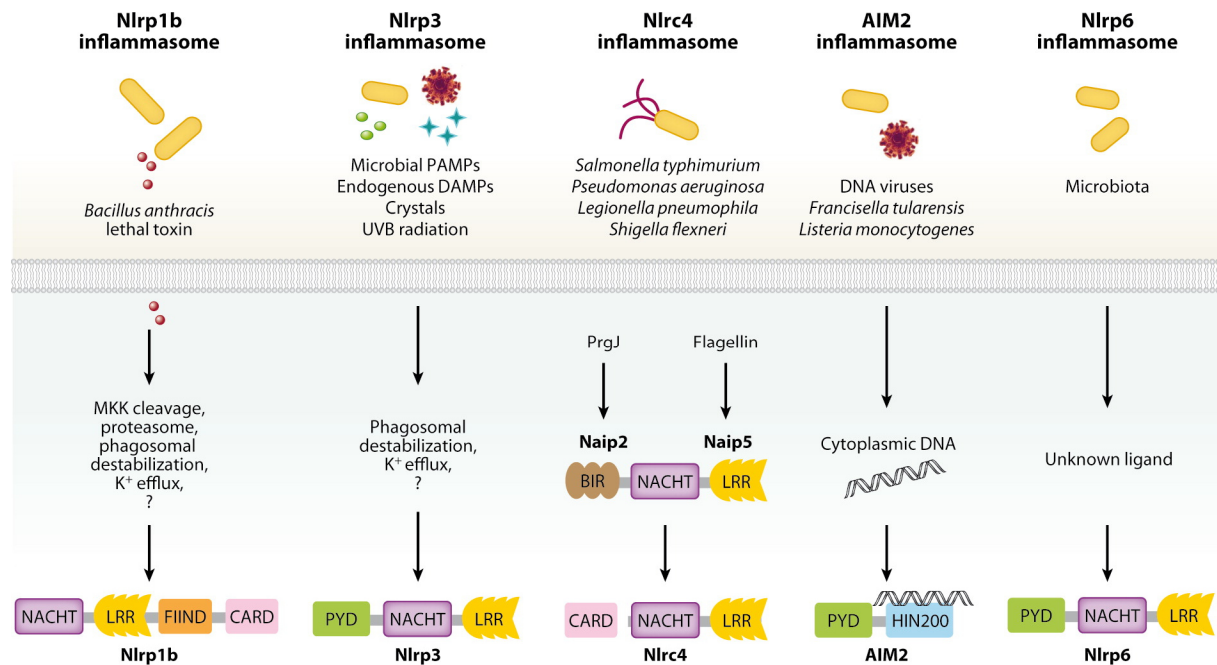


Figure 6. Les principaux inflammasomes et leur stimuli activateurs. Différents récepteurs ont été décrits dans la littérature avec des spécificités envers des stimuli différents. NLRP1 reconnaît la toxine de *Bacillus anthracis*, NLRC4 les bactéries de type *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Legionella* et AIM2 les PAMP issus de *Listeria* ou les molécules d'ADN virales. Les ligands de NLRP6 ne sont pas complètement connus mais semblent être des molécules associées aux bactéries. NLRP3 reconnaît un grand nombre de ligands tels que des PAMP bactériens, des DAMP endogènes ou des cristaux (acide urique) (d'après Lamkanfi & Dixit, 2012 (81)).

L'inflammasome NLRP1 a été le premier décrit en 2002 (79). Une seule forme de NLRP1 a été démontrée chez l'homme alors que plusieurs isoformes existent chez le rongeur. Chez la souris, NLRP1b reconnaît la toxine produite par *Bacillus anthracis* et agirait comme un récepteur leurre de cette toxine. Sa fonction chez l'homme reste mal comprise. NLRC4 a été identifié par son homologie de structure avec la protéine « apoptotic-protease activating factor-1 » (APAF1) (83). Ce récepteur est capable de s'activer suite à la reconnaissance de flagelline bactérienne et d'entraîner la maturation de la procaspase-1 en forme active. AIM2 est un récepteur cytosolique composé d'un domaine HIN200 lui permettant de reconnaître les molécules d'ADN impliquées dans la défense contre les virus (cytomegalovirus) et aussi les bactéries intracellulaires (84). L'activation de AIM2 dans le cas d'infection par bactéries intracellulaires est dépendante de la lyse des pathogènes dans le cytosol. De plus, des études

ont montré que AIM2 est capable de détecter de l'ADN endogène. Cette particularité semble être à la base d'une activité anti-tumorale dans un modèle de cancer du côlon (85). La pyrine est le plus récent récepteur décrit pour former un inflammasome induit par des toxines d'origine bactérienne telles que la toxine B de *Clostridium difficile*, C3 de *Clostridium botulinum*, VopS de *Vibrio parahaemolyticus* ou IbpA de *Histophilus somni* (86). Le mode d'action de ces toxines passe par l'inactivation de la petite GTPase RhoA. C'est l'inactivation de RhoA qui entraîne la formation de l'inflammasome formé par la pyrine. Cependant, la pyrine ne semble pas interagir directement avec RhoA mais avec les molécules d'actine. De plus, l'induction de la dépolymérisation de l'actine entraîne l'activation d'un inflammasome via la pyrine (87).

B. L'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 (aussi appelé NALP3 ou cryopyrin) est le plus étudié et répond à une variété de stimuli incluant non seulement des PAMPs mais aussi des signaux endogènes tels que des cristaux (acide urique, silice, amiante, alum) ou l'ATP extracellulaire (78, 88, 89). L'induction de stress cellulaire par des molécules de chimiothérapie entraîne la formation de forme réactive de l'oxygène (ou « reactive oxygen species » -ROS-) au niveau mitochondrial. Les chimiothérapies ciblant la mitochondrie ont montré le rôle important de ce compartiment cellulaire dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (90, 91). L'induction d'un stress oxydant peut amener au relargage d'ADN mitochondrial dans le cytosol. Ce phénomène serait lié à l'activation de NLRP3 (92, 93). La bléomycine induit le relargage de la cathepsine B des lysosomes vers le cytosol permettant sa liaison avec NLRP3 et l'activation de l'inflammasome (76). Une baisse des ions potassium K⁺ dans le milieu intracellulaire semble être une caractéristique commune de l'activation du récepteur NLRP3 (94). Cependant, l'activité de détection directe de la présence de potassium par NLRP3 n'a jamais été démontrée. Récemment, la protéine « never in mitosis A-related kinase-7 » (NEK7), a été décrite comme un composant clé de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (95). NEK7 est une serine/threonine kinase impliquée dans la dynamique des microtubules lors de la mitose. Dans certaines conditions liées à une baisse intracellulaire en potassium mais encore mal connues, NEK7 se lie à NLRP3 favorisant son activation de façon indépendante de son activité protéine kinase (95-97).

C. Voies d'activation « non classiques »

La caspase-1 peut également être activée via des voies non classiques. La présence d'ATP extracellulaire entraîne une activation de la caspase-1 via le récepteur membranaire P2X7 (98). Suite à l'exposition à *Listeria*, le récepteur pannexin-1, protéine canal impliquée dans le transport de l'ATPn peut activer l'inflammasome NLRP3 (99). Le récepteur P2X7 est exprimé par les cellules épithéliales pulmonaires (100). Une connexion entre le signal P2X7 et la protéine pannexin-1 a été montrée dans la maturation de l'IL-1 β (101). Les autres caspases inflammatoires (caspase-4 et caspase-5 chez l'homme et la caspase-11 chez la souris) semblent aussi être impliquées dans des processus d'activation non classiques (102, 103). L'activation de ces caspases inflammatoires entraîne la maturation de la procaspase-1 en favorisant la formation de l'inflammasome NLRP3 (104). Cette voie d'activation semble répondre majoritairement à la présence de PAMPs tels que le LPS ou des molécules d'ARN double brin poly(I:C). La délétion de la caspase-11 interfère avec l'activation de la caspase-1 et de l'IL-1 β induit par les signaux « non classiques » (103).

D. L'inflammasome ; un système d'amplification

Le terme inflammasome a été proposé par analogie avec l'apoptosome (79), la plateforme multi-protéique responsable de l'activation de la procaspase-3 effectrice de l'apoptose. Ceci a été démontré pour l'inflammasome NLRC4 (105). Concernant le récepteur aux acides nucléiques AIM2, des études structurales ont permis de proposer un schéma selon lequel AIM2 se liant à ses cibles permet l'établissement d'un complexe multimérique (106). De la même façon que pour NLRC4, la présence de ces complexes de récepteurs activés entraîne le recrutement de protéines ASC qui forment des polymères en forme de tube favorisant le recrutement et l'activation de la procaspase-1 (107). Il a récemment été montré l'existence de complexes macromoléculaire d'oligomérisation de protéine ASC (77). Ces oligomères d'ASC sont également retrouvés dans le milieu extracellulaire dans les LBA de patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive. Cette étude a montré la présence d'auto-anticorps dirigés contre la protéine ASC chez des patients avec des maladies auto-immunes. La formation des polymères de protéines ASC semble agir comme un mécanisme d'amplification et est l'élément clé du recrutement et donc de l'activation de la caspase-1. De plus, l'assemblage d'oligomères extracellulaires de protéines ASC forment une plateforme pouvant favoriser la propagation d'un phénomène d'activation de la caspase-1 (108, 109). De la même manière, il a

été montré que l'inflammasome NLRP3 peut être libéré dans le milieu extracellulaire ce qui a pour action d'amplifier la réponse inflammatoire de façon paracrine (110).

II.3.3. Les mécanismes effecteurs

A. La maturation de l'IL-1 β

La conséquence la mieux caractérisée de l'activation de la caspase-1 est la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. La production de forme active de l'IL-1 β peut être présentée en plusieurs étapes ; l'induction de l'expression de l'IL-1 β , l'activation de la caspase-1 et la sécrétion de la cytokine mature active (Figure 7 (111, 112)). Dans des conditions normales, le niveau d'expression de l'IL-1 β est relativement bas. L'induction de son expression implique l'activation de la voie NF- κ B suite à la stimulation de récepteur aux molécules de danger tels que les TLR. Un deuxième signal est nécessaire pour la maturation de la proforme de l'IL-1 β qui passe par l'activation de la caspase-1 via les voies de l'inflammasome comme nous l'avons vu au paragraphe précédent (cf. I.3.2). La dernière étape est la libération de la cytokine mature dans le milieu extracellulaire.

De nombreuses cytokines comme les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α sont externalisées par voie classique ; après synthèse dans le réticulum endoplasmique et passage dans le compartiment de Golgi, le transfert vers la membrane plasmique se fait via des granules de sécrétion. La brefeldin A, inhibiteur du transport du réticulum endoplasmique vers le Golgi, ne permet pas de bloquer la sécrétion de l'IL-1 β suggérant que ce processus ne passe pas par un mode classique (114). Le mécanisme exact est encore mal compris et donne lieu à plusieurs hypothèses : l'exocytose via les des microvesicules lipidiques (exosomes, lysosomes sécréteurs, microvésicules de la membranes plasmiques), la libération par transport spécifique ou encore la libération après lyse de la membrane plasmique dans certains cas de mort cellulaire (112, 115). De nombreux facteurs restent encore inconnus : la maturité de l'IL-1 β présente dans ces vésicules au moment de son export cellulaire ou la présence de molécules impliquées dans la maturation de l'IL-1 β (caspase-1, ASC, NLR). Il a été montré que l'activation de la voie du récepteur P2X(7) induit la sécrétion d'exosomes (116). La présence d'IL-1 β dans ces particules n'a cependant pas été mise en évidence.

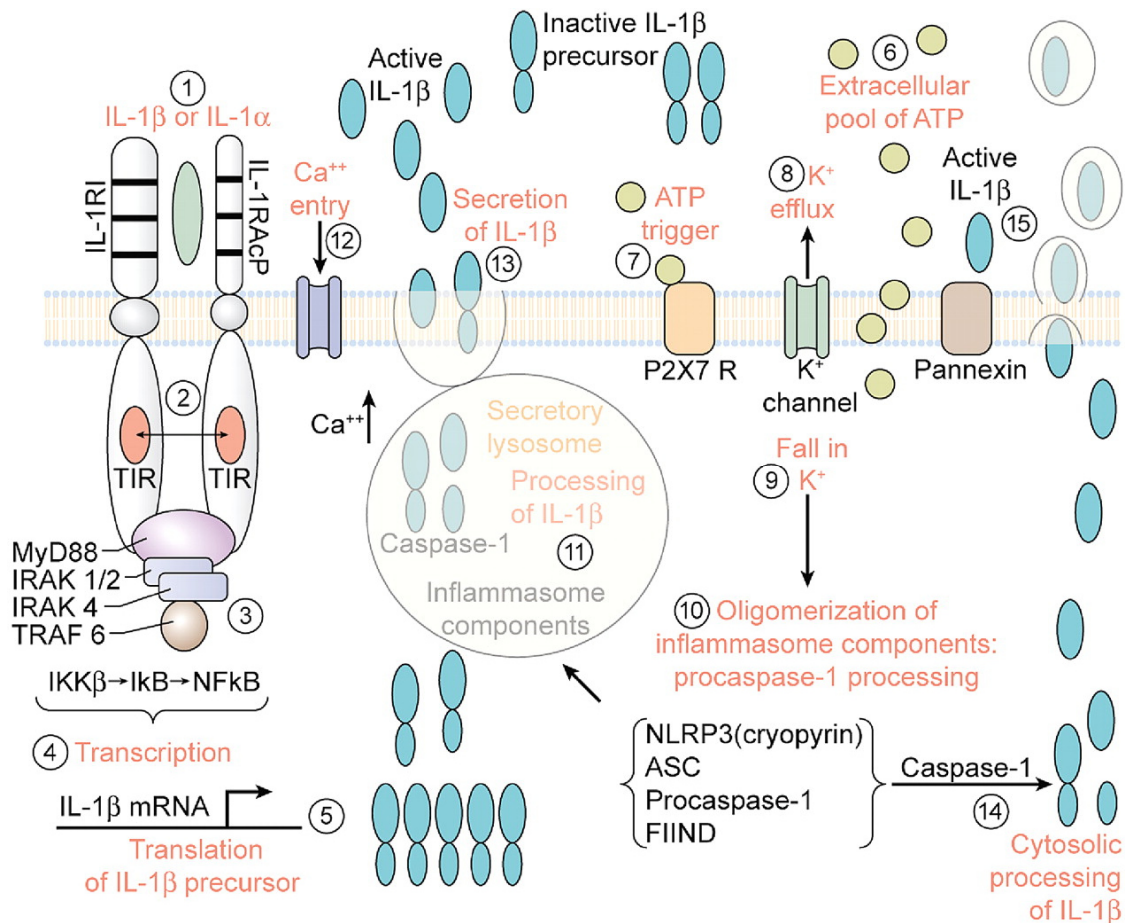


Figure 7. Les étapes de la production d'IL-1β. L'activation des récepteurs à l'IL-1 à la surface de macrophages ou de cellules dendritiques permet le rapprochement de domaines « Toll/interleukin-1 receptor » (TIR) et le recrutement de MyD88 et l'activation de la voie NF-κB et de la transcription de l'IL-1β. Les macrophages sécrètent de l'ATP qui active leur récepteur P2X7 entraînant un efflux de potassium vers le milieu extracellulaire responsable de l'activation de NLRP3 et la formation de l'inflammasome activant la caspase-1. La caspase-1 permet le relargage de forme mature de l'IL-1β clivée dans le cytosol ou dans les lysosomes de sécrétion (d'après Dinarello 2011 (111)).

L'IL-1β a des rôles dans plusieurs maladies à composante inflammatoire telles que l'arthrite rhumatoïde, l'arthrose, la maladie de Crohn, la leucémie myéloïde chronique ou encore certaines maladies vasculaires mais aussi dans des processus physiologiques comme la fièvre (111, 117, 118). Elle serait responsable de l'augmentation des niveaux circulants de monoxyde d'azote, prostaglandine ou leucotriène. L'IL-1 favorise le recrutement de différentes cellules myéloïdes incluant les neutrophiles et les macrophages (119). Elle est aussi impliquée dans l'immunité adaptative. Chez le rongeur, l'IL-1β a un rôle dans le développement d'une population de lymphocytes T CD4+ mémoires lors d'immunisation avec injection de LPS comme adjuvant (120). Cet effet semble corrélé avec la production d'IL-17. L'IL-1β favorise la différenciation des lymphocytes Th17, sous-type de lymphocytes T CD4+ avec une activité pro-fibrosante via la production d'IL-17 (121).

B. La pyroptose

Au-delà de l'importance de la caspase-1 dans la maturation des cytokines pro-inflammatoires, de récentes études ont mis en évidence l'implication de la caspase-1 dans un processus de mort cellulaire nommé pyroptose. La pyroptose est définie comme un processus de mort cellulaire pro-inflammatoire dépendant de la caspase-1. Elle a initialement été montrée dans des macrophages infectés par *Shigella* et confirmée dans des macrophages exposés à de l'ATP extracellulaire ou à des nanoparticules de noir de carbone (122-124). Plus récemment, ce type de mort cellulaire caspase-1 dépendante a été mis en évidence dans des hépatocytes et dans des cellules endothéliales (125-127). Durant des épisodes d'infection, la mort de cellules immunitaires comme les macrophages semblent être un mécanisme de défense pour contrôler les infections microbiennes (125, 128-130). Dans ce processus de mort cellulaire, on retrouve une activation de la voie de la caspase-1 avec formation d'inflammasomes et maturation de la caspase-1 en forme active responsable de la formation de pores dans la membrane plasmique entraînant une lyse osmotique des cellules (131, 132) (Figure 8). Dans un modèle murin de lésion hépatique, il a été montré que les hépatocytes libèrent la protéine « High mobility group box 1 » (HMGB1), associée au dommage à l'ADN, dans le milieu extracellulaire. HMGB1 agit comme un DAMP pour activer l'inflammasome NLRP3 et est alors responsable de l'activation de la voie caspase-1/IL-1 β amplifiant la lésion du foie dans le modèle (133).

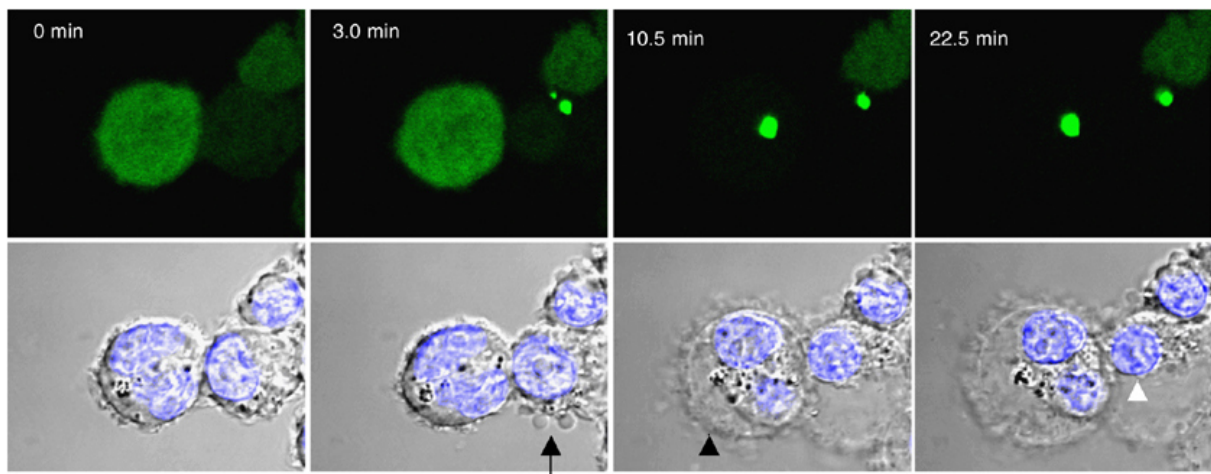


Figure 8. Le phénomène de pyroptose. Des cellules THP-1 exprimant la protéine ASC fusionnée à la GFP ont été cultivées en présence de LPS pour induire la pyroptose. Double observation : fluorescence (marquage ASC, images du haut) et lumière transmise (images du bas). La rupture de la membrane plasmique (flèche noire) intervient dès 3 minutes suivie d'un gonflement de la cellule visible à 10 minutes avant une condensation du noyau (flèche blanche) (d'après Labbé & Saleh, 2008 (132)).

Les récepteurs membranaires P2X7 et Pannexin-1, des récepteurs impliqués dans l'efflux de potassium et d'ATP, semblent avoir un rôle important dans la pyroptose. Le clivage de la

protéine canal pannexin-1 semble être un facteur central dans l'initiation de la pyroptose. En effet, l'activation de la caspase-11 entraîne des efflux de potassium et d'ATP pouvant agir sur P2X7 (134). L'augmentation de la pannexin-1 par induction de P2X7 entraîne un processus de mort cellulaire inflammatoire proche de la pyroptose (135). A l'inverse, la déficience de P2X7 ou de pannexin-1 protège de la pyroptose induite par le LPS ou la toxine du choléra (136).

En comparaison avec l'apoptose, on retrouve dans la pyroptose des mécanismes et acteurs communs (activation de la caspase-7, clivage de PARP-1, clivage de l'ADN) mais aussi différents avec notamment la rupture de la membrane plasmique (137) (Figure 9). Pour ces raisons, la détection du phénomène de pyroptose en recherche n'est pas facile et plusieurs marqueurs plus ou moins indirects étaient étudiés comme l'activation de la caspase-1, l'externalisation des phosphatidylsérines, l'incorporation de l'acridine orange ou la libération de la LDH (138). Plus récemment, il a été proposé une méthode de caractérisation basée sur un marquage positive à l'iodure de propidium, négatif à l'annexine-V avec une forte activité caspase-1 et une faible activité caspase-9 (139). Cependant, la rupture de la membrane plasmique lors de la pyroptose expose les phosphatidylsérines à des molécules extracellulaires comme l'annexine-V (130). Un marquage annexine-V ne permet donc pas de distinguer la pyroptose de l'apoptose.

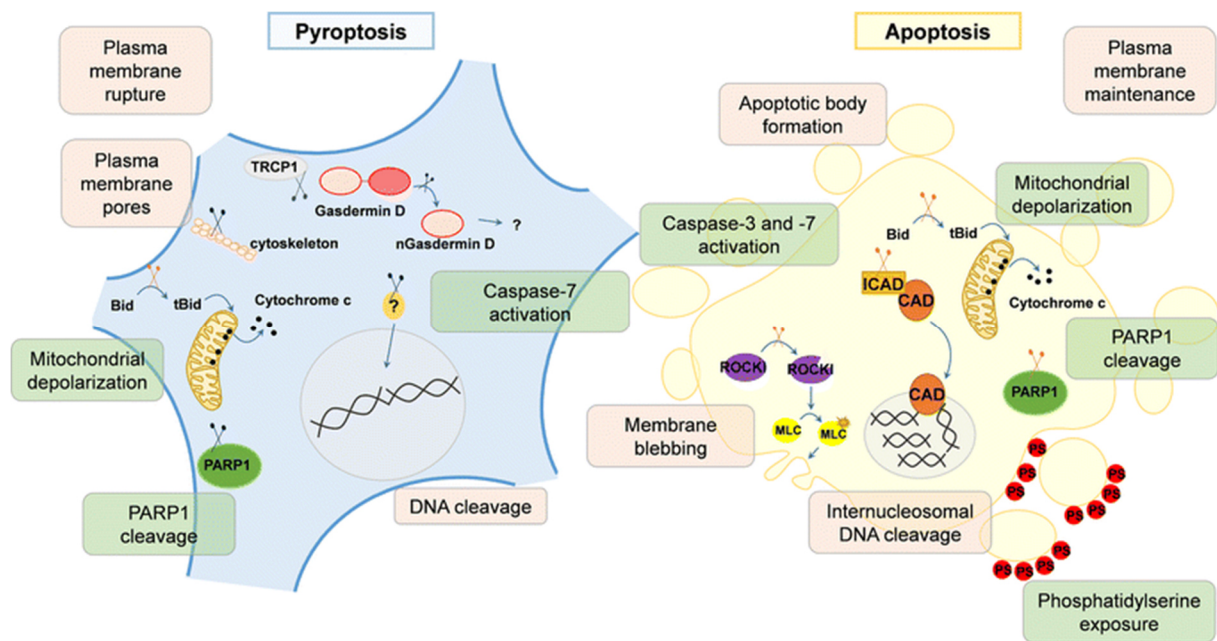


Figure 9. Les caractéristiques morphologiques et moléculaires de la pyroptose et de l'apoptose. Des phénomènes sont partagés entre les deux types de mort cellulaire : l'activation de la caspase-7, le clivage de PARP-1 ou la dépolérisation mitochondriale. A la différence de l'apoptose, des pores se forment dans la membrane plasmique avec rupture de cette dernière lors de la pyroptose. Ceci a pour conséquence une libération du contenu cytoplasmique qui est une différence fondamentale

avec le processus d'apoptose où la formation de corps apoptotique empêche la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire (d'après de Vasconcelos *et al.*, 2016 (137)).

Le mécanisme par lequel l'activation de la caspase-1 induit cette rupture de la membrane plasmique est encore mal connu. Très récemment, la protéine Gasdermin-D (GsdmD) a été décrite comme un marqueur spécifique de la pyroptose (140, 141). La famille des gasdermin est composée de plusieurs membres (142). GsdmA est une protéine impliquée dans le renouvellement de certains épithéliums et est induit par le TGF- β (143). GsdmD peut être clivée par les caspases inflammatoires 1 et 11. Dans des lignées cellulaires humaines, le domaine N-terminal de GsdmD s'accumule à la membrane plasmique durant le processus de pyroptose et peut s'associer aux phospholipides (phosphoinositide, cardiolipine). Le clivage de GsdmD libère le domaine N-terminal qui entraîne la pyroptose en formant des pores de 10 à 14 nm de diamètre dans les structures lipidiques (144-146). De façon intéressante, la seule production du domaine N-terminal de GsdmD est suffisante pour induire la pyroptose (146). Son inhibition par délétion génique supprime la pyroptose chez la souris ou *in vitro* dans des lignées de macrophages RAW 264.7 ou J774 (145, 146). De façon intéressante, la délétion de GsdmD entraîne les cellules vers un processus de mort de type apoptose avec activation des caspases-3 et -7, montrant un dialogue entre les deux mécanismes de mort cellulaire (Figure 10). Chez la souris, GsdmD peut être clivé par la caspase-11. Cette forme clivée GsdmD p30 favorise la formation de pores membranaires responsables de la lyse osmotique de la cellule (147). Cependant, dans des macrophages murins infectés par *Legionella*, la caspase-11 ne serait pas indispensable à la pyroptose induite par la caspase-1 activée par l'inflammasome NLRC4 (148). Ainsi, la caspase-1 aurait un rôle central dans le processus de pyroptose et, suivant les stimuli et les inflammasomes activés, la caspase-11 pourrait être un mécanisme d'amplification.

Le mécanisme de sécrétion de l'IL-1 β reste encore peu compris (cf I.3.3.A). La pyroptose a été avancée comme responsable de la libération de l'IL-1 β qui ne serait donc pas un processus actif (72). Une étude a montré que des macrophages exposés à une combinaison LPS+ATP libèrent de l'IL-1 β après activation du récepteur P2X7 en même temps que la mort des cellules visualisée par mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture (149). Cette étude suggère que le processus de libération d'IL-1 β peut être directement lié à la mort par pyroptose des cellules productrices d'IL-1 β . De plus, l'activation de l'axe caspase-1/IL-1 β dans des modèles déficients pour GsdmD n'interfère pas avec la maturation de l'IL-1 β mais inhibe sa libération (145, 146). Cependant, il a également été montré que l'activation de la

caspase-11 par oxPAPC, un phospholipide oxydé, entraîne la libération de l'IL-1 β sans induire de mort cellulaire de cellules dendritiques (150).

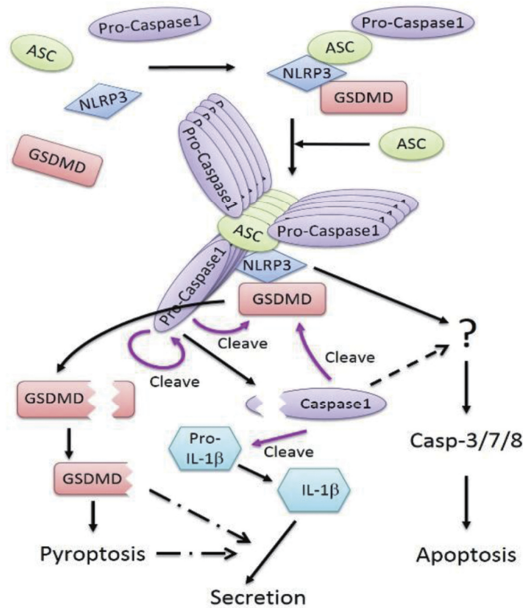


Figure 10. Modèle du rôle de la gasdermin D dans le processus de pyroptose proposé par He et collaborateurs. L'activation de l'inflammasome NLRP3 entraîne la maturation de la caspase-1 pouvant cliver la gasdermin D (GSDMD) induisant la pyroptose. NLRP3 peut également favoriser l'activation de la caspase-3 par les mécanismes encore incompris. L'inhibition de la gasdermin D interfère avec le processus de pyroptose et les cellules meurent par apoptose (d'après He et al., 2015 (145)).

C. Régulation génique

Certaines protéines de cet axe caspase-1/IL-1 β ont récemment été décrites pour avoir des rôles indépendants de l'activation de la caspase-1 ou indépendant de la production d'IL-1 β active. Plusieurs études montrent que NLRP3, le plus étudié des récepteurs impliqués dans l'activation la caspase-1, et ASC sont impliqués dans la signalisation du TGF- β . Des cellules épithéliales rénales primaires isolées de souris déficientes pour NLRP3 ou ASC sont protégées de la transformation induite par TGF- β *in vitro* comparé à des cellules isolées de souris sauvages (151). Cet effet a été aussi retrouvé sur des lignées de cancer du côlon (152). NLRP3 est augmenté en réponse au TGF- β dans des fibroblastes cardiaques murins primaires (153). Dans ce modèle, NLRP3 potentialise la voie du TGF- β en induisant la production de forme active de l'oxygène. Dans la lignée de cancer du côlon HT29, la délétion de NLRP3 réduit l'expression de Snail, un facteur de transcription impliqué dans le processus de transformation cellulaire (151).

II.3.4. Axe caspase-1/IL-1 β et fibrose pulmonaire

La fibrose étant la conséquence d'une phase d'inflammation, l'implication de l'axe caspase-1/IL-1 β a été étudiée durant ces dernières années dans les maladies pulmonaires et/ou fibrosantes (154, 155). La surexpression de l'IL-1 β dans des poumons de souris induit une

fibrose pulmonaire (63). La molécule récepteur antagoniste de l'IL-1, l'IL-1ra, semble également jouer un rôle majeur dans la fibrose pulmonaire. Un polymorphisme du gène IL1RN (codant pour l'IL-1ra) a été décrit et a pour conséquence un niveau plus bas d'expression de ce récepteur antagoniste de l'IL-1. Chez l'homme, ce polymorphisme est lié à la susceptibilité de développer une FPI (156, 157). L'IL-1ra interfère avec la fibrogénèse dans les modèles de fibrose pulmonaire chez le rongeur (158). Le rôle central de la signalisation de l'IL-1 β dans la fibrose pulmonaire a été démontré chez la souris (11). Dans cet étude, ASC est indispensable à la fibrogenèse. NLRP3 semble jouer un rôle clé dans l'activation de l'axe caspase-1/IL-1 β dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire en reconnaissant des signaux de danger comme l'acide urique ou l'ATP extracellulaire (78, 159). Dans la FPI, la libération de plusieurs de ces signaux de danger endogènes a été décrite (113). La fumée de cigarette et les nanoparticules sont aussi des signaux de danger impliqués dans l'activation de processus inflammatoires au niveau pulmonaire pouvant mener à des réactions fibrosantes (160, 161). Les particules de noir de carbone peuvent induire un processus de pyroptose de macrophages alvéolaires humains (124). Chez le rongeur, l'inhibition de la caspase-1 par le YVAD diminue la fibrose induite par le LPS. Dans ce modèle, le YVAD interfère avec la pyroptose des macrophages alvéolaires (162). *In vitro*, les macrophages THP-1 cultivés en présence de nanoparticules d'oxyde d'étain meurent par pyroptose (163). De façon intéressante, ce phénomène dépendant de NLRP3 est diminué dans un système de co-culture avec des cellules mésenchymateuses.

La majorité de la littérature sur l'axe caspase-1/IL-1 β dans l'inflammation et la fibrose pulmonaire est centrée sur le rôle des cellules immunitaires. Cependant, plusieurs études ont montré un rôle de la caspase-1 dans des cellules structurales. Dans un modèle de choc septique, un phénomène de pyroptose a été mis en évidence dans les cellules endothéliales pulmonaires (127). Dans la fibrose hépatique, l'activation de NLRP3 dans les hépatocytes induit leur mort par pyroptose et est responsable d'une phase d'inflammation puis de fibrose (126). En présence du signal profibrotique Wnt3a, des cellules épithéliales alvéolaires murines primaires produisent de l'IL-1 β participant ainsi au contexte inflammatoire dans un modèle de fibrose pulmonaire (12).

II.4. Les voies de signalisation de la fibrogenèse

De nombreuses études suggèrent que la lésion de l'épithélium alvéolaire est à l'origine de la FPI (26). Dans des conditions physiologiques, les lésions initiales peuvent se réparer avec l'activation de différentes voies de signalisation incluant la réactivation de programmes

impliqués dans le développement comme les voies du TGF- β 1, Wingless/intégrase-1 (WNT), Sonic Hedgehog ou la signalisation Notch (24).

II.4.1. Le signal Wingless/intégrase-1 (WNT)

La famille des protéines WNT est composée de plusieurs glyco-protéines et 19 membres sont décrits chez l'homme. Leur production est souvent suivie de modifications post-traductionnelles comme la palmitoylation qui est une étape clé dans le processus de sécrétion dans le milieu extracellulaire (164). Les ligands WNT agissent comme des molécules extracellulaires pour activer différentes voies de signalisations (165). La voie « classique » WNT/ β -caténin passe par la liaison d'un ligand WNT sur les récepteurs Frizzled et les « low-density lipoprotein receptor-related » (LRP) 5 et 6 (166) (Figure 11).

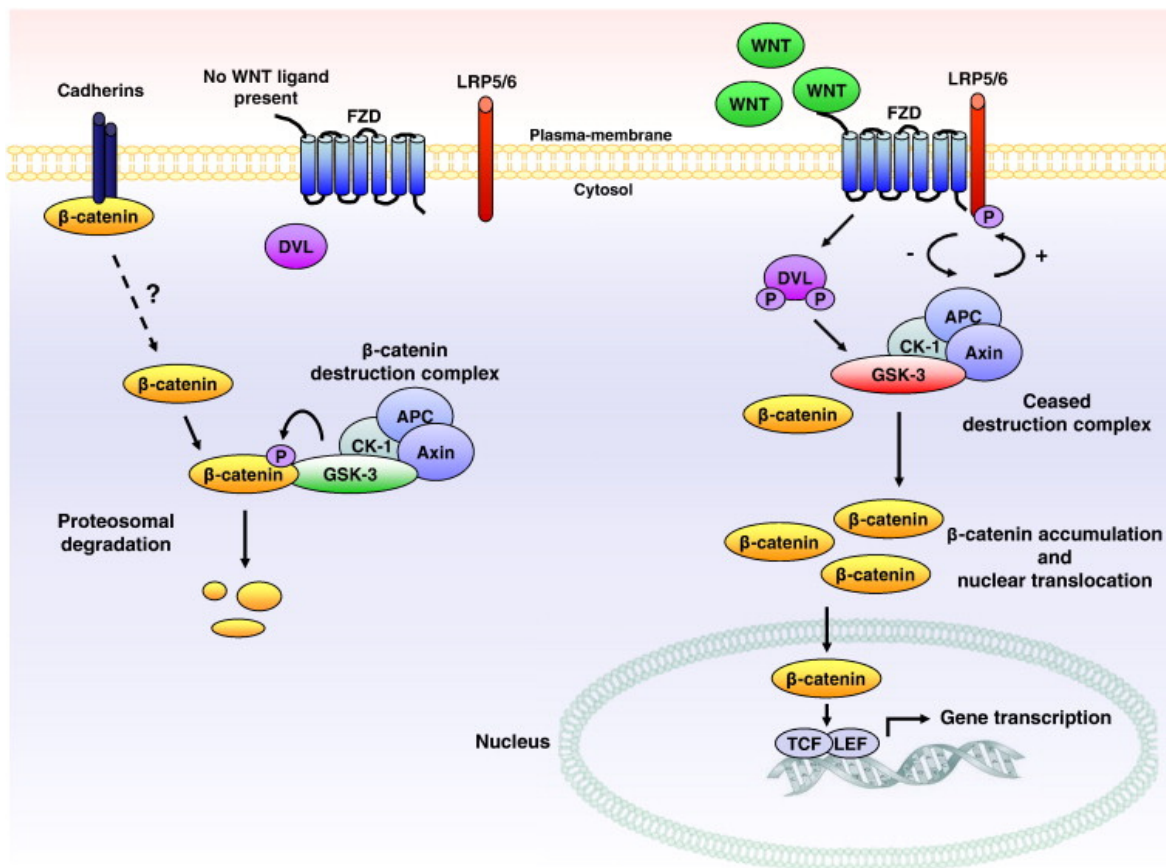


Figure 11. Représentation de la voie WNT classique. En absence de ligand WNT (gauche) ; la protéine β -caténine est liée à des protéines membranaires comme les cadhérines ou reconnue par le complexe de destruction composé des protéines Axin, « adenomatous polyposis coli » (APC), « casein kinase-1 » (CK-1) and « glycogen synthase kinase-3 » (GSK-3). La β -caténine est alors phosphorylée, ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome. En présence de ligand WNT (droite) ; le ligand WNT se lie aux récepteurs membranaires « Frizzled » (FZD) et au « low density lipoprotein receptor related proteins » (LRP) 5 ou 6. La liaison des récepteurs phosphoryle la protéine « dishevelled » (DVL) qui perturbe le complexe de destruction et permet

l'accumulation cytosolique de la β -caténine. Avec les cofacteurs transcriptionnels « T-cell factor/Lymphoid enhancer factor » (TCF/LEF), β -caténine a son action de régulation génique (d'après Baarsma *et al.* 2013 (166)).

Le signal WNT peut induire aussi deux voies dites « non-classiques » : la signalisation WNT/ Ca^{2+} via l'activation de la calmodulin kinase II et la protéine kinase C et la voie WNT/JNK impliquant des GTPases. La voie WNT est impliquée dans différents processus comme la polarité cellulaire dans les épithéliums, la migration ou la différenciation des cellules. Différents inhibiteurs de la voie WNT sont disponibles tels que l'« inhibitor of WNT production » (IWP). IWP inhibe l'action de la porcupine, une acétyltransférase responsable de la palmitoylation et donc de la sécrétion et de l'activité des ligands WNT (167). De nombreux liens entre la voie WNT/ β -caténin et les mécanismes de la fibrogenèse ont été reportés. Par exemple, β -caténin joue un rôle central dans l'activation de cellules épithéliales A549 (168). Le blocage de la signalisation WNT inhibe la fibrose pulmonaire induite chez le rongeur (169, 170). *In vivo*, le rôle pro-fibrosant de LRP5, un corécepteur des ligands WNT, a été mis en évidence dans la FPI (171). De façon intéressante, des souris déficientes pour le gène LRP5 sont protégées de la fibrose pulmonaire uniquement dans des modèles où l'inflammation joue un rôle déclenchant. Des connexions ont été décrites entre le signal WNT et les autres voies impliquées dans le développement (172). Dans la FPI, l'activité pro-fibrotique du ligand WNT10A est dépendante du TGF- β (173).

II.4.2. Le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

La dérégulation de l'environnement cytokinique est un facteur majeur dans l'initiation et la progression du processus fibrosant. Si l'IL-1 β joue un rôle important dans l'initiation de la fibrogenèse, le TGF- β est aussi une cytokine clé de la fibrose (174, 175).

A. Présentation

La famille du TGF- β représente un groupe de cytokines ubiquitaires et multifonctionnelles essentielles dans de nombreux mécanismes tels que le développement, l'inflammation, la cicatrisation, ou l'immunité. Cette famille est composée de nombreuses cytokines dont le TGF- β , les activines, les « bone morphogenetic protein » (BMP) et la myostatine. Chez l'homme, trois isoformes du TGF- β sont décrites. La cytokine active est composée de deux sous-unités liées par un pont disulfure. On trouve donc des dimères TGF- β 1.1, - β 2.2 ou - β 3.3 mais des hétérodimères peuvent aussi se former (176). Ces isoformes ont des fonctions dans des mécanismes spécifiques et ne peuvent pas se compenser entre-elles. Une mortalité périnatale a

été observée chez des souris déficientes pour le TGF- β 2 (177). Dans le contexte de fibrose pulmonaire, l'expression de l'isoforme TGF- β 1 est un facteur central comparé à la surexpression du TGF- β 3 qui induit une réaction fibrosante transitoire (178).

Le TGF- β est traduit sous forme de précurseur inactif de 392 acides aminés. Sa maturation vers sa forme active se fait par plusieurs clivages successifs (Figure 12) (176). Le peptide signal de la pro-forme est éliminé dans l'appareil de Golgi avant clivage par des endopeptidases de type furine libérant la partie C-terminal correspondant aux monomères de 12.5 kDa (179). Le fragment clivé de l'extrémité N-terminal se dimérise pour former un peptide appelé « latency associated peptide » (LAP) dont le rôle est d'aider à la dimérisation des monomères. Ces peptides, liés de façon non-covalente, peuvent interagir avec le peptide « latent TGF- β -binding protein » (LTBP) d'environ 135 kDa portant des résidus mannoses. La présence des deux complexes TGF- β /LAP (aussi appelé « Small Latent Complex » -SLC-), et TGF- β /LAP/LTBP (ou « Large Latent Complex » -LLC-) sont décrits dans la littérature (180, 181). Ces complexes TGF- β latents peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire ou stockés, notamment dans des granules plaquettaires qui constituent un réservoir important de TGF- β chez l'homme (176). De façon intéressante, le phénomène de coagulation semble jouer un rôle dans la pathophysiologie de la FPI. L'usage d'anticoagulant a des effets négatifs sur la survie des patients atteints de FPI (182).

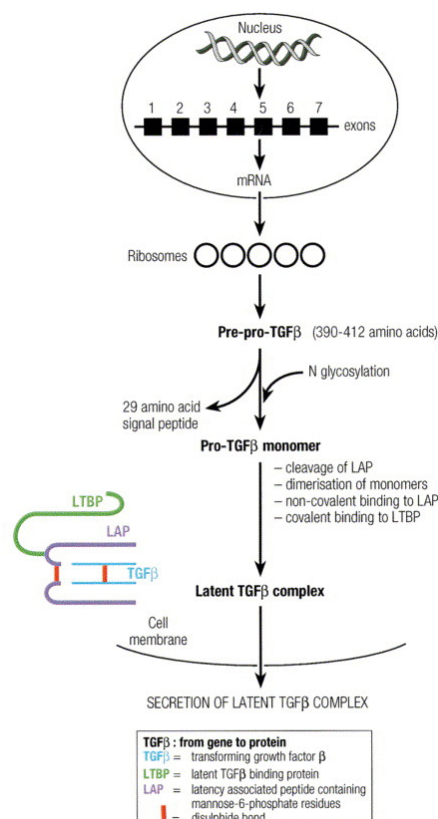


Figure 12. Schéma des étapes de la production du TGF- β . Cas du TGF- β 1 dont la synthèse est la mieux documentée. TGF- β 1 est traduit sous une forme de précurseur qui après N-glycosylation permet la libération de monomères de TGF- β 1 qui se dimérisent, se lient dans le cytoplasme avec les peptides « latency associated peptide » (LAP) et « latent TGF- β -binding protein » (LTBP) formant un complexe de TGF- β 1 latent et inactif pouvant être sécrété dans le milieu extracellulaire (d'après Clark & Coker, 1998 (176)).

B. Activation du TGF- β

Le TGF- β est produit et conservé sous forme inactive et son action sur ses récepteurs spécifiques de la cytokine requiert une phase d'activation (Figure 13). Cette étape d'activation, qui est une étape cruciale dans la régulation de l'activité du TGF- β , peut être effectuée *in vitro* par de nombreux stimuli de dénaturation protéique (lyse acide, exposition à des molécules oxydantes) ou dans l'organisme par différentes protéases clivant le lien TGF- β /LAP. L'étape clé est la dissociation du complexe TGF- β /LAP avec la matrice extracellulaire sous l'action de protéases comme la plasmine (183). La plasmine peut interagir avec la région N-terminale du peptide LAP libérant la forme active de TGF- β (184). Les deux récepteurs « mannose-6-phosphate/type II insulin-like growth factor receptor » (M6P/IGFII-R) et « l'urokinase plasminogen activator receptor » (uPA-R) ont aussi été décrits pour leurs rôles dans l'activation du TGF- β . Ces récepteurs sont exprimés par les macrophages et les cellules endothéliales. Ces deux récepteurs forment un complexe pouvant lier le complexe TGF- β /LAP/LTBP. La partie du TGF- β active peut alors être libérée via l'action de la plasmine produite par uPA-R.

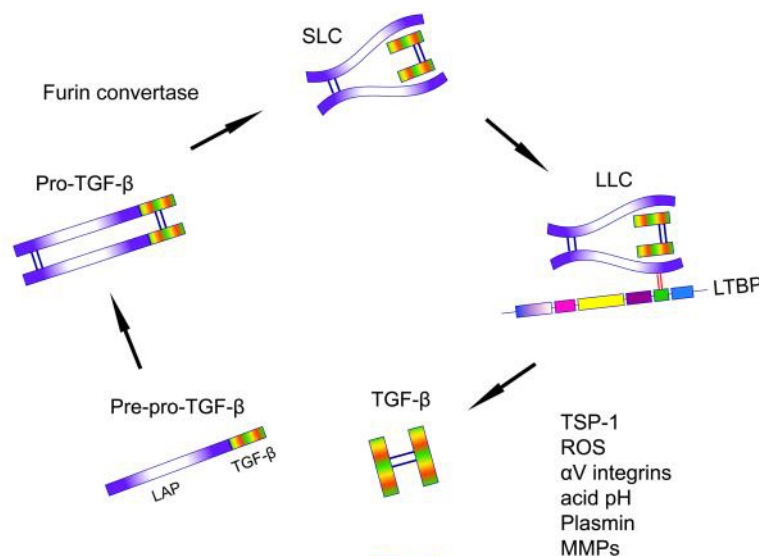


Figure 13. Cinétique de production et d'activation du TGF- β . Le TGF- β est synthétisé sous la forme pre-pro-TGF- β qui se dimérise pour former le pro-TGF- β et après action enzymatique le complexe TGF- β /LAP (ici SLC). Par la suite, le SLC peut interagir avec le latent TGF- β -binding protein (LTBP) pour former le complexe TGF- β /LAP/LTBP (ici LLC). De nombreux facteurs induisent la libération du TGF- β actif à partir du LLC (stress oxydant-ROS, intégrine α v, plasmin, MMPs) (d'après Biernaka 2011 (181)).

D'autres voies d'activation ont aussi été décrites comme celle passant par les intégrines (185). Le TGF- β inactif est reconnu par les intégrines via la séquence d'acides aminés RGD (Arg-Gly-Asp) qui est une séquence de liaison aux intégrines contenue dans le LAP. L'intégrine liée au cytosquelette d'actine α v β 6 peut fixer le précurseur TGF- β via une interaction entre le domaine β 6 et le LTBP (186, 187). L'importance de l'intégrine α v β 6 a été mise en évidence dans la fibrose pulmonaire. L'induction de la fibrose pulmonaire induit chez le rongeur une surexpression de l'intégrine α v β 6 à la surface des cellules pulmonaires. Des souris déficientes pour α v β 6 sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Le rôle d' α v β 8 a

également été décrit dans l'activation du TGF- β . $\alpha\text{v}\beta 8$, en interagissant avec le LAP du TGF- β inactif permettant son exposition à la matrix metalloprotease (MMP)-1 responsable de la libération du TGF- β actif (188). Outre MMP-1, les collagénases MMP-2 et MMP-9 peuvent cliver et activer le TGF- β (181).

C. Implication dans le processus fibrosant

La voie du TGF- β est une voie impliquée dans le développement. Des expériences d'inactivation de l'expression de TGF- $\beta 2$ ont montré que la voie du TGF- β est impliquée dans le développement (177). La déficience pour TGF- $\beta 1$ chez la souris est associée à une mortalité *in utero* dans presque 50% des cas. Les souris TGF- $\beta 1^{-/-}$ sont cliniquement « normales » durant les premiers jours de vie avant l'apparition de maladies à composante inflammatoire. Le TGF- β est aussi connu pour son rôle dans les processus de cicatrisation et donc dans les désordres de type fibrotique. Les processus de cicatrisation et de fibrose font intervenir un recrutement de cellules immunitaires, une prolifération et une activation de fibroblastes et une production excessive de matrice extracellulaire. Le TGF- β et plus particulièrement l'isoforme TGF- $\beta 1$ joue un rôle central dans ces processus. Lors d'une lésion, les plaquettes vont s'activer et libérer du TGF- $\beta 1$ latent qui peut être activé au site de la lésion et diffuser dans l'organisme. Un gradient de TGF- $\beta 1$ permet alors le recrutement de cellules immunitaires qui sont activées sur le site de la lésion par de fortes concentrations de cytokines pro-fibrosantes. Les macrophages, avec les cellules résidentes (épithéliales, endothéliales, fibroblastes), produisent des facteurs pro-fibrosants FGF, TNF, IL-1 mais aussi du TGF- $\beta 1$ entretenant et augmentant son action (189). Le TGF- $\beta 1$ a aussi comme conséquence finale d'activer les fibroblastes induisant une surproduction de matrice extracellulaire. Ce phénomène d'amplification semble être à la base de la transition d'un processus de cicatrisation vers une situation pathologique de fibrose chronique. Cependant, un rôle important semble être joué par le processus d'activation du TGF- $\beta 1$. Dans les poumons de patients atteints de FPI, le taux de TGF- β actif est augmenté alors que la forme synthétisée inactive reste stable (190).

II.4.3. La signalisation du TGF- $\beta 1$

La signalisation du TGF- β passe par différentes voies. La voie dite classique fait intervenir les protéines de la voie de signalisation intracellulaire des Smad. TGF- β peut aussi activer d'autres voies comme les voies « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) : « extracellular signal-regulated kinase » (ERK), p38 MAPK et « c-Jun-N-terminal kinase »

(JNK). Ces voies sont indépendantes de la voie des Smad même si des régulations croisées ont été mises en évidence. TGF- β impacte également les voies PI3 kinase/Akt et Rho GTPase. De nombreuses études ont montré le rôle déterminant de la voie ALK5/Smad3 dans le processus fibrosant (191).

A. *Les récepteurs du TGF- β*

Les cytokines de la superfamille du TGF- β se lient et activent des récepteurs transmembranaires (192). Chez l'homme, 12 de ces récepteurs ont été décrits, 7 sont des récepteurs dits de « type I » (TGF- β RI) ou « activin like kinase-5 » (ALK) et 5 « de type II » (TGF- β RII) (193, 194). L'ensemble de ces récepteurs ont une organisation en plusieurs domaines : un domaine N-terminal extracellulaire de liaison au(x) ligand(s), un corps transmembranaire et une partie C-terminal intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase. Il existe des différences entre les deux types de récepteurs. Les récepteurs de type I possèdent dans la partie N-terminal une séquence de résidus SGSGSG (domaine « GS ») phosphorylé par les récepteurs de type II. Les récepteurs de type II sont responsables de la liaison du ligand. La liaison TGF- β /TGF- β RII entraîne le rapprochement de monomères de récepteur pour former un complexe composé de 2 TGF- β RI et 2 TGF- β RII permettant la phosphorylation des récepteurs de type I par TGF- β RII. Le TGF- β interagit alors avec les domaines des 4 récepteurs (Figure 14).

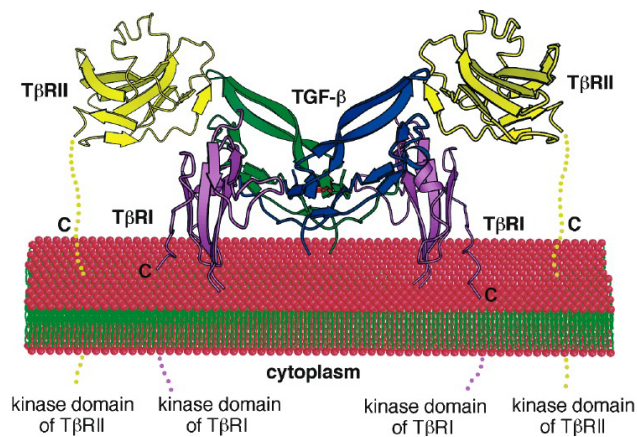


Figure 14. Modèle de la structure du complexe extracellulaire TGF- β /récepteurs. Le TGF- β interagit premièrement avec les TGF- β RII et induit le rapprochement des TGF- β RI ce qui permet la transphosphorylation des domaines intracellulaires des récepteurs (d'après Shi & Massague 2003 (194)).

L'activation du TGF- β RI entraîne alors la suite de la cascade intracellulaire de phosphorylations des protéines de la voie des Smad. Dans le contexte de la fibrose pulmonaire, les récepteurs TGF- β RII et ALK5 (récepteur TGF- β de type I) sont particulièrement impliqués. Le blocage d'ALK5 interfère avec la fibrose induite chez le rongeur (191). Les niveaux des récepteurs TGF- β RII et ALK5 sont altérés dans la FPI (190). L'expression d'ALK5 est réprimée à la surface des cellules épithéliales, interférant avec le rôle de TGF- β dans l'inhibition

de la prolifération des cellules épithéliales favorisant ainsi la réparation d'épithéliums endommagés. A la surface des fibroblastes, TGF- β RII et ALK5 sont surexprimés, ce qui permet leur prolifération et leur activation.

B. La voie des Smad

La voie des Smad (« mothers against decapentaplegic homolog ») est une voie de signalisation intracellulaire qui permet la transduction du signal de la liaison du TGF- β aux récepteurs membranaires vers le noyau cellulaire et la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (192, 194) (Figure 15).

La voie des Smad fait intervenir un ensemble de protéines dont huit membres ont été identifiés sur la base de différences structurales et fonctionnelles. Ces membres ont été divisés en trois groupes: 1) les Smad associées aux récepteurs (R-Smad) qui sont les substrats directs des récepteurs de la famille du TGF- β (Smad1, 2, 3, 5, 8), 2) la Smad co-régulatrice (Smad4), et 3) les protéines Smad inhibitrices (Smad6, 7) qui ont un rôle antagoniste de la fonction de signalisation des R- et Co-Smad (195). Parmi les R-Smad : Smad1, Smad5 et Smad8 sont des substrats pour les récepteurs aux BMP tandis que Smad2 et Smad3 sont des substrats du TGF- β R1 (194). Les R-Smad, ainsi que la co-Smad ont une homologie de structure caractérisée par deux domaines conservés « homology MAD domains » (MH)1 en N-terminal et MH2 en C-terminal séparés par une région de liaison dont la séquence est variable (196). Les R-Smad peuvent interagir directement avec le TGF- β R1 activé et sont ensuite phosphorylées sur deux résidus sérines dans un motif SSXS conservé dans leur domaine C-terminal. La protéine « Smad Anchor for Receptor Activation » (SARA) est une protéine d'ancrage qui peut interagir directement avec les R-Smad et avec le TGF- β R1 (197). Elle favorise le recrutement de Smad2 et Smad3 au niveau du récepteur activé.

La phosphorylation des R-Smad entraîne leur dissociation de SARA. Les résidus phosphorylés sont reconnus par les domaines MH2 d'un autre R-Smad amenant à la formation de dimères (198). Le type d'association des R-Smad, en homo- ou hétéro-dimères, reste encore mal documenté. Les dimères de R-Smad sont reconnus par la protéine Smad4. La protéine Smad4 est liée à TRAP-1 dans le cytoplasme (199). Le rôle de TRAP-1 est peu connu mais la délétion de cette protéine semble diminuer l'interaction de Smad4 à Smad2. Smad4 se lie au dimère de R-Smad par affinité de son domaine MH2 pour les résidus phosphorylés du dimère. La liaison à Smad4 est un évènement clé qui permet la translocation nucléaire du complexe R-

Smad/Smad4 (200). L'import se fait de façon différente selon la nature du dimère. Smad3 phosphorylé s'associe à l'importin- β 1 permettant l'entrée dans le noyau du complexe. La forme phosphorylée de Smad2 ne se lie pas aux importines et semble entrer de façon automatique dans le noyau. Une fois localisé dans le noyau, les Smad peuvent directement se lier à l'ADN grâce à une séquence consensus appelée « Smad-binding element » (SBE). La liaison à l'ADN est augmentée par la présence de facteur de transcription, souvent tissus spécifiques (192). Parmi ces facteurs, on retrouve des enzymes liées aux modifications post-traductionnelles des histones : « histone acetyltransférases » (HATs) et « histone deacetylases » (HDACs), responsables des transferts de groupement acétyl, ou des enzymes responsables de la méthylation des histones (201).

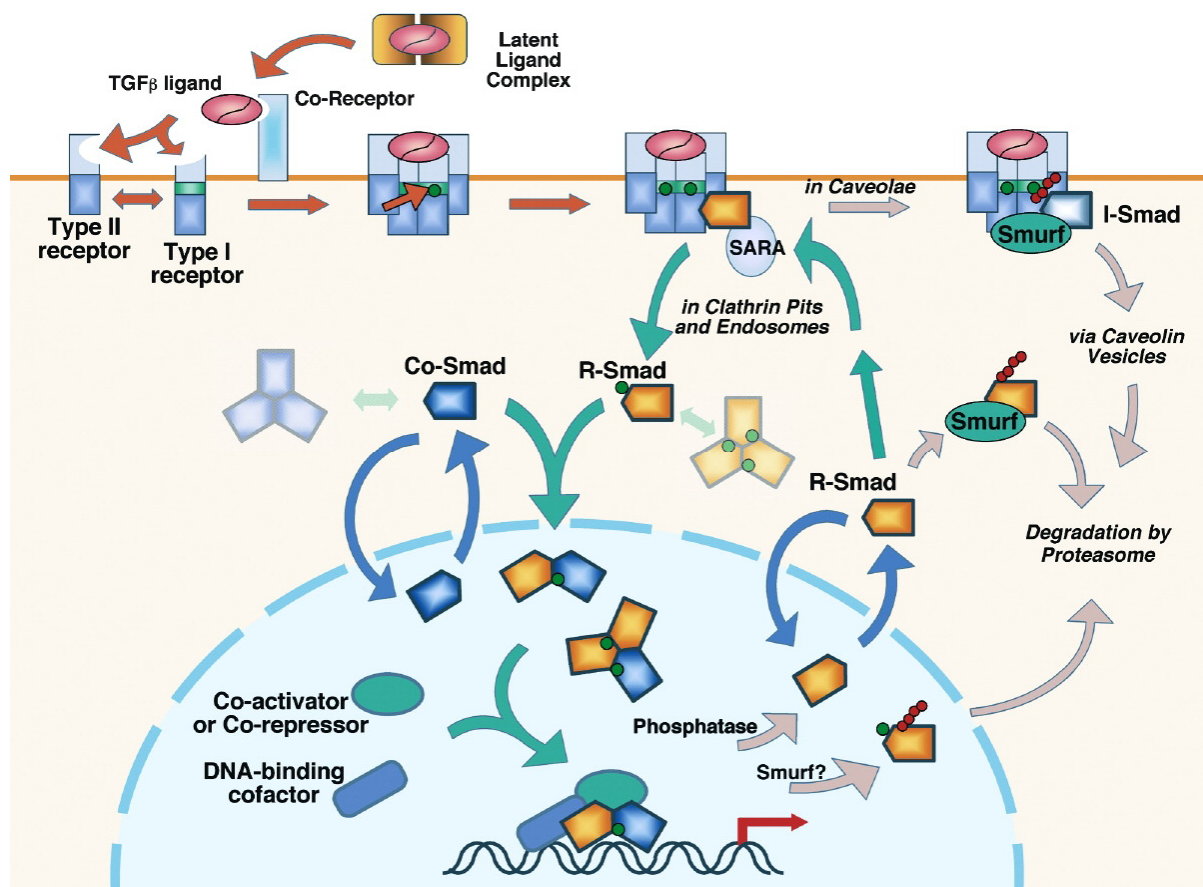


Figure 15. Schéma de la voie classique de signalisation du TGF- β . Le TGF- β est produit sous forme latente dans le milieu extracellulaire. Après activation, il se lie au récepteur de type II (TGF- β RII) puis à celui de type I (TGF- β RI) entraînant la phosphorylation de TGF- β RI. Le TGF- β RII activé recrute la protéine d'ancrage SARA et les R-Smad. La phosphorylation des R-Smad par TGF- β RI entraîne leur interaction avec Smad4 permettant la translocation nucléaire du complexe. Dans le noyau, les Smad se fixent à l'ADN sur les régions consensus SBE et participent à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (d'après Shi & Massague 2003 (194)).

C. Régulation de la voie des Smad

Comme toutes les voies de signalisation, la voie des Smad est finement régulée à différents niveaux. Tout d'abord, un point de régulation se trouve au niveau des récepteurs membranaires. La Smad initiatrice Smad7 interfère avec le recrutement des R-Smad au niveau du récepteur activé (202). Cette action est potentialisée en présence de la protéine adaptatrice STRAP-1 (203). Le niveau d'expression des récepteurs à la surface des cellules est régulé par ubiquitination. Avec la protéine Smurf, Smad7 entraîne l'ubiquitination puis la dégradation par le protéasome du récepteur de type I (202, 204). Plus récemment la protéine à activité ubiquitine ligase « Transcription Intermediary Factor 1 gamma » (TIF-1 γ , aussi appelé TRIM33) a été décrite pour favoriser la dégradation du récepteur de type I dans le système hématopoïétique (205).

La protéine Smad4 est aussi un facteur clé dans la régulation de la voie des Smad. La délétion de Smad4 interfère avec la signalisation du TGF- β dépendante de Smad3 (206). Des souris où l'expression de Smad4 est supprimée dans les cellules épithéliales rénales sont protégées de la fibrose rénale induite expérimentalement. Smad4 semble effectuer un cycle entre le cytoplasme et le noyau de façon indépendante de celle des autres Smad (207). A l'état basal, Smad4 entre dans le noyau et est exporté directement vers le cytoplasme via la protéine CRM1 (208). Si la majorité des protéines de la voie des Smad sont régulées par phosphorylation, la régulation de Smad4 se fait par ubiquitination (209). Il a été montré que le statut d'ubiquitination du résidu lysine 519 de la protéine Smad4 contrôle sa localisation (Figure 16) (200, 210).

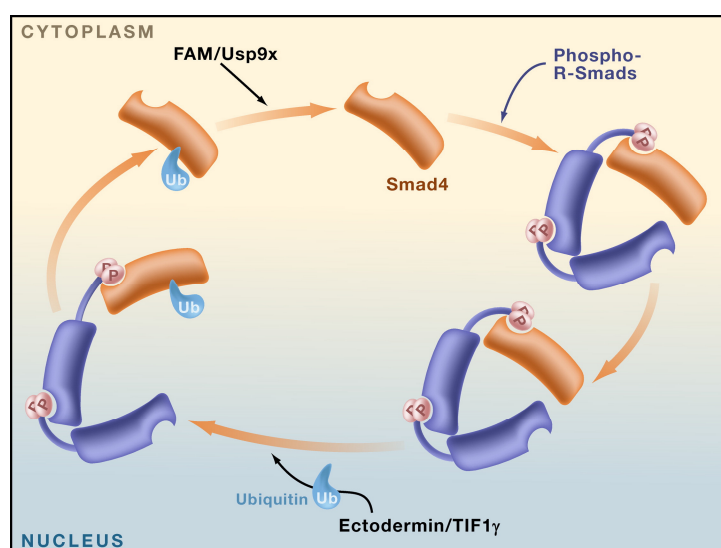


Figure 16. Régulation de la localisation subcellulaire de Smad4. L'activation des récepteurs du TGF- β entraîne la phosphorylation des R-Smad qui se lie à Smad4 en hétérotrimère. Le complexe se transloque dans le noyau où TIF-1 γ ubiquitine Smad4 favorisant son export du noyau. Dans le cytoplasme, Smad4-Ub est désubiquitinylylé par FAM/USP9x libérant ainsi une forme « libre » de Smad4. Cette étape permet le recyclage de Smad4 pour reformer un complexe R-Smad/Smad4 (d'après Dupont *et al.*, 2009 & Wrana, 2009 (200, 210)).

Très récemment, notre équipe a montré que la localisation de Smad4 a un rôle clé dans la sensibilité à la stimulation par le TGF- β (211). Nous avons montré que la protéine de choc thermique α B-crystallin protège Smad4 de l'ubiquitination par TIF-1 γ . Des souris déficientes pour l'expression d' α B-crystallin, où l'ubiquitination de Smad4 n'est donc plus contrôlée, ont une voie du TGF- β altérée et sont protégées de l'induction de fibrose pulmonaire.

Enfin, un dernier point de régulation se fait sur les formes phosphorylées des R-Smad. Dans le noyau, les formes phosphorylées de Smad3 et Smad2 sont ubiquitinylées par Roc1 et Smurf2, respectivement, pour être dirigées vers une voie de dégradation protéasomale (212, 213).

II.5. Le myofibroblaste

II.5.1. Présentation

Le myofibroblaste est la cellule clé du processus de cicatrisation qu'il soit physiologique ou pathologique (214). Deux principaux rôles sont attribués à ces cellules : le remodelage de la matrice extracellulaire et la contraction du tissu durant la régénération. Ils sont caractérisés par l'expression de la protéine α -smooth muscle actin (α -SMA) qui est le marqueur le plus utilisé pour leur mise en évidence (215). Comme évoqué précédemment, la lésion d'un épithélium va entraîner des changements dans le tissu. Avec le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de la lésion, le milieu extracellulaire va contenir de nombreux facteurs impliqués dans les différents mécanismes de la cicatrisation. La matrice extracellulaire change alors en architecture mais aussi en composition impliquant largement les myofibroblastes. Ils sont responsables de la synthèse de protéases de la matrice (ou « matrix metalloproteinases » -MMP-) mais aussi de la production d'une nouvelle matrice riche en collagène (216). Durant le processus de cicatrisation physiologique, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose (29). Dans certains cas de lésions répétées ou lorsque la lésion ne peut pas être réparée complètement, les myofibroblastes continuent de proliférer. Cette persistance des myofibroblastes serait à l'origine du déséquilibre entre destruction de la matrice existante et production d'une matrice cicatricielle intermédiaire entraînant la progression d'un mécanisme physiologique vers un processus chronique et pathologique comme la fibrose. Dans la FPI, les myofibroblastes sont regroupés dans les poumons fibreux en structures particulières appelées « fibroblastic foci » ou foyers fibroblastiques (217) (Figure 17). La présence et le nombre des foyers fibroblastiques

ont été corrélés avec la perte des fonctions respiratoires et une baisse de la survie des patients (218).

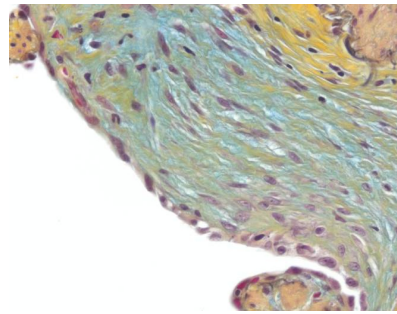
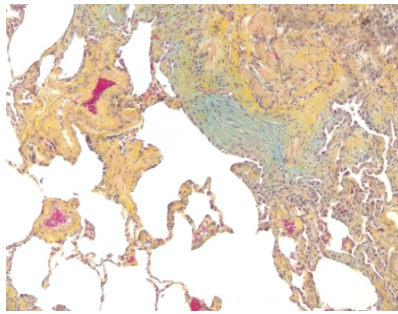


Figure 17. Les foyers fibroblastiques. Observation de coupe de poumon de patients atteint de FPI. Le foyer fibroblastique correspond à un dépôt de collagène immature (bleu-vert) avec autour un dépôt hétérogène de collagène mature (jaune) (d'après Cool *et al.* 2006 (217)).

II.5.2. Origine

Comme abordé plus haut, les rôles et la localisation des myofibroblastes sont bien décrits. Cependant, l'origine de ces cellules clé du processus fibrosant reste discutée (219). Trois hypothèses ont été avancées et la contribution et l'importance de chacune est encore largement débattues dans la FPI. Le point commun de toutes ces hypothèses est le rôle central du TGF- β dans l'activation des cellules et l'acquisition d'un phénotype agressif de myofibroblaste. Chacune de ces hypothèses est centrée sur un type cellulaire différent comme progéniteurs de myofibroblastes : les fibroblastes pulmonaires résidents, les cellules mésenchymateuses issues de la moelle osseuse appelées fibrocytes ou la transformation de cellules structurales pulmonaires comme les cellules pulmonaires de type épithéliale (220, 221) (Figure 18).

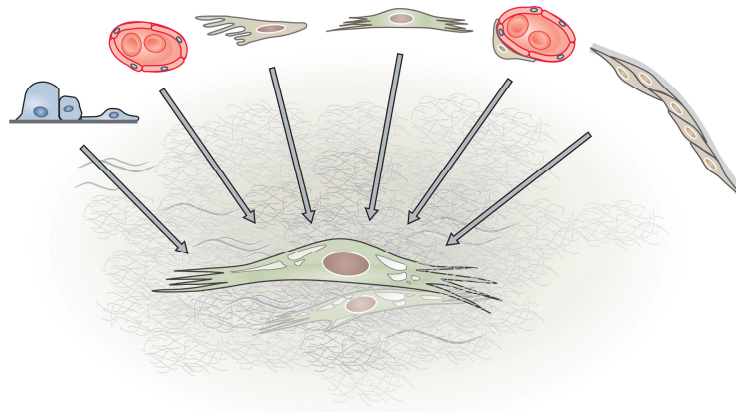


Figure 18. Les compartiments cellulaires impliqués dans la population de myofibroblastes. Différents types cellulaires peuvent contribuer à la population de myofibroblastes dans la FPI via un processus d'EMT. De gauche à droite : les cellules épithéliales alvéolaires, cellules endothéliales, fibrocytes, fibroblastes résidents, péricytes et cellules mésothéliales pleurales (d'après Fernandez & Eickelberg, 2012 (221)).

A. Les fibroblastes pulmonaires résidents

La première hypothèse suggère que les myofibroblastes résultent de l'activation des fibroblastes résidents dans le poumon comme les fibroblastes péri-bronchiques et péri-vasculaires (222). 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 (215, 223). Ainsi, l'acquisition par des fibroblastes résidents d'un phénotype agressif de type myofibroblaste est un facteur majeur dans la production incontrôlée de matrice extracellulaire qui caractérise la fibrose (224).

B. Les fibrocytes

Les fibrocytes ont été décrits en 1994 comme une nouvelle population de cellules originaires de la moelle osseuse et caractérisées par l'expression de marqueurs à la fois hématopoïétiques pluripotents (CD45⁺/ CD34⁺) et mésenchymateux (collagène⁺/vimentine⁺) (225-227). Ces cellules sont retrouvées dans les phénomènes de réparation tissulaire et donc dans les pathologies fibrosantes comme la fibrose hépatique, la sclérodermie, l'asthme ou la FPI (220, 228, 229). Les fibrocytes expriment à leur surface le récepteur aux chemokines CXCR4. Les cytokines responsables du recrutement de ces cellules vers le poumons sont encore mal connues. Les cytokines CCL12 et CXCL12 semblent indispensables au recrutement de ces cellules vers le poumons dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine (230, 231). L'induction d'une fibrose pulmonaire dans un modèle murin où les cellules hématopoïétiques exprimaient la protéine fluorescente GFP montre que des cellules GFP positives sont retrouvées dans les poumons des souris fibreuses (232). Dans les poumons de patients atteints de FPI, les fibrocytes ont été identifiés dans les zones de lésion tissulaire où le tissu cicatriciel se forme (227). L'implication de ces cellules dans le pool de myofibroblastes dans les processus fibrosant comme la FPI a été démontré (233, 234). La détection des fibrocytes circulants a été avancée comme biomarqueur dans la FPI. En effet, une augmentation du pourcentage de fibrocytes circulant semble corrélée avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de FPI (235).

C. Les cellules alvéolaires épithéliales

L'épithélium alvéolaire assure sa fonction grâce principalement à deux types de cellules épithéliales alvéolaires, les cellules de type I ou « type I Alveolar epithelial cells » (AEC I) et

les cellules de type II ou « type II Alveolar epithelial cells » (AEC II). Les AEC II représentent 5% des cellules pulmonaires et prolifèrent lors du phénomène de régénération de l'épithélium alvéolaire. Une sous-population existerait au sein des AEC de type 2 (236). Ces cellules seraient des cellules progénitrices exprimant moins d'E-cadhérine et avec une activité télomérase élevée par rapport aux autres AEC II. Malgré le caractère différencié de ces cellules, les AEC II peuvent se différencier pour former des cellules proches du phénotype AEC I mais peuvent aussi acquérir un phénotype plus agressif et présenter des marqueurs mésenchymateux caractéristiques du fibroblaste activé (25, 237).

Cette activation est fortement liée au processus induit par le TGF- β appelé transition épithélio-mésenchymateuse ou « epithelial-mesenchymal transition » (EMT). C'est un processus par lequel une cellule épithéliale polaire, interagissant avec une membrane basale va subir des changements biochimiques pour acquérir des capacités de migration et d'invasion, devient résistante à l'apoptose et produit de grande quantité de composants de la matrice extracellulaire (238) (Figure 19). Ce processus a des implications dans différents phénomènes physiologiques ou pathologiques allant du développement au cancer (239). Kalluri et Weinberg ont proposé une classification du processus d'EMT en 3 sous-types : le type 1 correspond aux processus d'EMT impliqué dans l'embryogenèse et le développement des organes, le type 2 est associé à la régénération tissulaire et à la fibrose et le type 3 correspond au phénomène impliquant la formation de métastases dans le cancer. Les voies du développement, et particulièrement le TGF- β , sont largement impliqués dans ce processus d'EMT illustré figure 19. Premièrement la diminution de l'expression des protéines impliquées dans les jonctions cellules-cellules (E-cadherine, zonula occuldens-1) entraîne la perte du caractère polaire et l'individualisation des cellules (240). Par la suite, une surexpression des protéases de la matrice MMP-2 et MMP-9 va dégrader le collagène constituant la membrane basale. Un remodelage du cytosquelette d'actine et l'expression de l' α -SMA permettent la migration des cellules à travers la membrane basale (241). Les cellules ont alors un phénotype mésenchymateux avec l'expression de collagène, vimentine, fibronectine, N-cadherine et OB-cadherine (240-242). Le TGF- β joue un rôle central dans l'initiation du processus de transformation en régulant l'expression de facteurs de transcription clé de l'EMT comme Slug et Snail. La surexpression de Snail induit une diminution de l'expression de l'E-cadhérine conduisant à la rupture des jonctions serrées entre les cellules épithéliales.

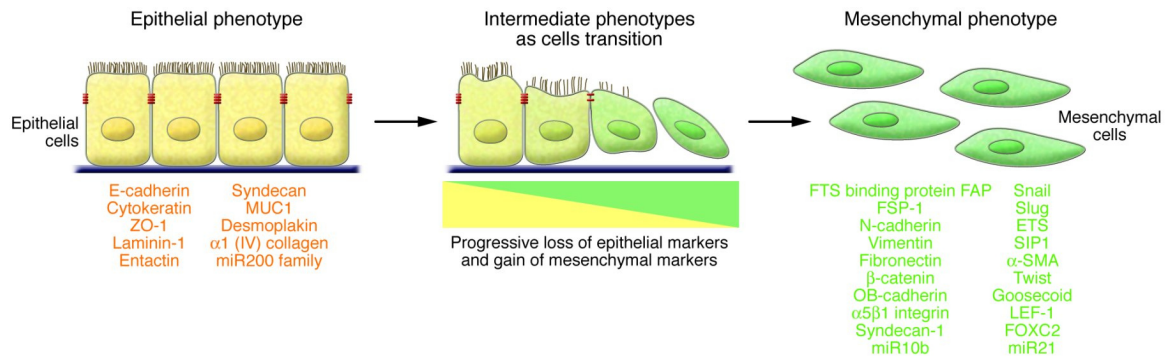


Figure 19. Les marqueurs de l'EMT. L'EMT implique une transformation fonctionnelle d'une cellule de type épithéliale polaire vers une cellule de phénotype mésenchymateux avec des capacités migratoires et sécrétrices de composants de la matrice extracellulaire (d'après Kalluri & Weinberg, 2009 (239)).

L'EMT des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires a été mis en évidence dans la FPI et dans des modèles de fibrose pulmonaire chez le rongeur (243). Snail est surexprimé dans les AEC II hyperplasiques dans la FPI et *in vitro* en présence de TGF- β 1 (244). La colocalisation de la protéine C du surfactant (marqueur des AEC II) et de la N-cadherine (marqueur mésenchymateux) a été montré sur des coupes de poumons de patients atteints de FPI (245) (Figure 20). Dans cette étude, les auteurs ont marqué spécifiquement les AEC II en utilisant des souris transgéniques où les cellules exprimaient la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur de la protéine C du surfactant spécifique des AEC II. L'induction de fibrose pulmonaire dans ce modèle murin a montré que des cellules exprimant la β -galactosidase étaient aussi positives pour les marqueurs mésenchymateux fibronectine et α -SMA.

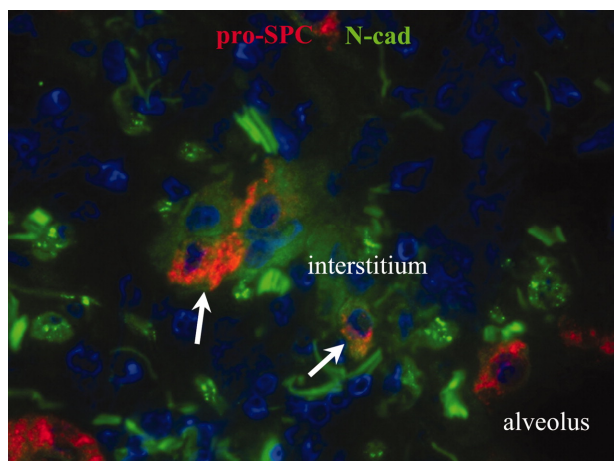


Figure 20. Evidance du phénomène d'EMT des cellules épithéliales alvéolaires dans la FPI. Double marquage pro-SPC (rouge, marqueur des AEC II) et N-cadhérine (vert, marqueur mésenchymateux) sur coupe de poumon de patients atteint de FPI. Les flèches indiquent les cellules doublement marquées (d'après Kim *et al.*, 2006 (245)).

Cependant, la contribution des cellules épithéliales dans le pool de myofibroblastes est controversé dans la FPI (246). En effet, une équipe américaine a montré dans un modèle de fibrose pulmonaire chez la souris que les AEC II ne participent pas à la génération de myofibroblastes (247). A l'aide de souris transgéniques dont les AEC II exprimaient une

protéine fluorescente rouge, les auteurs ont montré que ces cellules se transformeraient en un type cellulaire proche des AEC I sans évidence d'une transformation vers un phénotype de myofibroblaste.

Outre les cellules épithéliales, d'autres cellules structurales du poumon semblent aussi pouvoir se transformer et acquérir un phénotype myofibroblastique durant les pathologies fibrosantes. Les cellules endothéliales peuvent s'activer en cellules agressives productrices de collagène via un phénomène d'EMT (248). Ce phénomène d'« endothelial-mesenchymal transition » a été mis en évidence dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (249). Les cellules mésothéliales pleurales ont aussi la capacité, sous l'influence de divers stimuli dont le TGF- β 1, d'acquérir un phénotype de myofibroblastes. Ceci sera détaillé dans le chapitre suivant.

III. La plèvre

III.1. Présentation

La plèvre est une membrane entourant les poumons et intimement connectée au parenchyme pulmonaire même si ils ont des origines embryonnaires différentes. Durant l'embryogenèse, les poumons se développent dans la cavité cœlomique d'origine mésodermique. La plèvre est la portion de la cavité cœlomique qui juxtapose les poumons en formation. Structurellement, la plèvre est constituée d'un tissu fibreux et de deux couches de cellules mésothéliales formant un mésothélium richement vascularisé (250). On distingue la plèvre pariétale accolée à la cage thoracique et la plèvre viscérale adhérente au parenchyme pulmonaire (Figure 21).

Chez l'homme, et contrairement aux rongeurs, la plèvre englobant le poumon droit ne communique pas avec la plèvre gauche. Les deux feuillets viscéral et pariétal sont séparés par un espace pleural contenant un volume minimal de liquide riche en glycoprotéines et favorisant le « glissement » des deux feuillets de la plèvre d'un contre l'autre durant la respiration (251). Ce liquide pleural est finement régulé entre production et absorption. On estime de 6 à 12 ml le volume de liquide pleural chez une personne de 60 kg avec un renouvellement d'environ 14 ml sur 24 h (250). En conditions normales, le liquide pleural contient de rares cellules incluant des macrophages, lymphocytes et cellules mésothéliales. La plèvre est richement vascularisée et possède un réseau lymphatique développé. Ce dernier est lié à des pores (stomata) dans la plèvre

pariétale capables de transférer des particules ou des cellules directement dans le réseau lymphatique (251).

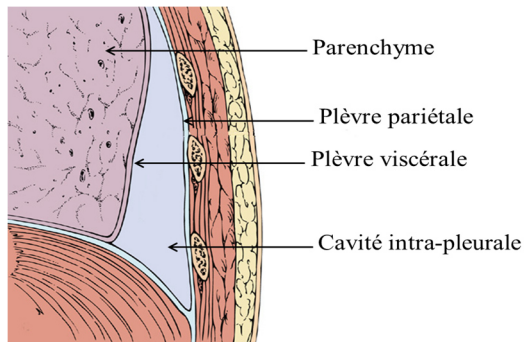


Figure 21. Représentation schématique de la plèvre. Coupe longitudinale de la cage thoracique laissant apparaître les deux feuillets pleuraux qui sont normalement accolés. La cavité intra-pleurale est donc une cavité virtuelle ne contenant que quelques millilitres de liquide facilitant le glissement des deux feuillets lors de la respiration.

Chez le rongeur, la plèvre est composée d'une monocouche cellulaire de cellules mésothéliales reposant sur une lame basale. Chez l'homme, elle est organisée en une structure plus complexe. Même si leur distinction est difficile en microscopie optique classique, cinq couches composent la plèvre chez l'homme (Figure 22) (251);

- le mésothélium composé de cellules mésothéliales liées entre elles par des jonctions serrées,
- une fine couche de tissu conjonctif,
- une couche de tissu élastique superficiel,
- une deuxième couche de tissu conjonctif sous-pleural riche en vaisseaux sanguins, lymphatiques et en nerfs,
- et une couche de tissu fibro-élastique adhérant au parenchyme pulmonaire (pour la plèvre viscérale) ou à la cage thoracique (pour la plèvre pariétale).

La plèvre est intimement liée au parenchyme pulmonaire. Au contraire des poumons, la plèvre n'est pas en contact avec l'environnement extérieur et a donc une fonction de barrière physique et plus important une fonction de défense immunitaire (252). La plèvre participe à différents processus comme l'immunité innée avec la sécrétion de cytokines inflammatoires, mais est aussi une source de composants de matrice extracellulaire ou de facteurs de croissance (253).

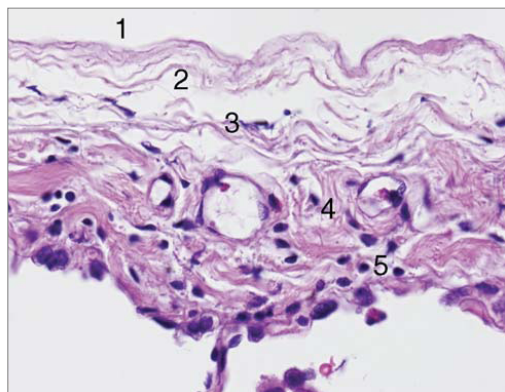


Figure 22. Structure de la plèvre viscérale chez l'homme. 1) mésothélium composé de cellules mésothéliales ; 2) tissu conjonctif sous-mésothélial ; 3) couche de tissu élastique superficiel ; 4) couche de tissu conjonctif sous-pleural riche en vaisseaux sanguins, lymphatiques et en nerfs (les structures dilatées sur l'image correspondent à des vaisseaux sanguins) ; 5) couche de tissu fibro-élastique adhérant au parenchyme pulmonaire (d'après English *et al.*, 2006 (251)).

III.2. La cellule mésothéliale

Les cellules mésothéliales forment des monocouches appelés mésothéliums, composés de cellules spécialisées liées par des jonctions serrées, qui entourent les cavités séreuses et les organes internes comme les poumons. Dans des conditions normales, les cellules mésothéliales ont un taux de prolifération bas avec moins de 0,5 % des cellules en mitose au même moment (254). Cependant, leur stimulation peut faire largement augmenté leur activité mitotique allant jusqu'à 80% des cellules en prolifération. Les cellules mésothéliales expriment de nombreuses protéines impliquées dans les jonctions cellules-cellules comme les cadhérines (de type P, E et majoritairement N) et aussi la protéine ZO-1 (255). L'expression de la N- cadhérine et ZO-1 montrent la complexité du phénotype des cellules mésothéliales à la fois épithélial et mésenchymateux. Différents marqueurs sont utilisés pour leur identification avec plus ou moins de spécificité. Parmi ces marqueurs, on retrouve la calretinine (256, 257), la mésothéline (258), la protéine WT-1 (259, 260) ou la cytokeratine (261).

La fonction primaire attribuée des cellules mésothéliales est de former une barrière physique protectrice limitant l'invasion de pathogènes infectieux dans l'organisme. Dans des conditions d'infection de la plèvre, les cellules mésothéliales initient une réponse pro-inflammatoire en recrutant et activant des cellules immunitaires. L'autre fonction attribuée aux cellules mésothéliales est la production du liquide pleural permettant le mouvement sans friction des deux plèvres (253). Néanmoins, les cellules mésothéliales ont de nombreuses autres fonctions allant des processus d'inflammation ou d'immunité innée ou adaptative, aux phénomènes de régénération tissulaire, de coagulation ou de fibrinolyse (253) (Figure 23) :

- 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 la protéine « intercellular adhesion molecule-1 » (ICAM-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 « 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 mal compris. 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. 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 (253).

- 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 (253).

- 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 de l'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 (253).

Les cellules mésothéliales ont également un rôle dans l'initiation et la résolution de l'inflammation et de la réparation tissulaire. Elles peuvent en effet sécréter après une agression, des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des espèces radicalaires de l'oxygène, des prostaglandines, des prostacyclines ainsi que des composants de la matrice extracellulaire (262). 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-inflammatoires 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 (253).

L'activation de l'axe caspase-1/IL-1 β dans les cellules mésothéliales a déjà été mise en évidence. L'amiante induit *in vitro* la formation de l'inflammasome NLPR3 et l'activation de la caspase-1 dans des cellules mésothéliales pleurales humaines (263).

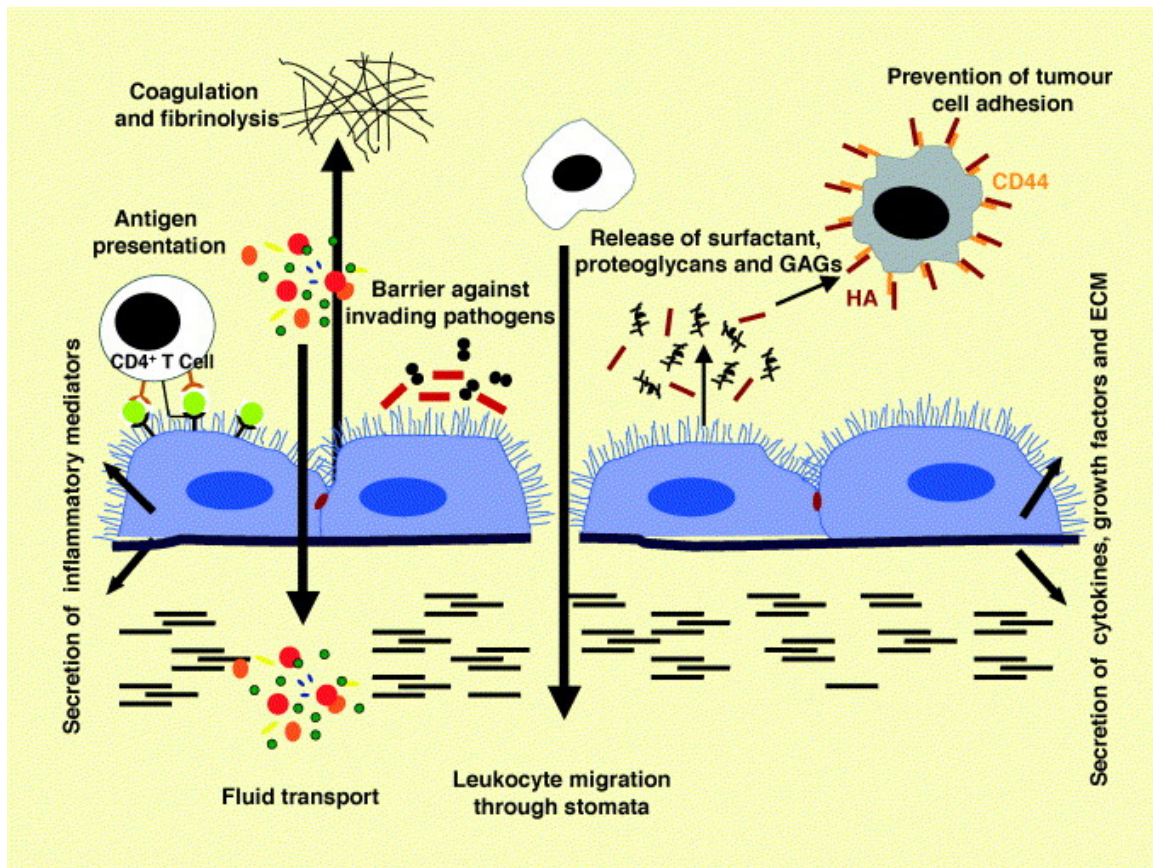


Figure 23. Les différentes fonctions des cellules mésothéliales. Les cellules mésothéliales sont impliquées dans de nombreux processus incluant le transport de fluide, particules ou cellules à travers la cavité pleurale, la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires, la présentation d'antigènes, la sécrétion de facteurs stimulant le dépôt et l'élimination de fibrine, la synthèse de facteurs de croissance et de protéines de la matrice extracellulaire ou encore la protection contre les micro-organismes (d'après Mutsaers *et al.*, 2004 (253)).

III.3. L'importance de la plèvre dans la FPI

Une des caractéristiques de certaines maladies fibrosantes intersitielles, telles que la FPI ou la fibrose induite par la bléomycine, est l'origine sous-pleurale des lésions. En effet, la FPI débute classiquement dans les régions sous-pleurales et le tissu fibreux se propage par la suite vers l'intérieur du parenchyme pulmonaire (Figure 24) (264). Cette origine sous-pleurale suggère que la plèvre et les cellules mésothéliales ont un rôle dans la fibrogenèse et plus précisément dans son initiation. Cependant, ce rôle dans la genèse du processus fibrosant reste mal compris et peu documenté. 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. Cependant, malgré ces constatations, peu d'auteurs relèvent cette

observation pour s'interroger sur le rôle de la plèvre elle-même. La plèvre chez les patients atteints de FPI est très pathologique et remaniée avec une fibrose et une néo-vascularisation importante.

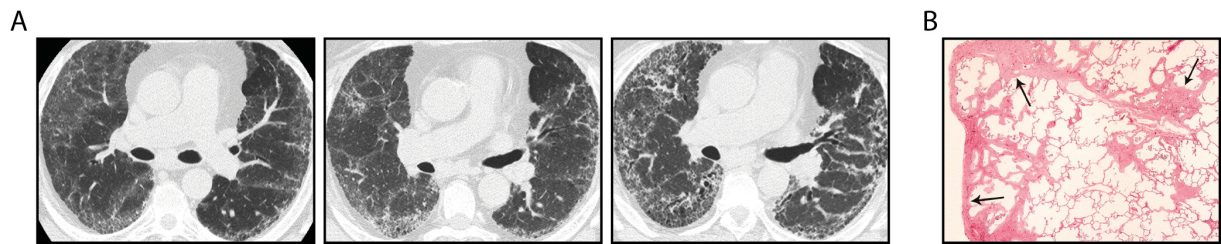


Figure 24. La FPI débute classiquement depuis les régions sous-pleurales. A) Tomodensitométrie d'un patient de 57 ans atteint de FPI au moment du diagnostic (gauche) et deux ans (milieu) ou trois ans (droite) plus tard. Les lésions fibrotiques apparaissent dans les régions sous-pleurales et se développent et progressent vers l'intérieur du poumon avec le temps. **B)** Coupe histologique de poumon d'un patient souffrant de FPI avec zones fibreuses dans les régions sous-pleurales (d'après Souza *et al.*, 2005 (264)).

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 (265), les infections à germe banal ou les pleurésies tuberculeuses (266), les réactions pleurales induites par les médicaments (ergots de seigle (267), cyclophosphamide (268)), les hémothorax (épanchement de sang dans l'espace pleural), la polyarthrite rhumatoïde (269), 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 matrice extracellulaire qui détruisent la structure de la plèvre perturbant les fonctions du mésothélium et de l'espace pleural. La plus forte expression du 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 (270). 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 MMP (MMP-1 et MMP-9), ainsi que des TIMP démontrant leur rôle actif dans le développement de la fibrose pleurale (271, 272). 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 (273). En outre, il a été démontré que l'administration intrapleurale de TGF- β était capable d'induire une fibrose pleurale dans divers modèles animaux (274, 275).

En 2007, notre équipe a publié les premières évidences montrant chez le rongeur que des cellules pleurales peuvent dans un environnement pro-fibrotique riche en TGF- β 1 se transformer et migrer vers les régions sous-pleurales à l'intérieur du parenchyme pulmonaire (Figure 25) (261). Ce phénomène a été confirmé chez la souris dans un autre modèle de fibrose pleuro-pulmonaire induite par co-administration de bléomycine et de nanoparticules de carbone développé dans notre équipe (276). Nos travaux ont été de plus confortés par l'équipe du Dr Veena Antony qui a montré dans des biopsies de poumons de patients atteints de FPI, que des cellules exprimant la calrétinine (marqueur de cellules mésothéliales) pouvaient être retrouvées dans les zones fibreuses à l'intérieur du poumon (257). Le nombre de cellules pleurales présentes dans les poumons était corrélé avec la sévérité de la maladie. Par la suite, les auteurs ont injecté des cellules mésothéliales transformées exprimant la GFP dans la cavité pleurale de souris développant ou non une fibrose pulmonaire. Des cellules exprimant la GFP ont été mises en évidences dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires de souris fibrotiques mais pas chez les souris contrôles. Plusieurs études de notre équipe et d'autres ont montré que les cellules mésothéliales peuvent subir une transformation vers un phénotype de type myofibroblastique *in vitro* (277), chez le rongeur (261, 276) ou dans la FPI chez l'homme (257, 278).

L'ensemble de ces études, combiné à l'initiation sous-pleurale observée dans la FPI, suggèrent que la plèvre et les cellules mésothéliales jouent un rôle dans cette pathologie, au moins dans les phases d'initiation. Le rôle des cellules mésothéliales dans ce processus semble dû à leur facilité à subir une transformation et à participer ainsi à la population de myofibroblastes. L'ensemble des myofibroblastes présents dans la FPI n'est à l'évidence pas issu de cellules mésothéliales car de nombreuses études ont déjà montré que les myofibroblastes

peuvent avoir différentes origines (cf. II.5.2). La contribution des cellules mésothéliales dans le processus fibrosant reste peu comprise et pourrait ne pas se limiter à la formation d'un pool de cellules agressives dans la pathologie. Ces cellules pourraient contribuer à l'établissement d'un environnement pro-fibrotique au sein du parenchyme pulmonaire.

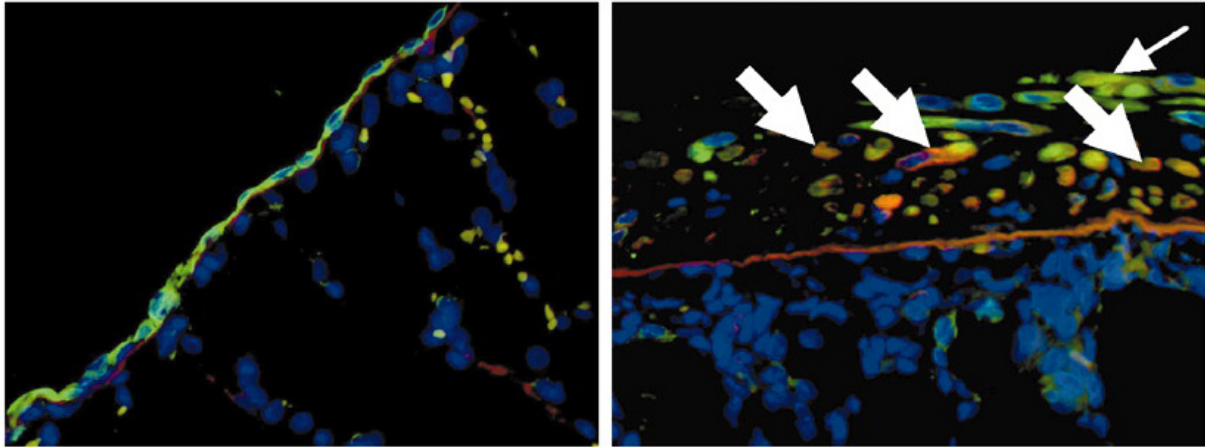


Figure 25. Les cellules mésothéliales peuvent subir une EMT *in vivo*. Immuno-marquages sur coupes histologiques de poumon de rat 14 jours après injection intra-pleurale avec un adénovirus vide (gauche) ou un adénovirus codant pour le TGF- β 1 (droite). Les cellules mésothéliales marquées avec de la cytokératine 18 (en vert) forment un feuillet homogène chez les animaux contrôles (gauche). L' α -SMA (en rouge) est très peu exprimée en condition non pathologique (gauche) mais présente au niveau de la plèvre lors du développement de la fibrose pleurale induite par le TGF- β 1 (droite). Des cellules doublement positives (flèches blanches) sont visibles au sein de la plèvre épaissie montrant que les cellules mésothéliales subissent une EMT (d'après Décologne et al., 2007 (261)).

IV. La bléomycine

La bléomycine a été isolée en 1966 par Umezawa et collaborateurs à partir de *Streptomyces verticillus* et fait référence à une famille de glycopeptides partageant le même corps de structure (279). On distingue quatre grandes parties dans la structure de la bléomycine : une partie de liaison à l'ADN, une partie de liaison à des métaux, un disaccharide et une chaîne variable portant un groupement amine (280). Plusieurs formes de bléomycine ont été décrites suivant les groupements amines qui les composent. Les formes A2 et B2 représentent les formes prédominantes de la bléomycine isolée par Umezawa *et al.*. Le groupement amine porté par la molécule de bléomycine semble être responsable de la toxicité de la molécule (281). En clinique, la bléomycine utilisée est un mélange des deux formes A2 et B2 dans des proportions définies : 55-70% A2 et 25-32% de B2.

La bléomycine est administrée chez l'homme par voie intraveineuse. Des études ont montré que la demi-vie de la bléomycine dans le sang est d'environ 2h chez l'homme. Le mode

de circulation de la bléomycine n'est pas clair. La molécule est certainement liée à un ion Cu^{2+} mais son état, libre ou lié à une protéine plasmatique, reste inconnu (280). La bléomycine est principalement éliminée par excrétion rénale. Après injection intraveineuse de bléomycine radiomarquée, la molécule est retrouvée dans les poumons deux semaines après l'injection et à des concentrations plus faibles dans le foie ou les reins (282). *In vivo*, la bléomycine est inactivée par une enzyme aminopeptidase nommée bléomycine hydrolase (283, 284). De façon intéressante, cette enzyme est exprimée à de faible proportion dans le poumon et dans la peau (285). Dans le poumon, la bléomycine hydrolase est particulièrement peu exprimée dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II (285). Son niveau d'expression dans les cellules composant la plèvre n'est pas connu.

IV.1. Mécanisme d'action

La bléomycine est une molécule hydrophile de 1.5 kDa. Le mécanisme de transport depuis le milieu extracellulaire vers l'intérieur des cellules est mal compris. Des études semblent démontrer l'existence d'un récepteur membranaire qui se lierait à la bléomycine (Figure 26) (286, 287). Un mutant de la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec une résistance à la bléomycine a été décrit (288). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence des mutations de protéines de transport et de détoxification de la bléomycine chez la levure (289, 290). Les auteurs suggèrent que l'altération de ce système de transport serait responsable de la résistance à la bléomycine observée chez ce mutant.

Dans la cellule, l'action de la bléomycine passe d'abord par une étape d'oxydo-réduction afin d'activer la molécule. La bléomycine interagit dans la cellule avec un métal Fe^{2+} et une molécule d'oxygène pour former un complexe ternaire instable. L'ion métallique est alors la cible d'une réaction de réduction donnant une molécule bléomycine-Fe(III)-OOH active (Figure 26) (291). Cette forme active de la bléomycine est responsable de l'action sur les molécules d'acides nucléiques. Les clivages simple- ou double-brin commencent par la suppression d'un atome d'hydrogène de l'atome de carbone C4' d'un désoxyribose formant un intermédiaire radicalaire (280). Le modèle proposé par Chen et Stubbe suggère que le résidu avec lequel la molécule de bléomycine interagit est un résidu consensus lié à une base pyrimidine et en position 3' d'une guanidine. Par la suite, l'intermédiaire radicalaire peut être oxydé induisant la perte de la base pyrimidique. En présence d'oxygène, l'intermédiaire radicalaire interagit avec une molécule d'oxygène formant un site radicalaire peroxydé. La

réduction de ce site entraîne la perte de la base pyrimidique liée à une séquence carbonique rompant ainsi le cycle du désoxyribose provoquant la cassure de la molécule d'acide nucléique.

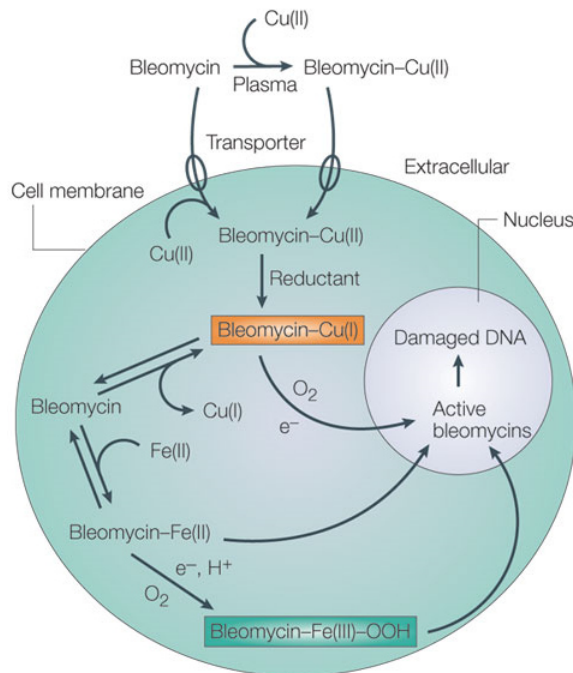


Figure 26. Mécanisme d'activation de la bléomycine. Dans la circulation, la bléomycine serait majoritairement liée à des ions Cu^{2+} . Son entrée dans la cellule est permise par un système de transporteur et le complexe bléomycine- Cu^{2+} est réduit libérant la molécule de bléomycine. La bléomycine libre se complexifie avec un ion Fe^{2+} et une molécule d'oxygène et forme une molécule de bléomycine active (bléomycine- Fe(III)-OOH). Cette espèce migre vers le noyau et la mitochondrie (non illustrée ici) pour induire des cassures dans les molécules d'ADN, responsables de la cytotoxicité (d'après Chen & Stubbe, 2005 (280)).

Au-delà de son action sur le noyau, la bléomycine semble pouvoir agir à d'autres niveaux avec l'oxydation de lipides (292), l'hydrolyse de liaisons peptidiques (293) ou encore la dégradation des ARNs (294). Cependant, la toxicité de la bléomycine passe majoritairement par l'induction de cassures simple- ou double-brin dans les molécules d'ADN. Les gènes fortement exprimés sont plus affectés par la toxicité de la bléomycine que les gènes peu exprimés. En effet, les séquences de chromatine activement transcrites sont les plus sensibles à la bléomycine (295). La bléomycine semble agir également sur les molécules d'ADN mitochondriale. De façon intéressante, une étude a démontré que des cellules A549 déplétées en ADN mitochondrial sont résistantes à la bléomycine (296).

L'action de la bléomycine sur la cellule a pour conséquence terminale d'induire la mort cellulaire. Cependant, en fonction de la dose de bléomycine utilisée et de la phase du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule, les mécanismes de mort cellulaire impliqués peuvent varier (297). Les cellules mises en présence de faibles doses de bléomycine accumulent des cassures double-brin dans le génome et se concentrent en phase G2/M avant de mourir par mort mitotique, un processus de mort déclenché par des anomalies génétiques lors de la mitose. A forte dose, la bléomycine agit comme une nucléase dans le noyau et la mitochondrie causant un dommage massif de l'ADN, avec majoritairement des cassures simple-brin, et la mort des cellules par apoptose.

IV.2. Utilisation en cancérologie

La bléomycine est un agent de chimiothérapie utilisé dans le traitement de plusieurs maladies néoplasiques comme les lymphomes (298), le cancer du testicule (299) ou certains cancers de la sphère oto-rhino-laryngée (3). Dans le cas du cancer du testicule, en combinaison avec du cisplatine et de l'étoposide, la bléomycine est efficace dans 90% des cas (299). La bléomycine est un agent chimiothérapeutique intéressant car il induit une faible myélosuppression et une faible immunosuppression (300). Cependant, le traitement à la bléomycine peut induire comme effet indésirable une toxicité principalement sur le poumon qui est un frein majeur à l'utilisation de ce médicament très efficace et encore indispensable à l'heure actuelle (301, 302). Dans le cas du lymphome de Hodgkin, la toxicité pulmonaire due à la bléomycine est responsable d'une diminution de la survie à 5 ans de 90% à 63% (303). Jusqu'à 20% des patients traités par bléomycine peuvent développer cette toxicité (4) qui peut se présenter sous différentes formes de pathologies interstitielles pulmonaires, allant du simple infiltrat radiologique avec une altération modérée de la fonction respiratoire (5), jusqu'à un tableau d'ALI (ou « acute lung injury ») ou de fibrose pulmonaire (www.pneumotox.com) dont le pronostic est catastrophique (304). De nombreux facteurs de risque sont associés au développement de cette toxicité pulmonaire (305) : un âge supérieur à 70 ans, le tabagisme, une insuffisance rénale, une irradiation pulmonaire (306), une dose cumulative de bléomycine supérieure à 450 mg (4), le mode d'administration de la bléomycine (307), une exposition à l'oxygène ou l'administration de « granulocyte colony-stimulating factor » (G-CSF) (308).

En clinique, dès l'apparition d'une toxicité, l'apport de bléomycine est arrêté et les patients reçoivent des corticostéroïdes (303). Aucune médication efficace n'est connue pour empêcher l'apparition de cette toxicité pulmonaire et les stratégies anti-fibrotiques récemment approuvées pour ralentir la progression de la FPI semblent inefficaces (309). La compréhension des mécanismes intervenant dans la toxicité pulmonaire de la bléomycine est donc un enjeu majeur en cancérologie.

La toxicité pulmonaire de la bléomycine présente des similitudes avec la FPI. Notamment, on retrouve un début sous-pleural des lésions fibrotiques (6). De ce fait, la bléomycine est aussi largement utilisée pour étudier les mécanismes impliqués dans le processus de fibrose pulmonaire.

V. Les modèles animaux de fibrose pulmonaire

De nombreux modèles ont été développés dans le but de modéliser la fibrose pulmonaire. Les plus couramment utilisés dans la littérature sont basés sur l'exposition à la bléomycine, la silice, l'isothiocyanate de fluoréscéine (FITC), l'irradiation, l'expression de gènes spécifiques médiée par des vecteurs viraux, l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés ou encore le transfert adoptif de cellules fibroblastiques dans des souris immunodéficientes (310). Chaque modèle a contribué à l'évolution de la compréhension de la maladie et à la mise en évidence de mécanismes impliqués dans la fibrose pulmonaire, et ils présentent tous des avantages et des inconvénients (Figure 27) (310).

Modèles	Avantages	Limites
Bléomycine	<ul style="list-style-type: none"> - très bien caractérisé - multitude de voie d'administration - pertinent cliniquement - développement rapide (14-28 jours) 	<ul style="list-style-type: none"> - régression de la fibrose après 28 jours - influence génétique
FITC	<ul style="list-style-type: none"> - visualisation rapide des zones lésées par fluorescence - développement rapide (14-28 jours) - persistance des lésions jusqu'à 6 mois - pas d'influence génétique 	<ul style="list-style-type: none"> - réponse variable selon les lots de FITC - non pertinent cliniquement
Irradiation	<ul style="list-style-type: none"> - pertinent cliniquement 	<ul style="list-style-type: none"> - développement lent (supérieur à 30 semaines) - onéreux - susceptibilité des souches murines à l'irradiation
Silice	<ul style="list-style-type: none"> - pertinent histologiquement - développement de nodules fibreux - persistance des lésions 	<ul style="list-style-type: none"> - développement lent (12-16 semaines) - influence génétique
Animaux transgéniques	<ul style="list-style-type: none"> - possibilité d'étudier la surexpression d'une molécule spécifique - possibilité de contrôle spatial et temporel de la surexpression 	<ul style="list-style-type: none"> - développement de phénomène de compensation - surexpression non physiologique
Vecteurs viraux	<ul style="list-style-type: none"> - possibilité de délivrer des médiateurs pro- ou anti-fibrotiques - possibilité d'infecter un(des) type(s) cellulaire(s) précis 	<ul style="list-style-type: none"> - infection répétée impossible - les adénovirus n'infectent que les cellules épithéliales
Transfert adoptif de fibroblastes	<ul style="list-style-type: none"> - possibilité d'étudier des fibroblastes dérivés de patients atteints de FPI 	<ul style="list-style-type: none"> - utilisation de souris immunodéficientes pour le transfert adoptif de cellules humaines

Figure 27. Avantages et limites des principaux modèles de fibrose pulmonaire chez le rongeur. D'après Moore & Hogaboam, 2008 (310).

La suite de ce chapitre sera centrée sur les modèles animaux de fibrose pulmonaire utilisés lors de ces travaux de thèse (bléomycine, transfert de gènes par adénovirus) avant une introduction des modèles de fibrose pleuro-pulmonaire développés par l'équipe.

V.1. Le modèle classique de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation en clinique de la bléomycine a montré sa toxicité au niveau des poumons pouvant entraîner des mécanismes menant à la fibrose pulmonaire (302). Ainsi, la bléomycine a rapidement été utilisée pour induire et étudier la fibrose pulmonaire expérimentale chez l'animal dès 1971. Ce modèle est le plus utilisé dans la communauté scientifique principalement chez le rongeur (311). Dans la littérature, plusieurs voies d'administration ont été utilisées : systémiques (intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale) ou plus locales vis-à-vis du poumon (intranasale, intratrachéale). La multitude de voies d'administrations utilisées dans la littérature mène à de véritables modèles différents de fibroses pulmonaires induites par la bléomycine, chacun de ces modèles ayant des caractéristiques propres.

L'injection intratrachéale unique est la voie la plus utilisée pour affecter directement l'épithélium alvéolaire. Ce modèle « classique » d'induction de fibrose pulmonaire est très bien caractérisé (Figure 28) (311). L'injection de bléomycine induit des lésions pulmonaires notamment dans l'épithélium alvéolaire et une première phase d'inflammation sévère apparaît avec une forte expression de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6). L'inflammation est suivie d'une augmentation de l'expression de facteurs pro-fibrosants comme le TGF- β 1 avec un pic 14 jours après l'injection initiale. Ce changement entre inflammation et phase fibrotique semble intervenir autour de J10. La troisième semaine se distingue par un dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine) caractérisant la fibrose pulmonaire (Figure 29) (310).

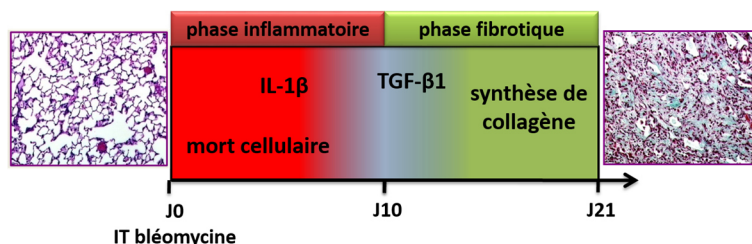


Figure 28. Cinétique du développement de la fibrose après injection intratrachéale de bléomycine. L'injection intratrachéale (IT) de bléomycine à J0 entraîne un phénomène de mort cellulaire et l'établissement d'une phase d'inflammation durant les 8 premiers jours du modèle. Par la suite, l'environnement change vers un profil fibrotique avec expression de TGF- β 1 et une phase d'accumulation de matrice extracellulaire caractérisant la fibrose (adapté de Moeller *et al.*, 2008 (311)).

Ce modèle a mis en évidence de nombreux mécanismes impliqués dans la FPI. Même si il a de nombreux avantages comme une relative simplicité de mise en place ou une assez bonne reproductibilité, ce modèle possède cependant des inconvénients et ne récapitule pas certaines caractéristiques de la FPI (311). Le caractère progressif et irréversible de la FPI n'est pas reproduit dans ce modèle (312). En effet, les lésions fibrotiques régresseraient spontanément 28 jours après l'exposition à la bléomycine. De plus, la réponse à la bléomycine semble être dépendante du fond génétique des animaux utilisés. Par exemple, les souris C57Bl/6 sont très sensibles à la bléomycine et développent une fibrose pulmonaire sévère alors que la souche Balb/c développe une fibrose limitée après exposition à la bléomycine. Ces différences peuvent être expliquée par des variations du taux de bléomycine hydrolase entre les souches (311). Un autre inconvénient est que ce modèle ne présente pas certaines des caractéristiques histologiques clés de la FPI. La présence de foyers fibroblastiques n'est pas retrouvée et l'accumulation de collagène se développe dans l'ensemble du poumon. De la même manière, l'origine sous-pleurale des atteintes n'est pas observée. En effet, l'injection intratrachéale de bléomycine entraîne une fibrose irrégulière à dominance péribronchique même si une plus forte densité de fibrose semble cependant décrite au niveau des régions sous-pleurales.

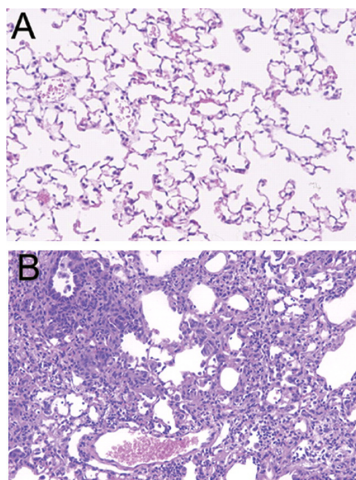


Figure 29. Histologie de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Sections de poumons de souris C57BL/6 marquées à l'hématoxyline et l'éosine. **A)** Poumon de souris n'ayant reçu aucun traitement. **B)** Poumon de souris 14 jours après administration de bléomycine par injection intratrachéale. On observe un épaissement interstitiel, une forte inflammation et une réduction des alvéoles pulmonaires (d'après Moore & Hogaboam, 2008 (310)).

Ce modèle « classique » basé sur l'injection intratrachéale de bléomycine a depuis subi des adaptations. En 2010, Degryse et collaborateurs ont proposé un modèle d'injections intratrachéales répétées de bléomycine comme un modèle plus proche histologiquement de la FPI avec la formation de structures ressemblant à des foyers fibroblastiques (313). La voie d'administration est aussi un facteur déterminant. Une étude publiée en 1987 par Harrison & Lazo a montré que des injections sous-cutanées et intraveineuses conduisent à la formation de zones de fibrose hétérogène sous forme d'agrégats éparpillés le long de la région sous-pleurale

(Figure 30) (314). La diffusion continue de bléomycine par pompes osmotiques donne lieu à une fibrose homogène et continue le long de la région sous-pleurale.

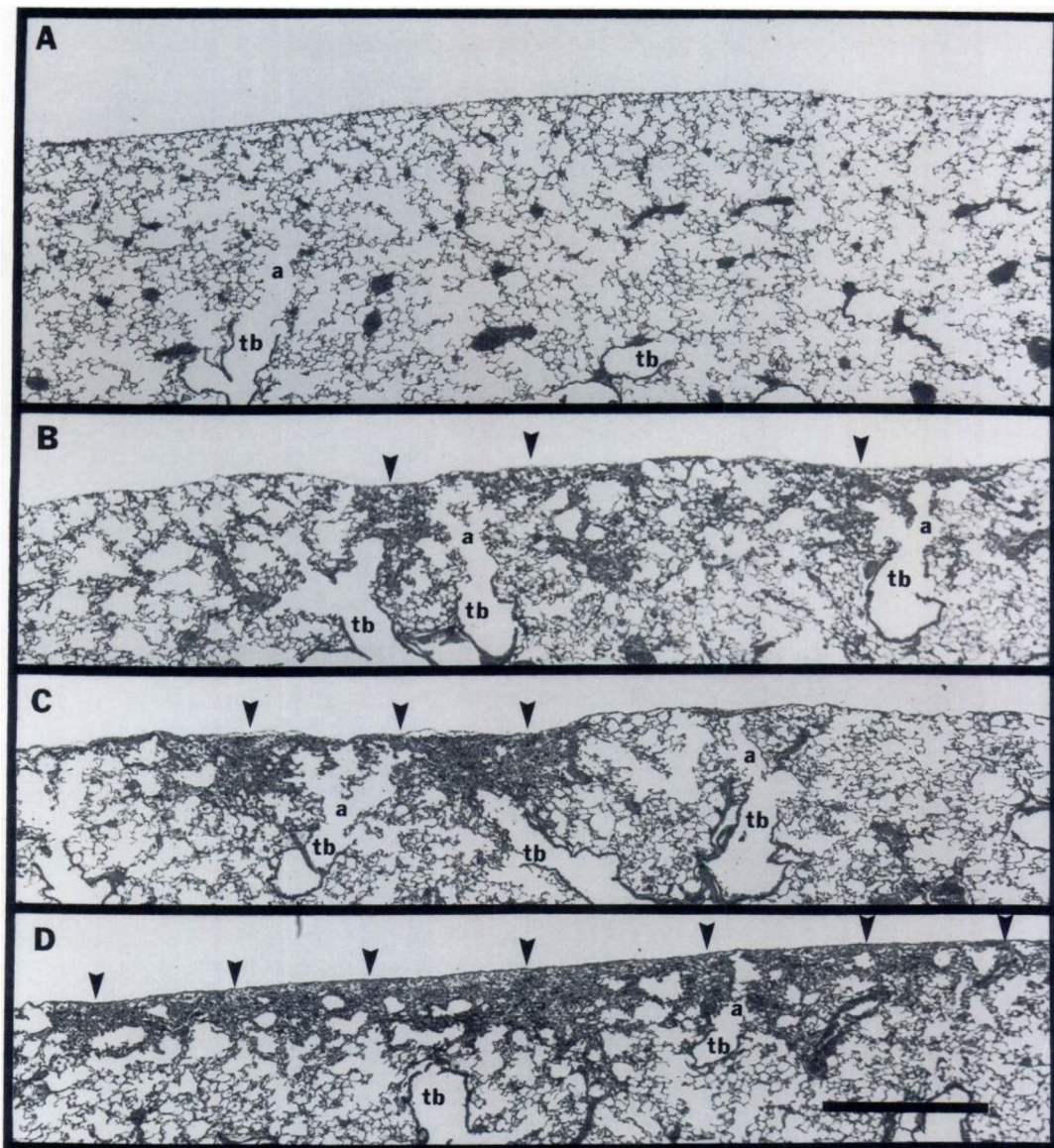


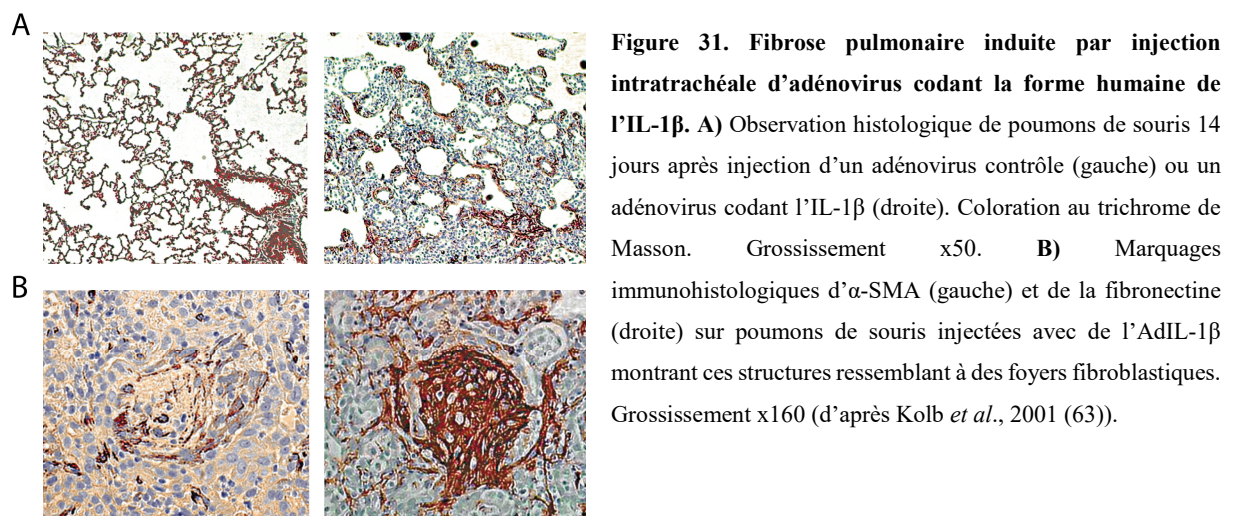
Figure 30. Différences histologiques de la fibrose induite par la bléomycine en fonction du mode d'injection. Histologie de poumons de souris injectées **A**) avec du NaCl 0,9% (sous-cutanée, deux fois par semaine) ou avec de la bléomycine **B**) sous-cutanées (10 injections de 10 mg/kg, deux fois par semaine), **C**) intraveineuse (une injection de 80 mg/kg) ou **D**) en diffusion continue (pompe osmotique, 100 mg/kg sur une semaine). tb : bronchioles terminales, a : canal alvéolaire, échelle : 0,5 mm (d'après Harrison & Lazo, 1987 (314)).

V.2. Le modèle par transfert de gène (Il-1 β et TGF- β 1)

L'administration d'adénovecteurs 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 TGF- β 1 (AdTGF-

β 1) et l'IL-1 β (AdIL-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 décrit précédemment (cf. II.4.3).

L'IL-1 β est un médiateur central du processus d'inflammation largement impliqué dans l'initiation de la réaction de fibrose comme nous l'avons vu. Son implication dans la fibrose pulmonaire a été confirmée par les travaux de Piguet et collaborateurs qui ont décrit en 1993 que l'administration du récepteur soluble IL-1ra (pour antagoniser l'action de l'IL-1 β) protège les souris de la fibrose induite par la bléomycine (158). L'injection d'AdIL-1 β dans les poumons de rats crée une forte réaction inflammatoire avec un recrutement de neutrophiles et de macrophages au niveau pulmonaire suivie par le développement d'une fibrose pulmonaire progressive détruisant l'architecture alvéolaire (Figure 31) (63). De manière intéressante, la fibrose se développe avec une accumulation de myofibroblastes et de collagène dans des régions spécifiques du poumon avec des caractéristiques communes aux foyers myofibroblastiques observés chez l'homme, constituant un avantage important en comparaison au modèle à la bléomycine (63).



La surexpression du TGF- β 1 grâce à une injection d'AdTGF- β 1 conduit à une forte augmentation du taux de cette cytokine pro-fibrotique au niveau des cellules alvéolaires pulmonaires et bronchiques (Figure 32) (315). 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. Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle indispensable du TGF- β 1 dans l'initiation de la fibrose (315). Le TGF- β 1 induit une fibrose pulmonaire progressive et sévère, 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 (261, 315). Dans le cas d'AdTGF- β 1, 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 via un processus d'EMT des cellules épithéliales dans un modèle de fibrose péritonéale (316).

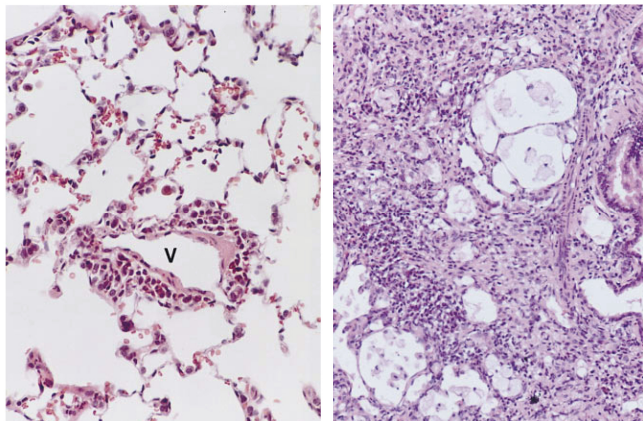


Figure 32. Modèle de fibrose pulmonaire induite par injection d'adénovirus codant la forme humaine du TGF- β 1 actif. Observations de poumons de rat 64 jours après injection intratrachéale d'adénovecteur contrôle (gauche) ou d'un adénovecteur codant le TGF- β 1 actif (droite). Grossissement x250. v, structure vasculaire. (d'après Sime *et al.* 1997 (315)).

Ces modèles ont donc de nombreux avantages mais présentent cependant des limitations importantes (310). D'abord sur le plan pratique, leur mise en place est couteuse et nécessite des infrastructures lourdes et du personnel formé et habilité au travail dans des laboratoires d'animalerie de niveau 2. L'utilisation d'adénovecteur entraîne une réaction immunitaire de la part de l'animal injecté. Comme nous l'avons vu, l'immunité et l'inflammation sont des mécanismes intimement liés à l'initiation de la fibrogenèse. De ce point de vue, les adénovecteurs représentent une limitation importante même si un adénovecteur « vide » (AdDL) est utilisé comme contrôle. De plus, l'injection d'adénovirus ne permet qu'une infection limitée aux cellules épithéliales car ce type de vecteur a un tropisme spécifique pour les cellules épithéliales. Enfin, la dernière limitation concerne les taux d'expression du transgène induit lors de l'infection des cellules épithéliales pulmonaires par l'adénovecteur. Les promoteurs viraux présents dans ces vecteurs entraînent généralement des taux d'expression à largement supérieurs aux taux physiologiques ou ceux induit naturellement lors d'un processus de fibrose. Même si ils permettent un développement rapide de la fibrose pulmonaire, ces taux élevés de surexpression peuvent de toute évidence altérer les voies endogènes mises en jeu et peuvent de ce fait donner une image biaisée de la pathogenèse de la maladie.

V.3. Les modèles de fibrose pleuro-pulmonaires

V.3.1. Le modèle AdTGF- β 1 intra-pleural

Au sein de notre équipe, plusieurs modèles de fibrose pleurale chez le rat et la souris ont été développés (261, 276). Un de ces modèles est basé sur l'utilisation d'adénovirus, directement administrés 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 flanc droit au niveau du sixième espace intercostal. La validation de cette méthode et la démonstration que les adénovecteurs infectent seulement les cellules mésothéliales se fait à l'aide d'adénovirus contenant le gène LacZ (AdLacZ). Ce gène code pour l'enzyme β -galactosidase capable d'hydrolyser le lactose et le galactose. La β -galactosidase est capable d'hydrolyser le X-Gal (un galactoside) qui après oxydation forme un composé bleu, et précipite sur le lieu de l'hydrolyse permettant de mettre en évidence l'activité de l'enzyme. 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 infectent uniquement les cellules mésothéliales et ce de façon transitoire pendant environ quatorze jours (Figure 33). Dans ce travail de thèse, ce modèle AdLacZ est utilisé pour monitorer la localisation des cellules mésothéliales pleurales.

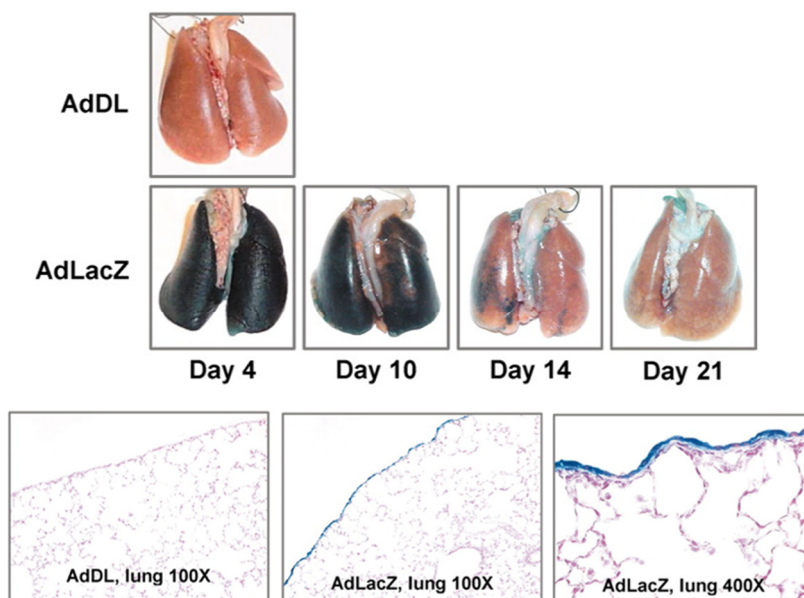


Figure 33. Modèle du suivi de la localisation des cellules pleurales par injection intra-pleurale d'AdLacZ. A) Photo de poumons de rats 4, 10, 14 et 21 jours après avoir reçu une injection intra-pleurale d'adénovirus « vide » (contrôle, AdDL) ou d'adénovirus codant la β -galactosidase (AdLacZ). B) Coupe histologique de poumons de rats 4 jours après administration intra-pleurale d'AdDL ou d'AdLacZ. Contre coloration : « Nuclear fast Red » (d'après Decologne et al., 2007 (261)).

L'administration d'AdTGF- β 1 suivant cette méthode entraîne une surexpression de TGF- β 1 dans l'espace pleural induisant une fibrose pleurale progressive. La progression de la

fibrose a été observée jusqu'à 64 jours (Figure 34). 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 (315, 317). En observant non seulement la plèvre mais aussi les régions sous pleurales, notre équipe a montré une progression de la fibrose dans le parenchyme pulmonaire. La forte présence de la protéine « Heat Shock Protein-47 » (HSP47), chaperon du collagène, dans les régions pleurales mais également sous-pleurales à J64 montre que le processus de fibrose est toujours actif et que le collagène continue de s'accumuler, même lorsque l'expression du transgène est passée.

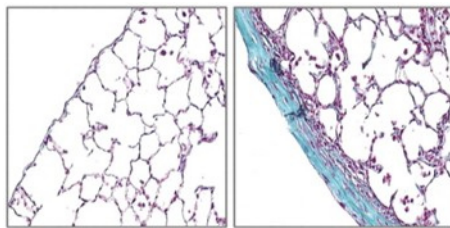


Figure 34. Modèle de fibrose pleurale induite par injection intra-pleurale d'AdTGF- β 1. Coupes histologiques de poumons de rat marquées au trichrome de Masson, 64 jours après injection intra-pleurale d'adénovirus. Poumons de rat ayant reçu une injection intra-pleurale d'adénovirus vide (AdDL, gauche) ou codant pour TGF- β 1 (AdTGF- β 1, droite) (d'après Decolgne et al., 2007 (261)).

V.3.2. Le modèle de co-administration bléomycine et noir de carbone

Un autre modèle de fibrose pleuro-pulmonaire a été développé dans notre équipe et est basé sur la co-administration de bléomycine et de noir de carbone (276). Les particules de carbone sont présentes dans la fumée de cigarette et sont un des composants de la pollution, deux facteurs de risque du développement de la FPI. L'injection via la trachée de particules de carbone n'a aucun effet sur la fibrose induite par injection intratrachéale de bléomycine. Par contre, son administration au niveau pleural exacerbe la toxicité de la bléomycine intrapleurale (Figure 35) (276). De façon intéressante, des mesures histomorphométriques ont montré que l'accumulation de collagène au niveau pleural progresse vers l'intérieur du parenchyme pulmonaire (276).

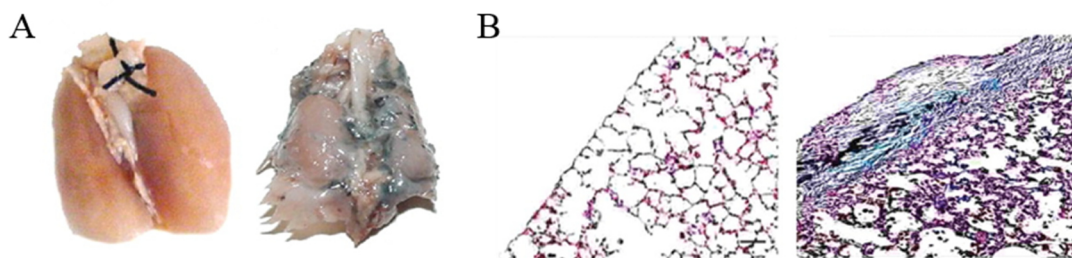


Figure 35. Modèle de fibrose pleurale induite par co-administration intra-pleurale de bléomycine et de noir de carbone. A) Photo de poumons de souris 21 jours après injection intrapleurale de bléomycine seule (gauche) ou de bléomycine + noir de carbone (droite). B) Coupes histologiques de poumons de souris marquées au trichrome de Masson, 21 jours après injection intra-pleurale de NaCl (gauche) ou bléomycine + noir de carbone (droite) (d'après Decolgne *et al.*, 2010 (276)).

VI. Les options thérapeutiques de la FPI

Le développement des différents modèles animaux décrits au chapitre précédant a permis de mettre en évidence des phénomènes et mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la FPI, que ce soit dans son initiation ou dans sa progression. Ces modèles animaux ont également été utilisés pour l'étude de stratégies contre ces mécanismes débouchant sur de potentielles thérapeutiques qui ont été confirmées ou non par des essais cliniques chez les patients atteints de FPI.

VI.1. Les thérapies anti-inflammatoires et immunomodulatrices

Dans des conditions normales, les poumons sont protégés des agressions dues aux espèces réactives de l'oxygène (ou « reactive oxygen species » -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 (318). En plus de leur action néfaste directe sur les macromolécules et l'ADN des cellules épithéliales, les ROS influencent également les processus pro-fibrosants. Par exemple, les myofibroblastes provenant de poumons atteints de FPI génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut servir de signal paracrine pour l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales voisines (319). La N-acétylcystéine est un composé possédant des pouvoirs antioxydants. Dans une étude préliminaire réalisée sur 18 patients, l'ajout de N-acétylcystéine au traitement corticostéroïdes ± immunomodulateurs a révélé une amélioration des fonctions pulmonaires des patients traités (320). Dans l'essai IFIGENIA, l'utilisation de la N-acétylcystéine a ensuite été explorée sur 155 patients répartis en deux groupes : N-acétylcystéine vs. Placebo en combinaison avec la prednisone (corticostéroïde) et l'azathioprine (immunosuppresseur) (321). A 12 mois, l'utilisation de la N-acétylcystéine 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. Par la suite, le bénéfice d'une stratégie anti-inflammatoire basée sur l'administration de prednisone (corticostéroïde), d'azathioprine (immunosuppresseur) et de N-acétylcystéine a été évalué dans l'essai clinique PANTHER-IPF (Prednisone, Azathioprine, and N-Acetylcysteine: A Study That Evaluates Response in Idiopathic Pulmonary Fibrosis) (49). Lors de cet essai trois groupes étaient testés : un groupe recevant uniquement la N-acétylcystéine, un groupe recevant la

combinaison prednisone, azathioprine et N-acétylcystéine et un groupe Placebo. Cette étude comparait 77 patients recevant la combinaison ou la N-acétylcystéine 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). Comparativement au placebo, le traitement par la combinaison des trois molécules 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 (49). La comparaison spécifique des groupes N-acétylcystéine et placebo a été publiée deux ans plus tard (322). Elle n'a montré aucun bénéfice significatif du traitement à la N-acétylcystéine sur la fonction respiratoire.

VI.2. Les molécules anti-fibrotiques approuvées

VI.2.1. 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. Son mécanisme d'action reste encore peu clair mais semble passer par différents processus impliqués dans la fibrose. *In vitro*, la pirfenidone inhibe la prolifération des myofibroblastes, réduit la synthèse de collagène associée et abroge l'induction du chaperon moléculaire du collagène HSP47 par le TGF- β 1 (323, 324). Dans les modèles animaux, elle peut être utilisée de manière prophylactique ou thérapeutique et, dans les deux cas, elle atténue la fibrose induite par la bléomycine en association avec une réduction de taux de TGF- β chez la souris (325). Elle a une action inhibitrice sur la production de radicaux oxygénés, menant à des effets anti-inflammatoires avec inhibition de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (326, 327). Une étude a également montré que la pirfenidone peut 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 (328).

Devant ces résultats prometteurs sur les modèles animaux, la pirfenidone a fait l'objet de nombreux essais cliniques dans la FPI. Le programme CAPACITY a évalué les résultats de deux essais cliniques sur la pirfenidone (essai 004 et 006) (329). 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) sur 72 semaines avec une réduction moyenne de 8% dans le groupe recevant la pirfenidone (2,403 mg/jour) contre 12,4% 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 (329). Ces résultats ont été confirmés par l'étude ASCEND où la pirfenidone limite le déclin de la capacité vitale forcée (-6,5% comparé à -17,7% pour le groupe placebo) (Figure 36) (330).

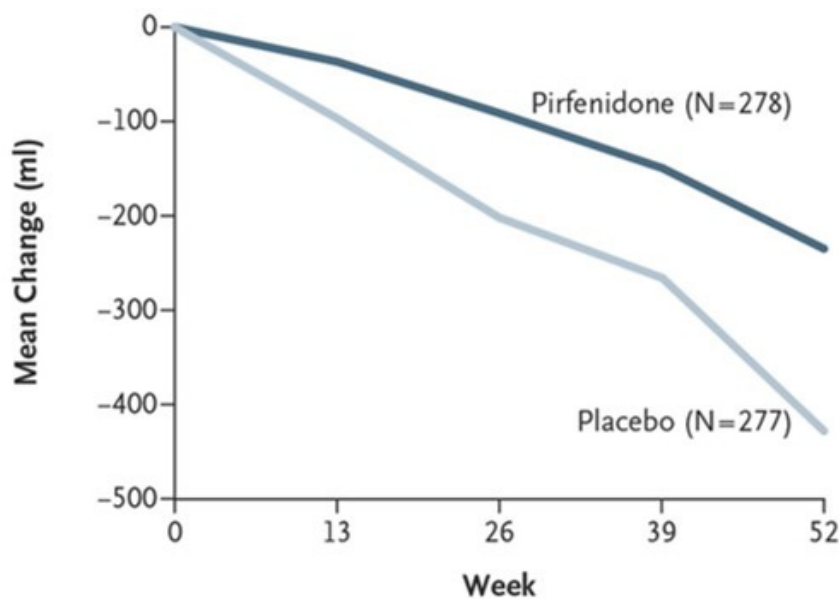


Figure 36. Suivi de la capacité vitale forcée lors de l'essai de phase III ASCEND. La capacité vitale forcée (en ordonnées) de patients atteints de FPI, traités ou non avec de la pirfenidone, a été suivie sur un an (abscisse). Les résultats sont exprimés en changement par rapport au début du traitement. n = 278 pour pirfenidone et n = 277 pour placebo. Données de l'essai ASCEND (d'après King *et al.*, 2014 (330)).

VI.2.2. Nintédanib

Le nintédanib est une petite molécule décrite comme un inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette molécule est capable d'interférer avec les récepteurs de facteurs de croissance comme le « fibroblast growth factor » (FGF)-1, « vascular endothelial growth factor receptor » (VEGF)-2 ou « platelet-derived growth factor » (PDGF) (331). Toutes ces voies sont bien connues pour leur implication dans la fibrogenèse faisant du nintédanib une molécule intéressante dans la recherche sur la fibrose. L'activité anti-fibrotique de cette molécule a été montrée dans plusieurs modèles animaux de fibrose pulmonaire chez le rongeur (331). Dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par injection intranasale de bléomycine, le nintédanib a des effets protecteurs lorsqu'il est administré soit de façon préventive (du jour initial jusqu'à jour 14) ou dans une optique thérapeutique (de J7 à J21) (332).

L'efficacité du nintédanib dans la FPI a été testée chez l'homme dans les essais cliniques de phase II (TOMORROW) et III (IMPULSIS) (333, 334). Récemment, Richeldi et

collaborateurs ont publié une méta-analyse de ces différents essais cliniques montrant que le nintedanib diminue le déclin annuel de la CVF chez les patients atteints de FPI : -112,4 ml/an pour le nintedanib (n = 723) contre -223,3 ml/an pour le groupe placebo (n = 508) (Figure 37) (335). De plus, le nintedanib induit une baisse du nombre d'exacerbation aigue. Cependant, le nintedanib semble avoir des effets indésirables, parfois importants, se manifestant le plus fréquemment par des diarrhées chez 61% des patients traités.

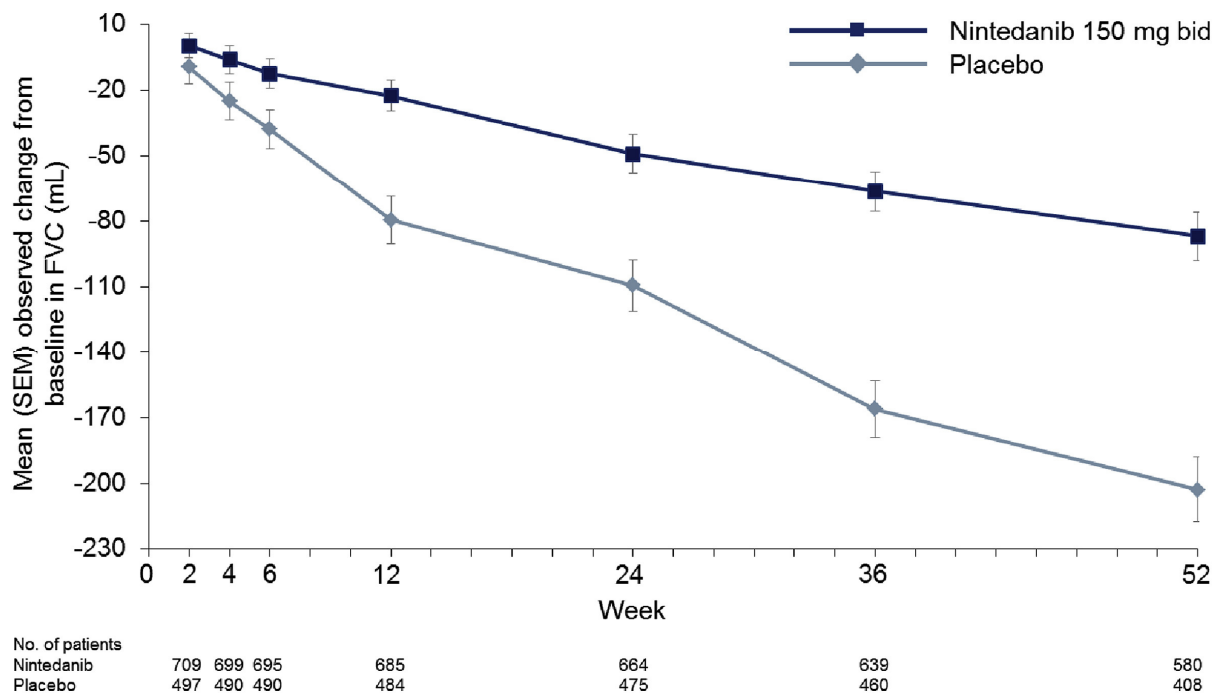


Figure 37. Analyse des suivis de capacité vitale forcée des essais TOMORROW et IMPULSIS. La capacité vitale forcée (en ordonnées) de patients atteints de FPI, traités ou non avec du nintedanib, a été suivie sur un an (abscisse). Les résultats sont exprimés en changement par rapport au début du traitement. Le nombre de patients est indiqué en bas du graphique. Données des essais TOMORROW et IMPULSIS (d'après Richeldi *et al.*, 2016 (335)).

La pirfenidone et le nintédanib représentent des composés d'intérêt dans la recherche de nouvelles thérapies contre la FPI même si ils ne permettent que de ralentir la progression de la maladie chez les patients souffrant de fibrose pulmonaire légère à modérée. La haute autorité de santé les classent dans la catégorie du service médical rendu modéré chez les patients au diagnostic clinique et radiologique et/ou histopathologique confirmé de fibrose pulmonaire idiopathique. De plus, l'apparition d'effets négatifs devant entrainer la diminution voire l'arrêt des traitements montre le besoin de développer d'autres thérapeutiques pour la FPI.

VI.3. Les stratégies en cours de développement

Plusieurs stratégies sont en cours de développement pour le traitement de la FPI (336). Récemment, l'équipe du Dr Chambers a montré que la signalisation la voie PI3 kinase/mTOR est activée dans la FPI et que son inhibition peut représenter une stratégie anti-fibrotique (337). De plus, l'inhibition de cette voie par le composé GSK2126458 réduit la synthèse de collagène dans un modèle *ex vivo* de coupes de poumons de patients atteints de FPI et inhibe les effets pro-fibrosants du TGF- β 1 sur des fibroblastes primaires humains. Les auteurs indiquent qu'un essai clinique est en cours pour démontrer cette preuve de concept chez des patients atteints de FPI.

Comme nous l'avons vu, le TGF- β 1 apparaît clairement comme un médiateur central de la fibrogenèse. L'inhibition de ALK5, un récepteur au TGF- β 1, interfère avec la fibrose induite par injection d'AdTGF- β 1 chez le rat (191). Des anticorps inhibiteurs du TGF- β 1 sont actuellement en développement. Un essai clinique de phase I a été réalisé avec un anticorps neutralisant, le GC1008. Les premiers résultats de phase I avaient montré une absence de toxicité. Cependant, le TGF- β 1 est une cytokine largement impliquée dans un grand nombre de mécanismes et processus physiologiques et pathologiques et donc son inhibition pourrait entraîner des effets secondaires. Les nouvelles thérapies en développement ciblent donc l'activation du TGF- β 1 qui est une étape clé du processus fibrosant. L'inhibition de l'intégrine α v β 6 (responsable de l'activation du TGF- β 1 dans le milieu extracellulaire) par un anticorps neutralisant semble capable de limiter la fibrose pulmonaire (338). 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 en cours.

Notre équipe s'intéresse aux rôles des protéines de stress dans différents processus physio-pathologiques tels que la différenciation cellulaire ou la fibrose. Leur implication dans le processus de cicatrisation et dans la fibrose a récemment été revue (16). De façon intéressante, les protéines de stress semblent fortement liées aux voies de signalisation cellulaire incluant la voie du TGF- β 1. Ces dernières années, nous avons montré l'implication de deux protéines de stress dans la fibrose pulmonaire via leur rôle dans l'EMT ou la voie des Smad. De nombreuses d'entre elles sont surexprimées dans la fibrose et leur inhibition apparaît donc intéressante et pourrait déboucher vers une stratégie thérapeutique dans des maladies fibrosantes comme la FPI.

VII. Les protéines de stress et la fibrose

VII.1. Présentation des « Heat Shock Proteins »

In vivo, les cellules sont continuellement exposées à des stress induits par : différents facteurs environnementaux (chaleur, rayonnement UV, stress oxydatif), l'exposition à des xénobiotiques (chimiothérapie, polluants), ou des situations pathologiques (inflammation, cancer). Les cellules ont développé des mécanismes protecteurs pour s'adapter à ces conditions. Dans les années 1960, Ritossa a décrit un motif d'expression d'ARN messenger spécifique chez la drosophile après un choc thermique (339, 340). Ces études ont été à la base de la réponse au choc thermique connue actuellement et caractérisée par l'expression des protéines de stress ou « Heat Shock Proteins » (HSP). Les HSP sont présentes dans de nombreux organismes de la bactérie à l'homme et sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques (repliement et stabilisation des protéines) mais aussi dans des conditions pathologiques comme l'inflammation (341), le cancer (15) ou la fibrose (16).

Les HSP sont classifiées en fonction de leur poids moléculaire en six grandes classes : HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP (figure 38) (342). Elles partagent des caractéristiques communes mais aussi des particularités comme le mode d'expression (inductible ou constitutive).

Initiation de la réponse au choc thermique implique d'abord l'expression des HSP dont l'activité transcriptionnelle est régulée par des facteurs de transcription spécifiques appelés « Heat Shock Factor » (HSF) (343). Chez les mammifères, 4 HSF ont été décrits (HSF1, HSF2, HSF3 et HSF4) qui ont chacun une fonction propre même si des phénomènes de compensation ont été montrés. Dès leur activation dans le cytoplasme, les HSF se lient à des séquences d'ADN spécifiques appelées « Heat Shock Element » (HSE) et permettent l'expression des HSP. HSF1 est le facteur principal de la réponse au choc thermique même si HSF2 aussi favorise l'expression des HSP (344). La délétion d'HSF1 supprime l'expression des HSP induite par un choc thermique (345). Dans des conditions normales, HSF1 est lié sous forme de monomère à HSP70 et HSP90 (346). Au moment d'un stress, HSP70 interagit avec les protéines dénaturées présentes dans la cellule et se dissocie d'HSF1 qui forme des trimères et se transloque dans le noyau pour augmenter l'expression des HSP.

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 ^a)	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	RP23-32L15.1; 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

^a Annotated as pseudogene, but possibly a true gene^b Under 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

^a Under 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	cvHSP; 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

^a Under consultation with HGNC and the scientific community**Figure 38. Nomenclature des différentes HSP.** (d'après Kampinga *et al.*, 2009 (342)).

Durant ces dernières années, les HSP extracellulaires sont beaucoup étudiées dans de nombreuses processus pathologiques principalement dans la régulation du système immunitaire. Différents modèles pour expliquer la libération des HSP dans le milieu extracellulaire ont été avancés (347). Les HSP peuvent être libérées durant la mort de cellules par nécrose ou dans des vésicules appelées exosomes (348, 349). Des études ont montré que les

HSP extracellulaires se lient à des récepteurs membranaires comme certains TLR ou des récepteurs Scavenger (350, 351).

VII.2. Les systèmes chaperons

Dans la cellule, les fonctions des protéines sont liées à leurs structures. Lors de la synthèse des protéines, de nombreux processus sont mis en place pour aider au repliement adéquat des protéines. Les HSP agissent comme des chaperons moléculaires dans différentes conditions comme le repliement des chaînes de polypeptides en synthèse, le transport de protéines ou encore le repliement de protéines dénaturées (ou « unfolded protein response ») (Figure 39) (13, 352). Lorsque la conformation native n'est pas obtenue, les HSP peuvent amener les protéines mal repliées et/ou dénaturées vers un processus de dégradation protéasomale via le système ubiquitine/protéasome (353). Les systèmes de chaperons HSP70 et HSP90 nécessitent de l'ATP pour fonctionner alors que l'action des petites HSP est indépendante de la présence d'ATP.

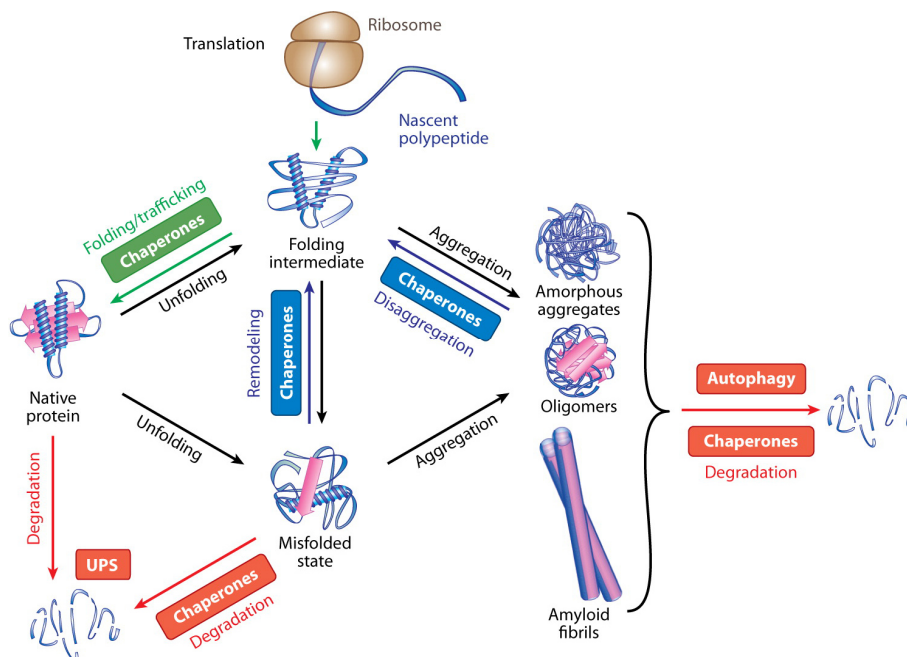


Figure 39. Le rôle des HSP dans la « unfolded protein response ». Les HSP agissent comme des chaperons moléculaires dans différents processus comme la traduction et le repliement de chaînes de polypeptides en synthèse, le repliement de protéines dénaturées mais aussi dans le transport de protéines ou leur dégradation (d'après Kim *et al.*, 2013 (13)).

VII.2.1. Le système HSP70

Le système HSP70 joue un rôle clé dans la réponse aux protéines dénaturées qui ne sont pas dans leur conformation native. La protéine HSP70, aussi connue sous le nom de DnaK chez les procaryotes, est une molécule composée de deux parties : un domaine N-terminal permettant la liaison à un nucléotide et un domaine C-terminal de liaison à des peptides (ou

« peptide binding domain », PBD) (354). Le PBD est constitué de deux feuillets- β et d'une hélice- α formant un site de liaison au substrat avec une structure de couvercle. Le cycle du système de repliement d'HSP70 est illustré figure 40 (13). La fixation d'HSP70 aux protéines clientes dénaturées ou mal repliées est dépendante de la fixation d'une molécule d'ATP. HSP70 liée à l'ATP est en conformation « ouverte » permettant la liaison à des protéines clientes. Ce recrutement est médié et facilité par HSP40 (355).

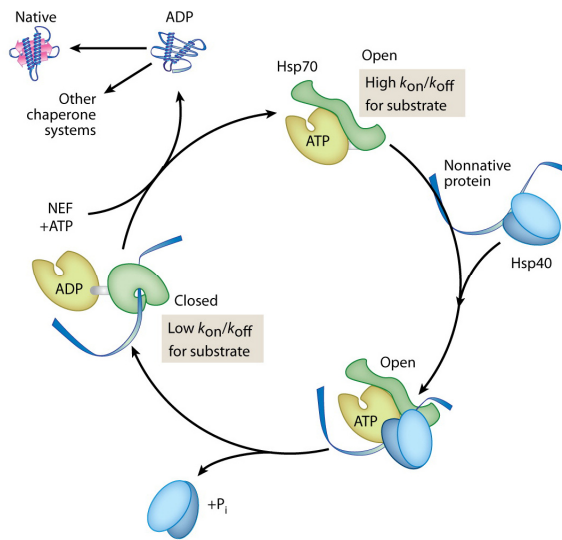


Figure 40. Schéma du cycle d'HSP70. HSP70 liée à l'ATP est en conformation « ouverte » avec une grande affinité pour les protéines dénaturées facilitant le recrutement de protéines clientes via HSP40. HSP40 facilite l'hydrolyse de l'ATP en ADP entraînant un changement vers la conformation « fermée ». Enfin, HSP110 (« nuclear exchange factor », NEF sur la figure) permet le changement de la molécule d'ADP pour l'ATP, rouvrant HSP70 et libérant la protéine cliente dans sa conformation native (d'après Kim *et al.*, 2013 (13)).

Par la suite, l'hydrolyse de l'ATP en ADP, étape également facilitée par HSP40, entraîne le repliement de la protéine cliente vers sa conformation native. Enfin, l'échange de l'ADP pour une molécule d'ATP permet l'ouverture du PBD d'HSP70 et la libération de la protéine cliente. Cette étape peut être catalysée par un autre co-chaperon, HSP110, qui possède une activité de facteur d'échange de nucléotide (356). L'action d'HSP70 est finement régulée par ces co-chaperons (membres des familles HSP40 et HSP110) qui sont essentiels à l'activité du système de repliement. HSP70 joue un rôle clé dans la réponse aux protéines dénaturées dans le cytosol et est aussi important dans le repliement intervenant dans les phases précoces lors de la synthèse des chaînes peptidiques durant la traduction (357).

VII.2.2. Le système HSP90

HSP90 est la protéine de stress la plus abondante dans la cellule et peut atteindre 1% des protéines totales (358). HSP90 est composée de différents domaines : un domaine de liaison à des nucléotides en N-terminal, un domaine central de liaison aux protéines clientes contenant une « poche » hydrophobe et un domaine en C-terminal impliqué dans la dimérisation (359). Deux isoformes (α et β) d'HSP90 existent et on retrouve alors des homo- ou hétéro-dimères. HSP90 est décrite pour son implication dans plusieurs voies de signalisation en liant différentes

protéines (358). De façon similaire à HSP70, l'action d'HSP90 est dépendante de la présence d'ATP (359). HSP90 est principalement impliquée dans le repliement de protéines sorties du système HSP70 dans une mauvaise conformation. Dans ce cas, la protéine HOP (« HSP70-HSP90 Organizing Protein ») agit comme un lien entre les systèmes HSP70 et HSP90 (360). Le cycle d'HSP90 est illustré figure 41. HSP90, sous forme de dimère sans nucléotide, peut lier des protéines clientes. Le recrutement de l'ATP entraîne un changement vers une conformation « fermée » avec interaction des deux domaines de liaison aux nucléotides des deux monomères. Durant cette étape, où le dimère forme une structure dite de pince moléculaire, la protéine cliente est renaturée avant hydrolyse des molécules d'ATP et libération du dimère d'HSP90 (361). Ce cycle apparaît aussi régulé par des co-chaperons d'HSP90. Des études ont montré que Sti1 interfère avec la dimérisation des domaines N-terminaux durant le cycle inhibant le cycle alors que Aha1 (« activator of HSP90 ATPase ») potentialise l'activité ATPase d'HSP90 favorisant l'avancée du cycle.

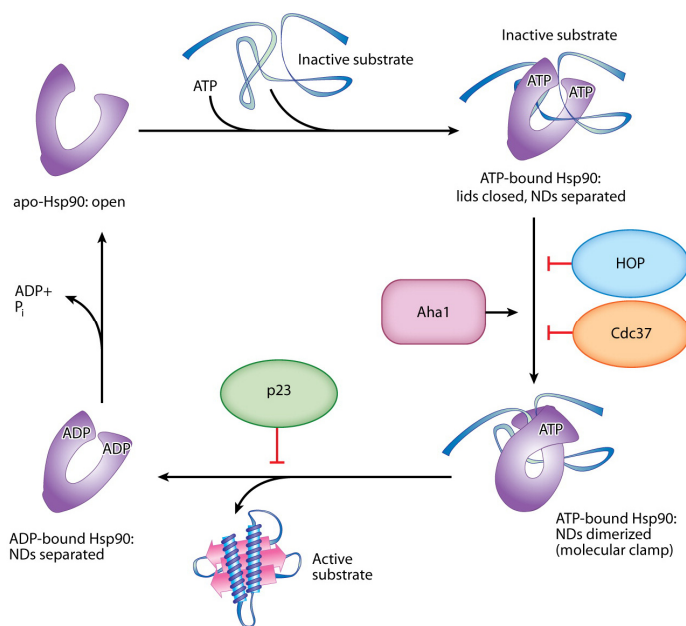


Figure 41. Schéma du cycle d'HSP90. La protéine cliente se lie à un dimère HSP90 associé à l'ATP. Par la suite, les domaines N-terminaux des deux monomères interagissent entraînant la fermeture d'HSP90 en structure dite de pince moléculaire. L'hydrolyse de l'ATP en ADP induit l'ouverture d'HSP90 et la libération de la protéine cliente dans sa conformation native. Ce cycle est modulé par différents cofacteurs agissant surtout sur l'étape d'hydrolyse de l'ATP. HOP inhibe l'activité ATPase alors que d'autres facteurs comme Aha1 favorise cette activité modulant l'avancé du cycle (d'après Kim *et al.*, 2013 (13)).

VII.2.3. Le système des chaperonnines

Les chaperonnines sont des larges complexes en structure de double anneaux qui fonctionne par encapsidation de protéines dénaturées dans une cavité centrale hydrophobe (362). Les chaperonnines sont classifiées en deux familles suivant leurs structures : les chaperonnines de type 1 qui sont retrouvées chez les bactéries (GroEL) ou les mitochondries des cellules eucaryotes (HSP60) et les chaperonnines de type 2 retrouvées chez les cellules eucaryotes (TRiC). Les chaperonnines de type 1 sont représentées comme une structure de

« tonneau » et nécessite un co-facteur (HSP10 chez les eucaryotes, GroES chez les bactéries) qui agit comme un « couvercle ». Au contraire, les chaperonnines de type 2 ne requièrent pas de co-facteurs pour leur fonctionnement. Les changements de conformation (« ouverte » / « fermée ») sont dépendant de l'ATP. Le système de chaperonnines bactérien GroEL-GroES est le mieux décrit et la cinétique du cycle de repliement est illustrée dans la figure 42 (13). Les chaperonnines ont été décrites dans le repliement de nombreuses protéines prises en charge inefficacement par les systèmes HSP70 ou HSP90.

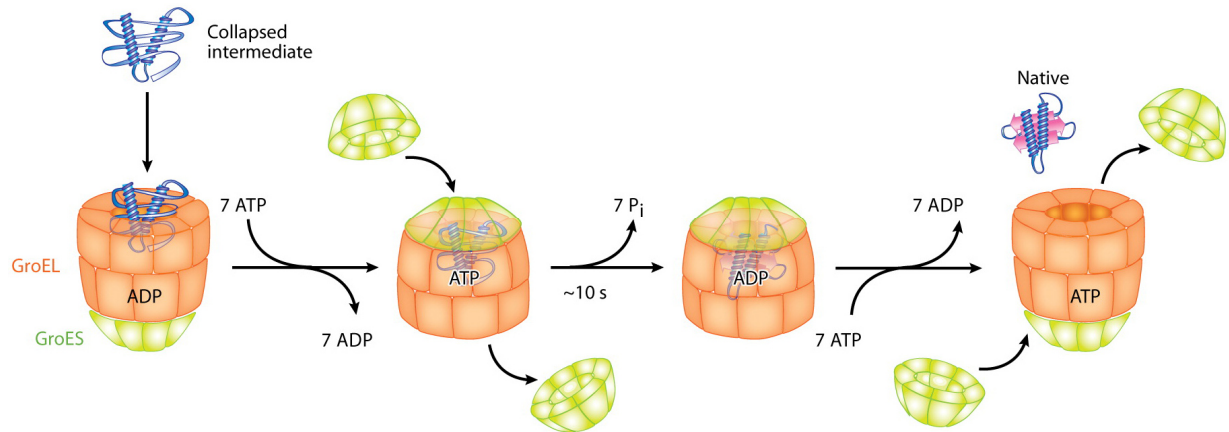


Figure 42. Cycle de repliement du système GroEL-GroES. La liaison d'une protéine cliente à GroEL entraîne l'association à l'ATP menant à un changement de conformation, le recrutement de GroES et l'encapsulation de la protéine cliente. Comme pour le système HSP90, l'hydrolyse de l'ATP en ADP entraîne l'ouverture du complexe chaperon et la libération du co-facteur GroES et de la protéine cliente dans sa conformation native (d'après Kim *et al.*, 2013 (13)).

VII.2.4. HSP27

HSP27 est la petite HSP la plus étudiée et est 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 mais en cas de choc thermique elle se relocalise presque immédiatement dans le noyau ou autour de celui-ci (363). Elle est composée d'un motif WDPF situé en N-terminal qui est nécessaire à la formation de grands oligomères (364). 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. L'oligomérisation est un processus dynamique régulé par le statut de phosphorylation de la protéine (Figure 43). A l'état phosphorylé, HSP27 se trouve sous forme de dimère et à l'état non phosphorylé se trouve sous forme de grands oligomères pouvant former des structures de poids moléculaires allant jusqu'à 800kDa.

L'activité d'HSP27 est différente de celle d'HSP90 et d'HSP70 qui ont la capacité de favoriser le repliement 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 (365). 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.

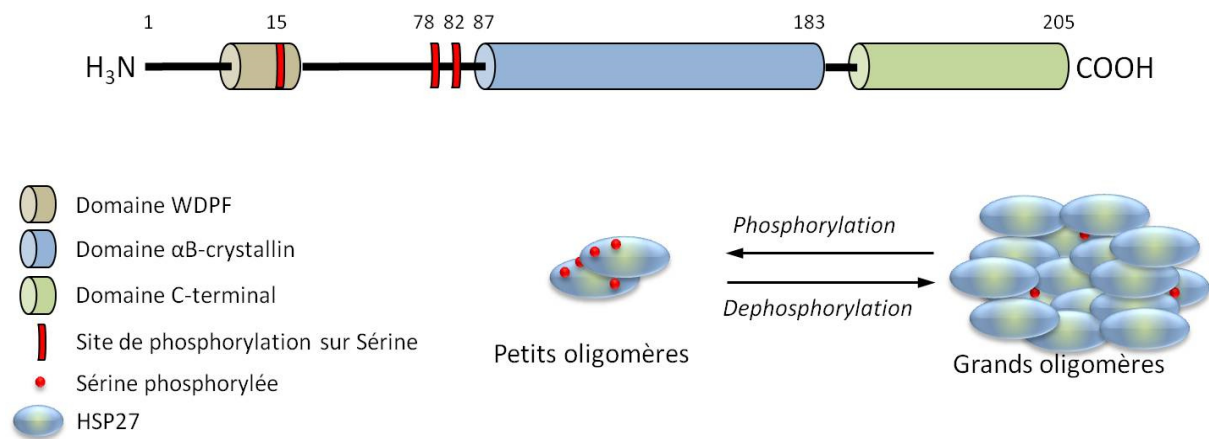


Figure 43. Structure et organisation d'HSP27. HSP27 est en équilibre entre un état dimérique et oligomérique en fonction de sa phosphorylation. Selon son organisation, HSP27 aura différentes fonctions au sein des cellules (d'après Arrigo *et al.*, 2007 (364)).

HSP27 peut être phosphorylée sur trois résidus serines situés en position 15, 78, 82. Cette phosphorylation est régulée par la voie p38MAPK (366). 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 se détache de l'actine permettant ainsi à cette dernière de se polymériser (367).

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 a pour conséquence une augmentation de la transcription de ces gènes cibles comme Bcl-2, Bcl-X_L ou les IAP (« inhibitor of apoptosis protein ») favorisant la survie cellulaire (368).

HSP27 est aussi très étudiée pour son implication dans le cancer. Elle est fortement surexprimée 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, (369, 370). HSP27 semble protéger de l'apoptose et favoriser ainsi la prolifération cellulaire augmentant le potentiel métastatique des cellules cancéreuses probablement par ses capacités à se lier aux protéines du cytosquelette (371-374). HSP27 peut induire une résistance à certains médicaments anticancéreux. Choi et collaborateurs ont montré que l'expression d'HSP27 était directement liée à la résistance des cellules de cancers colorectaux à la chimiothérapie (375). En inhibant l'expression d'HSP27, ils diminuaient la résistance des cellules au traitement à l'irinotecan. Plus récemment, Zhuang *et al.* ont montré que l'inhibition d'HSP27 sensibilise les cellules A549 à l'induction de l'apoptose par TRAIL (« Tumor necrosis factor-alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand ») (376).

VII.2.5. αB-crystallin

αB-crystallin est une petite protéine de stress fortement inductible en conditions de stress dans de nombreux autres organes tels que le cerveau, le coeur, les muscles lisses et les poumons (377). 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 (378). HSP27 et αB-crystallin sont deux protéines très proches et elles peuvent co-localiser dans de nombreux organes en conditions normales ou pathologiques. Certaines publications rapportent un rôle synergique de ces deux petites HSP qui sont capables d'interagir l'une avec l'autre (379). αB-crystallin joue 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 (14). Ces interactions avec les filaments intermédiaires est importante et des mutations d'αB-crystallin entraînent des dommages sur l'architecture cytosquelettique cellulaire qui conduisent parfois à des pathologies sévères chez l'homme. Ces mutations entraînent des faiblesses musculaires notamment des muscles cardiaques causant des cardiomyopathies. En 2001, une étude de Brady *et al.* chez la souris montre que la déficience pour l'expression d'αB-crystallin entraîne un

phénotype sévère chez les souris âgées qui se caractérise par une posture voûtée, une perte importante de poids après 40 semaines, et une dégénérescence des cellules musculaires (380).

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.

α B-crystallin est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment l'apoptose. Plusieurs études ont démontré que la surexpression d' α B-crystallin a un effet protecteur contre un large panel de stimuli apoptotiques alors que son inhibition sensibilise grandement les cellules à la mort programmée (381-383). L'effet anti-apoptotique d' α B-crystallin semble mettre en jeu l'inhibition de la caspase-3, protéine effectrice essentielle du processus d'apoptose (381, 383-385). L'addition d' α B-crystallin recombinant à des extraits cellulaires empêche l'activation de la caspase-3 par le cytochrome c ou la caspase-8, étape cruciale du processus. α B-crystallin interagit avec la procaspase-3 inhibant ainsi son clivage et donc son activation expliquant sa fonction anti-apoptotique. Morisson *et al.* ont démontré sur des cardiomyocytes que la phosphorylation d' α B-crystallin sur la sérine 59 semble nécessaire et suffisante pour assurer une protection maximale contre l'apoptose (385). α B-crystallin est également capable de se lier à des protéines pro-apoptotiques tels que Bax, Bcl-Xs (386) et p53 (387) pour empêcher leur translocation dans la mitochondrie.

Il a été montré qu' α B-crystallin peut 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, α B-crystallin se relocalise au niveau du cytosquelette et se lie aux microtubules. Ainsi, les protéines intracellulaires endommagées sont séquestrées dans les microtubules et ne peuvent être toxiques pour la cellule (388). 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 distribution 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 (389). Le système d'ubiquitination des protéines pour la dégradation par le protéasome 26S, une protéase multicatalytique composée d'une sous-unité 20S catalytique et deux sous-unités 19S régulatrices (390), est essentiel pour le bon assemblage/désassemblage des complexes de protéines pour prévenir les interactions indésirables et leur agrégation. L'interaction d' α B-crystallin avec l'une des 14 sous-unités du protéasome 20S a été décrite (391). 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 (392). Le complexe α B-crystallin/FBX4 régit l'ubiquitination spécifique de divers substrats induisant leur dégradation.

VII.3. HSPs et fibrose

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les HSP sont impliquées dans différentes conditions physio-pathologiques et également dans la régulation de nombreuses voies de signalisation. La surexpression de différentes HSP a été mise en évidence et plusieurs rôles leurs ont été attribués dans les réactions fibrosantes. Les différents rôles des HSP dans la fibrose et sur la voie du TGF- β 1 ont été revus récemment par notre équipe (16).

VII.3.1. HSP et signalisation du TGF- β 1

Le TGF- β 1 est la cytokine clé du processus fibrosant directement impliquée dans la surproduction de collagène caractérisant la fibrose. La voie des Smad est la voie de signalisation classique du TGF- β 1 et est finement régulée par différentes HSP.

A. HSP70

Le rôle protecteur d'HSP70 dans le processus fibrotique est bien documenté (16). Chez le rongeur, la surexpression d'HSP70 protège de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (393). De plus, l'inhibition de cette HSP par le gefitinib aggrave la fibrose dans ce même modèle (394). Cet effet protecteur semble passer par différentes actions d'HSP70 sur les protéines de la voie des Smad (Figure 44A) (16). La surexpression d'HSP70 affecte les niveaux d'expression des TGF- β R (395). Le mécanisme exacte n'est pas connu mais les auteurs

avancent le rôle de la E3 ubiquitine ligase CHIP dans ce phénomène de dégradation TGF- β R. Dans un modèle de fibrose rénale, l'induction d'HSP70 inhibe la phosphorylation et la translocation de Smad3, interférant avec le processus d'EMT et la fibrose (396).

Des actions extracellulaires d'HSP70 ont aussi été mises en avant. La présence d'anticorps dirigés contre HSP70 a été montrée dans le sang de patients atteints de FPI. Cette présence était corrélée à la progression de la FPI (57). Dans un modèle de fibrose cardiaque chez le rongeur, le blocage de la forme extracellulaire d'HSP70 a un rôle protecteur (397). La forme extracellulaire d'HSP70 peut se lier à TLR4 qui, via la voie MyD88, va activer les voies MAPK, JNK et ERK et avoir des effets pro-fibrosants en entraînant l'expression du TGF- β 1 (Figure 44B) (16).

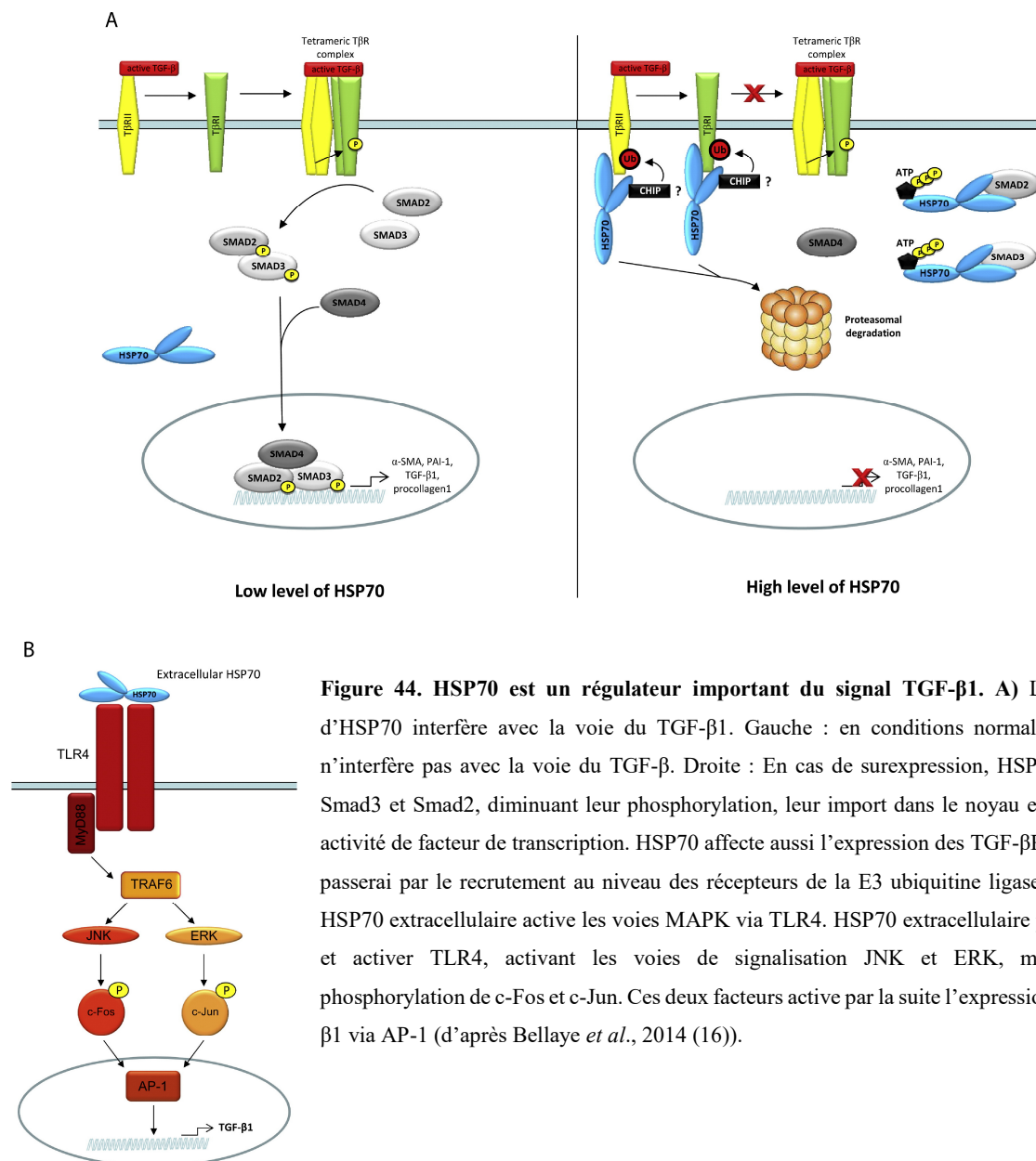


Figure 44. HSP70 est un régulateur important du signal TGF- β 1. A) L'induction d'HSP70 interfère avec la voie du TGF- β . Gauche : en conditions normales, HSP70 n'interfère pas avec la voie du TGF- β . Droite : En cas de surexpression, HSP70 se lie à Smad3 et Smad2, diminuant leur phosphorylation, leur import dans le noyau et ainsi leur activité de facteur de transcription. HSP70 affecte aussi l'expression des TGF- β R. Cet effet passera par le recrutement au niveau des récepteurs de la E3 ubiquitine ligase CHIP. B) HSP70 extracellulaire active les voies MAPK via TLR4. HSP70 extracellulaire peut se lier et activer TLR4, activant les voies de signalisation JNK et ERK, menant aux phosphorylation de c-Fos et c-Jun. Ces deux facteurs active par la suite l'expression du TGF- β 1 via AP-1 (d'après Bellaye *et al.*, 2014 (16)).

B. HSP90

De récentes études ont montré le rôle bénéfique de l'inhibition d'HSP90 dans la fibrogenèse. Le 17AAG, inhibiteur d'HSP90, est capable de prévenir l'expression d' α -SMA induite par le TGF- β 1 dans un modèle murin de fibrose rénale (398). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle d'HSP90 dans la voie du TGF- β 1 (Figure 45) (16). Dans des conditions normales, le TGF- β R de type II (TGF- β RII) est ubiquitiné par la E3 ubiquitine ligase Smurf2, ce qui entraîne sa dégradation via le protéasome. En même temps, le récepteur aux glucocorticoïdes se lie au facteur de transcription de gènes pro-fibrosants NF- κ B et le séquestre dans le cytosol. En conditions fibrosantes, HSP90 est surexprimée et se lie dans la cellule au TGF- β RII et au récepteur aux glucocorticoïdes. HSP90 interfère alors avec l'ubiquitylation du TGF- β RII favorisant son expression à la surface des cellules. En même temps, en se liant au récepteur aux glucocorticoïdes, HSP90 permet la libération de NF- κ B qui entraîne la synthèse de gènes profibrosants dans le noyau.

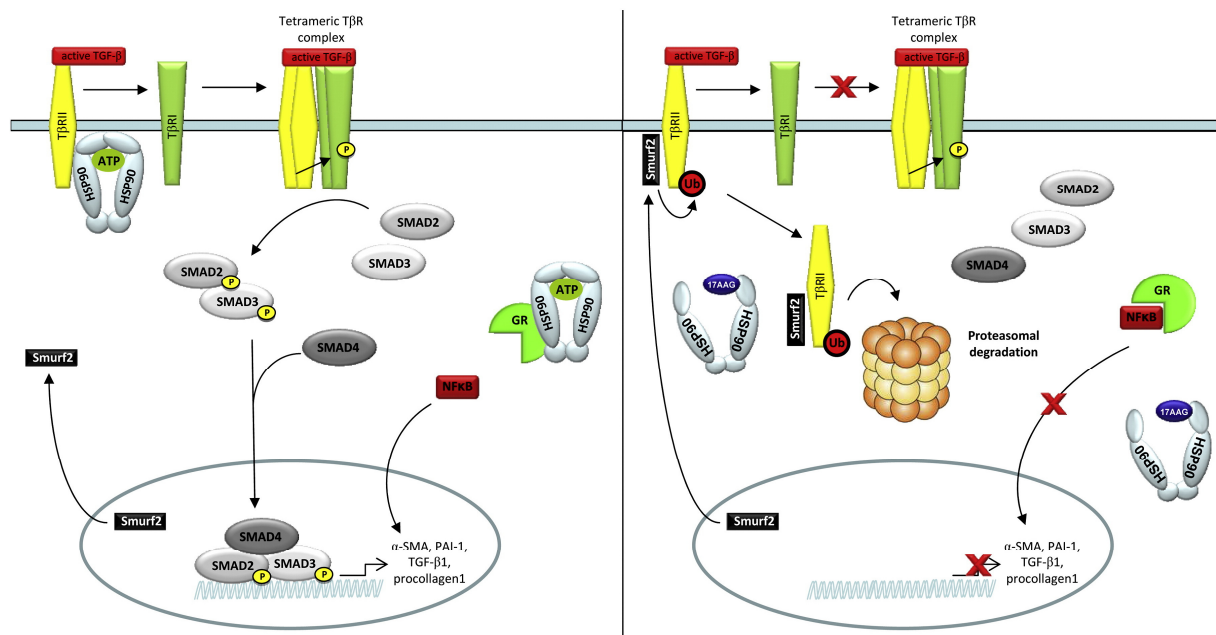


Figure 45. L'inhibition d'HSP90 interfère avec la voie du TGF- β 1. Gauche : HSP90 forme un complexe avec TGF- β RII, inhibant sa dégradation par le protéasome. En même temps, HSP90 se lie avec le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) entraînant la translocation et l'activité de NF- κ B. Droite : le 17AAG, un inhibiteur d'HSP90, se lie à HSP90 et interfère avec sa liaison au TGF- β RII et au GR entraînant la dégradation protéasomale de TGF- β RII et la séquestration de NF- κ B par le GR inhibant la voie du TGF- β 1 (d'après Bellaye *et al.*, 2014 (16)).

C. HSP47

De par sa fonction de chaperon du collagène, HSP47 se retrouve fortement impliquée dans le processus fibrosant (16). En effet, HSP47 est fortement augmentée dans la FPI et au cours de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine au sein des myofibroblastes, des pneumocytes de types II et des macrophages (399-401). Les niveaux d'HSP47 sont corrélés avec un mauvais pronostic (402). L'inhibition de ce chaperon par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens semble pouvoir diminuer le développement d'une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rat (403). *In vitro*, la pirfenidone diminue l'expression d'HSP47 dans des fibroblastes pulmonaires humains normaux (404).

D. HSP27

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 (399). Deux autres articles montrent l'implication d'HSP27 dans l'EMT en dehors du poumon. Le premier montre qu'HSP27 est surexprimée *in vitro* dans l'EMT des cellules mésothéliales de péritoine et qu'elle est en revanche diminuée *in vivo* dans l'EMT chronique de la fibrose péritonéale induite par la dialyse. La surexpression d'HSP27 *in vitro* protège de l'apoptose induite par les fluides de dialyse péritonéale (405). Dans la seconde étude, les auteurs suggère l'implication d'HSP27 dans la fibrose rénale via son rôle dans l'EMT. Ils montrent qu'HSP27 est surexprimée au cours de la fibrose rénale et qu'elle co-localise avec le TGF- β 1, l' α -SMA et l'E-cadhérine. *In vitro* les auteurs montrent qu'HSP27 est surexprimée au cours de l'EMT induite par le TGF- β 1. La surexpression d'HSP27 dans des cellules épithéliales rénales de rat, induit l'expression de l'E-cadhérine et inhibe l'expression du facteur de transcription Snail, protégeant ainsi de l'EMT. Les auteurs concluent sur le fait qu'HSP27 est impliquée dans le processus de fibrose rénale en ayant un rôle protecteur et que sa surexpression pourrait ralentir le processus fibrosant en inhibant le processus d'EMT (406).

Récemment, notre équipe a largement étudié le rôle d'HSP27 dans la fibrose pulmonaire (407). 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 chez les patients atteints de FPI. La surexpression d'HSP27 induit une transformation des cellules avec l'expression d' α -SMA et la

baisse de l'expression de l'E-cadhérine. De plus, l'inhibition d'HSP27 chez le rat à l'aide d'oligonucléotides antisens (OGX-427) protège 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 empêche également la migration des cellules mésothéliales pleurales transformées en myofibroblastes à l'intérieur du parenchyme pulmonaire. Cet effet s'explique par un rôle protecteur d'HSP27 sur le facteur de transcription Snail, indispensable à l'induction de l'EMT (Figure 46) (16). 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* induit la dégradation de Snail inhibant l'EMT et faisant d'HSP27 une nouvelle cible thérapeutique pour la FPI (407).

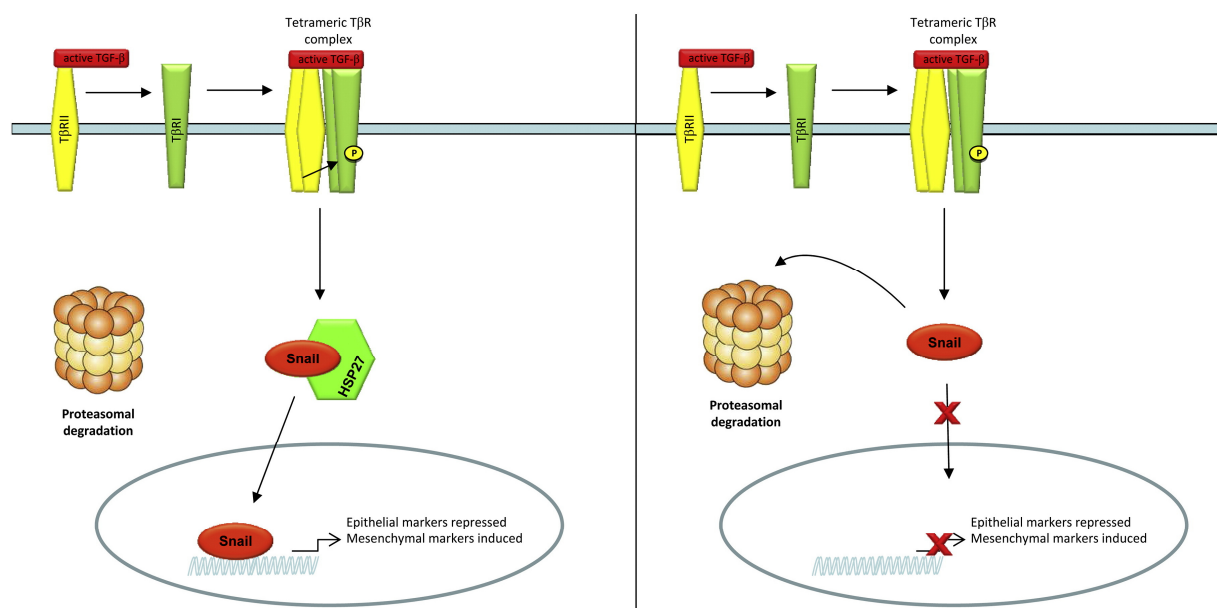


Figure 46. HSP27 stabilise le facteur de transcription Snail et favorise l'EMT. Gauche : HSP27 est capable de se lier à Snail pour empêcher sa dégradation par le protéasome. Après l'activation de la voie de signalisation du TGF- β 1, Snail devient nucléaire et induit la transcription des gènes de l'EMT. 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 (d'après Bellaye *et al.*, 2014 (16)).

E. α B-crystallin

Au niveau pulmonaire, α B-crystallin est surexprimée dans de nombreuses pathologies comme le cancer (408) et les maladies pulmonaires obstructives chroniques (409). Cependant, son rôle dans la fibrose reste peu documenté.

Dans un modèle de fibrose du foie, α B-crystallin est surexprimée rapidement après l'activation des HSCs (« hepatic stellate cells ») avec une localisation cytoplasmique puis

nucléaire en condition de choc thermique (410, 411). De manière intéressante, différentes études révèlent que l'expression d' α B-crystallin peut être induite par le TGF- β 1 (412, 413) et une étude par Huang *et al.* démontre un rôle de cette sHSP dans le processus d'EMT (414). Les auteurs montrent qu' α B-crystallin forme un complexe avec la protéine 14-3-3 ζ , la protégeant de la dégradation par le protéasome. Ceci se traduit par une augmentation de la quantité de protéine 14-3-3 ζ dans la cellule conduisant à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 (Figure 47). 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 (414). Ce processus, mis en évidence dans un modèle de carcinome hépatique pourrait avoir une importance particulière dans la fibrogenèse puisque l'EMT est également un processus clé de la fibrose pulmonaire.

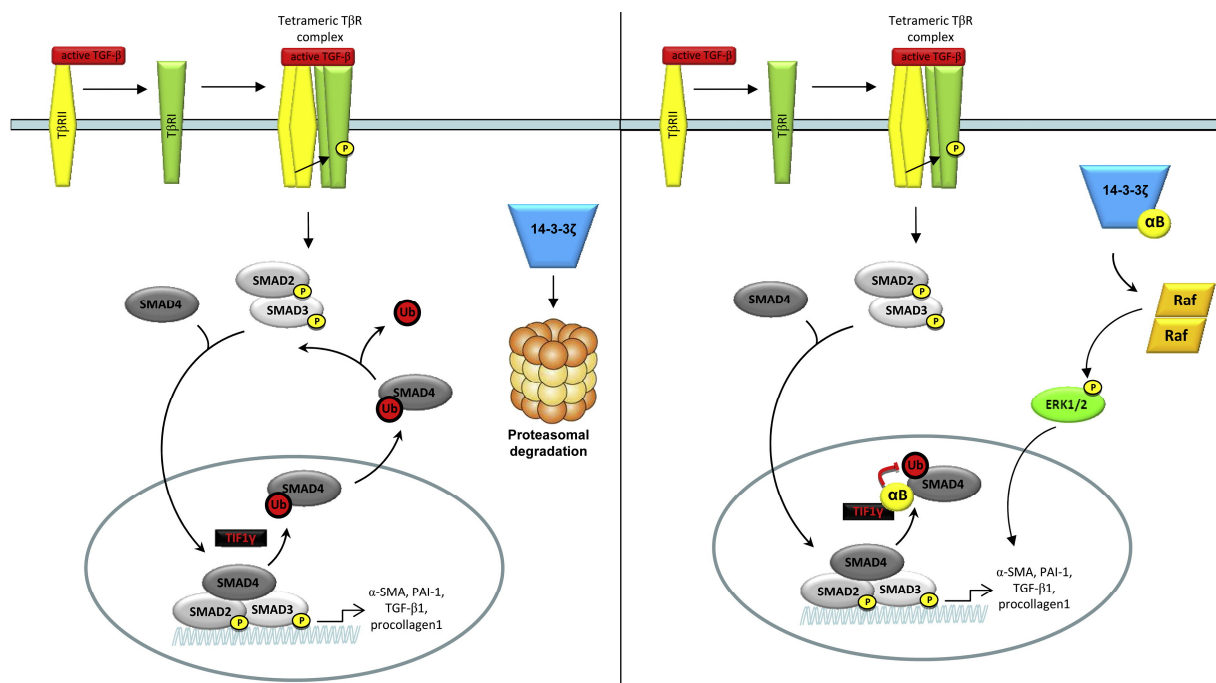


Figure 47. α B-crystallin favorise l'EMT en augmentant la voie du TGF- β 1. Gauche: En l'absence d' α B-crystallin la protéine 14-3-3 ζ est détruite par le protéasome et la E3 ubiquitine ligase TIF-1 γ ubiquitine Smad4 induisant son export nucléaire. Droite: α B-crystallin interagit avec la protéine 14-3-3 ζ permettant la dimérisation de Raf et la phosphorylation de ERK activant les gènes de l'EMT. En condition de stimulation par TGF- β 1, les Smad-2 et -3 phosphorylées se complexent avec Smad4 permettant la translocation nucléaire du complexe. α B-crystallin protège alors Smad4 de l'ubiquitination par TIF-1 γ , augmentant le temps de résidence nucléaire des Smad et entraînant une induction des effets pro-fibrosants de TGF- β 1 (d'après Bellay *et al.*, 2014 (16)).

Très récemment, notre équipe a mis en évidence un rôle clé d' α B-crystallin dans la fibrose pulmonaire (211). Cette petite protéine de stress est surexprimée dans les cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques et aussi au sein des foyers fibroblastiques dans les poumons de

patients atteints de FPI. De plus, α B-crystallin est surexprimée dans différents modèles de fibrose pulmonaire chez la souris. Les souris déficientes pour α B-crystallin montrent une production de TGF- β 1 altérée et sont protégées de la fibrose induite expérimentalement. Nous avons montré que cette action sur la voie du TGF- β 1 passe par la régulation de la localisation nucléaire de Smad4 (Figure 47), un point clé de la voie du TGF- β 1 (cf. II.4.3.C) (16). En effet, α B-crystallin protège Smad4 de l'ubiquitination par la E3 ubiquitine ligase TIF-1 γ , favorisant la localisation nucléaire de la co-Smad. Le temps de résidence accru de Smad4 dans le noyau augmente l'activité transcritionnelle des Smad et favorise donc les effets pro-fibrosants de TGF- β 1. Cette étude montre que l'inhibition d' α B-crystallin pourrait être une option thérapeutique dans la FPI.

VIII. Objectifs de la thèse

L'ensemble des travaux réalisés aux cours de cette thèse sur la toxicité de la bléomycine et de son point de départ sous-pleural a pour objectif d'apporter des connaissances pour avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu au cours du processus de fibrogenèse pulmonaire et mettre en évidence de nouvelles solutions thérapeutiques pour la prise en charge de patients atteints de fibrose pulmonaire, idiopathique ou liée à la toxicité de la bléomycine. Ce travail est articulé autour de plusieurs axes :

L'étude d' α B-crystallin comme nouvelle cible thérapeutique. Nous avons étudié les effets de l'inhibition d' α B-crystallin dans des modèles murins de fibrose pleuro-pulmonaire afin de mettre en évidence le potentiel thérapeutique de son inhibition sur l'initiation de la fibrose pulmonaire.

L'étude de l'importance de l'axe caspase-1/IL-1 β sur les cellules pleurales. Nous avons étudié les rôles de l'axe caspase-1/IL-1 β sur l'inflammation et l'activation des cellules pleurales dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

L'étude d'une forme déglycosylée de la bléomycine. Nous avons recherché dans différents modèles de cancer les effets anticancéreux d'une forme modifiée de la bléomycine avec en parallèle une étude de sa toxicité pulmonaire. A travers cette partie, nous nous sommes attachés à mettre en évidence l'implication de la caspase-1 dans la toxicité pulmonaire de la bléomycine au niveau des cellules épithéliales alvéolaires.

RESULTATS

I. Article 1. L'inhibition d' α B-crystallin a des effets anti-fibrotiques dans la fibrose pleuro-pulmonaire

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses études suggèrent que la plèvre et les cellules mésothéliales qui la composent ont un rôle important dans l'initiation de la FPI (257, 260, 261, 276, 407). Notre équipe a développé plusieurs modèles de fibrose pleuro-pulmonaire (261, 276). A l'aide de ces modèles, elle a montré que les cellules mésothéliales sont, en conditions pro-fibrosantes, capable de se transformer en cellules agressives pouvant acquérir un phénotype de myofibroblastes et migrer vers l'intérieur du parenchyme pulmonaire.

Le TGF- β 1 est le facteur clé du processus fibrosant et son action sur les cellules passe par la voie de signalisation des Smad. Un point de contrôle clé de cette voie réside dans la localisation nucléaire ou cytoplasmique de Smad4 qui est finement régulée. Nous avons récemment montré le rôle clé de la petite protéine de choc thermique α B-crystallin dans la régulation de la localisation subcellulaire de Smad4 (211). L'inhibition d' α B-crystallin diminuait la voie du TGF- β 1, interférant avec l'activation et la transformation des cellules épithéliales alvéolaires.

Dans ce travail, nous montrons la surexpression d' α B-crystallin au niveau des cellules mésothéliales pleurales sur des coupes de poumons de patients atteints de FPI. Des souris où l'expression d' α B-crystallin a été délétée (α B-crystallin^{-/-}) sont protégées de la fibrose pleuro-pulmonaire comparé à des souris « sauvages ». La migration des cellules pleurales dans les animaux α B-crystallin^{-/-} est diminuée dans ces modèles de fibrose pleuro-pulmonaire. *In vitro*, l'inhibition d' α B-crystallin est corrélée à une baisse de l'expression d' α -SMA induite par la bléomycine et interfère avec la capacité migratoire des cellules mésothéliales pleurales Met5A cultivées en présence de TGF- β 1.

Ce travail, dont je suis co-premier auteur, a donné lieu à une publication originale en 2015 dans le journal « *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* » (facteur d'impact : 4,08). Les travaux supplémentaires publiés en ligne sont présentés dans les annexes.

Antifibrotic Role of α B-Crystallin Inhibition in Pleural and Subpleural Fibrosis

Pierre-Simon Bellaye^{1,2*}, Olivier Burgy^{1,2*}, Julien Colas^{1,2}, Aurélie Fabre³, Joëlle Marchal-Somme⁴, Bruno Crestani^{4,5,6}, Martin Kolb⁷, Philippe Camus^{1,2,8}, Carmen Garrido^{1,2}, and Philippe Bonniaud^{1,2,8}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U866 Équipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Dijon, France; ²Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon, France; ³St. Vincent's University Hospital, Elm Park, Dublin, Ireland; ⁴INSERM U700, Paris, France; ⁵Université Paris Diderot, Pôles de Recherche et d'Enseignement Supérieur (PRES) Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁶Faculté de Médecine Bichat, Paris Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, Paris, France; ⁷Center for Gene Therapeutics, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada; and ⁸Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Dijon, France

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease characterized by myofibroblast proliferation and extracellular-matrix accumulation. IPF typically starts in subpleural lung regions, and recent studies suggest that pleural mesothelial cells play a role in the onset of the disease. The transition of mesothelial cells into myofibroblasts (mesothelio–mesenchymal transition) is induced by the profibrotic cytokine, transforming growth factor (TGF)- β 1, and is thought to play a role in the development and progression of IPF. The Mothers Against Decapentaplegic homolog (Smad)-dependent pathway is the main TGF- β 1 pathway involved in fibrosis. α B-crystallin is constitutively expressed in the lungs, and is inducible by stress, acts as a chaperon, and is known to play a role in cell cytoskeleton architecture. We recently showed that the lack of α B-crystallin hampered TGF- β 1 signaling by favoring Smad4 monoubiquitination and nuclear export. We demonstrate here, for the first time, that α B-crystallin is strongly overexpressed in the pleura of fibrotic lungs from patients with IPF and in rodent models of pleural/subpleural fibrosis. α B-crystallin-deficient mice are protected from pleural/subpleural

fibrosis induced by the transient adenoviral-mediated overexpression of TGF- β 1 or the intrapleural injection of bleomycin combined with carbon particles. We show that α B-crystallin inhibition hampers Smad4 nuclear localization in pleural mesothelial cells and the consequent characteristics of mesothelio–mesenchymal transition. α B-crystallin-deficient mesothelial cells fail to acquire the properties of myofibroblasts, thus limiting their migration *in vivo* and the progression of fibrosis in the lung parenchyma. 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.

Keywords: fibrogenesis; pleura; transforming growth factor- β 1; heat shock proteins; idiopathic pulmonary fibrosis

Clinical Relevance

This research highlights a new potential therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis focusing on pleural initiation of the disease.

The pleura can be the site of fibrotic diseases, commonly resulting in pleural disorders secondary to fibrotic responses from activated mesothelium. Exposure to asbestos (1), pleural reactions induced by drugs, such as ergots (2) or cyclophosphamide (3, 4), hemothorax or pneumothorax, and tuberculosis are among the most common causes of pleural fibrosis. Pleural and

(Received in original form January 9, 2014; accepted in final form July 12, 2014)

*These authors contributed equally to this work.

This work was supported by 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, by the EU 7th Framework Programme (2007–2013 agreement HEALTH-F2-2007-202224 eurIPFnet) (P.-S.B.), and le Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire" (FRSR) (P.-S.B., O.B.). C.G.'s team has the label from La Ligue National Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence (LabEx) Lipoprotéines et Santé (LipSTIC).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Philippe Bonniaud, M.D., Ph.D., Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, CHU le Bocage 21079 Dijon, France. E-mail: philippe.bonnaud@chu-dijon.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 52, Iss 2, pp 244–252, Feb 2015

Copyright © 2015 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2014-0011OC on July 17, 2014

Internet address: www.atsjournals.org

pulmonary fibrosis share several properties, and are characterized by excessive extracellular matrix deposition. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a disease with a poor prognosis and no effective treatment, typically starts in subpleural lung regions (5, 6). There is now some evidence that the pleura, and, in particular, mesothelial cells, may be involved in the initiation and the progression of IPF under profibrotic conditions. Our team first demonstrated that transforming growth factor (TGF)- β 1 overexpression in the pleural space of rats led to severe pleural fibrosis invading the lung parenchyma (7), as observed in the subpleural initiation of IPF. We later reproduced the same findings after the intrapleural injection of bleomycin (BLM) combined with carbon particles in mice (8). In both models, we showed, for the first time *in vivo*, that pleural mesothelial cells undergo a phenotypic transformation into myofibroblasts (mesothelio-mesenchymal transition [MMT]), and acquire the ability to migrate into the lung parenchyma, thus playing a potential role in IPF (7). Our hypothesis was reinforced by a recent study showing that, in lung biopsies of patients suffering from IPF, cells that were positive for calretinin, a marker of mesothelial cells, could be found in fibrotic areas not only beneath the pleura, but also within the lung (9).

Heat shock proteins (HSPs) are molecular chaperones involved in many essential cellular processes, such as apoptosis, cytokine induction, inflammation, and diseases of the cytoskeleton (10–16). HSPs have also been widely described as being involved in the pathogenesis of cancer (17) through their involvement in several molecular mechanisms of cancer cells, such as proliferation (18), invasiveness (19), and angiogenesis (20, 21). In several reports, HSPs appeared beneficial to cancer cells, and therefore harmful for patients affected by a wide range of cancer types (27).

We recently showed that inhibition of the small HSP, HSP27, favors the degradation of the transcription factor, Snail, thus limiting this fibroblastoid transformation of mesothelial cells (22). This inhibition was associated with beneficial effects on pleural and subpleural fibrosis (22).

The expression of α B-crystallin, another small HSP often related to HSP27,

is known to be enhanced by TGF- β 1 (23, 24). α B-crystallin plays a major role in cytoskeletal homeostasis, suggesting that it is involved in the cytoskeletal architecture of fibroblasts and myofibroblasts during the fibrogenesis process. Recently, we demonstrated in fibroblasts and in epithelial cells that α B-crystallin was able to abrogate Mothers Against Decapentaplegic homolog 4 (Smad4) monoubiquitination by transcription intermediary factor 1 γ (TIF1 γ) by disrupting formation of the TIF1 γ -Smad4 complex. We demonstrated that α B-crystallin enhances the nuclear localization of Smad4, further activating the TGF- β 1 pathway and subsequent fibrosis (25). As a consequence, α B-crystallin-deficient mice were protected from pulmonary fibrosis when profibrotic agents were administered intratracheally (BLM, TGF- β 1, and IL-1 β adenoviral-mediated gene overexpression [25]).

These findings led us to investigate the role of α B-crystallin in the pleura of patients with IPF and in our animal models of pleural/subpleural fibrosis. The present work highlights a potential role of the small HSP, α B-crystallin, in MMT, thus indicating that it may contribute to the subpleural initiation and parenchymal invasion of mesothelial cells in the IPF process.

Materials and Methods

Human Tissue Samples for Histology

Lung tissue samples were obtained by open lung biopsy (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U700, Paris). IPF ($n = 6$) was diagnosed according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society consensus criteria (6). Control non-IPF lung tissue samples ($n = 4$) were obtained from smokers. The local ethics committee approved the study, and patients gave their informed consent. Paraffin-embedded sections were stained with 1B6.1-3G4 anti- α B-crystallin (Enzo Life Sciences AG, Villeurbanne, France), anti-smooth muscle actin (α -SMA) (Abcam, Paris, France), and anti-calretinin (Cell Marque, Rocklin, CA). The Vectastain ABC-alkaline phosphatase kit system (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used. See the online supplement for more details.

Animal Procedures

SV129 wild-type (WT) mice (Charles River, Saint Germain-sur-l'Arbresle, France) and α B-crystallin knockout (KO) mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche (Paris, France). All experiments were approved by the Comité d'Ethique de l'Université de Bourgogne. Pleural/subpleural fibrosis was induced by the intrapleural instillation of adenovectors expressing TGF- β 1, AdTGF- β 1 (5×10^8 plaque-forming units) or BLM (20 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO)/carbon particles (carbon black 101, 90-nm diameter, 0.1 mg/mouse; Degussa, Frankfurt, Germany) as previously described (7, 8). Pleural lavage fluid was collected as previously described (26). Tissue samples from animals after the intrapleural injection of AdLacZ/AdTGF- β 1 or adenovirus expressing β -galactosidase/control adenovirus (AdLacZ/AdDL) were stained with β -galactosidase, as previously described (7). See the online supplement for further details.

Collagen Quantification

The amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was quantified by staining with Picrosirius red, as previously described (8). In the pleura, collagen was measured within a rectangle (constant length of 100 μ m, width depending on pleura thickness; $n = 5$ or 6 pictures/animal; 10 rectangles/picture have been studied). Collagen within subpleural areas was measured using circles (65- μ m diameter) randomly placed at a constant distance from the pleura. Collagen in the parenchyma was measured using 20 identical circles per section placed randomly throughout the parenchyma.

The sircol assay was performed on whole left lung lysates using a Sircol kit (Biocolor Ltd., Northern Ireland, UK).

Cell Culture and Small Interfering RNA

Met5A lung mesothelial cells (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) were grown as monolayers in Med199 (Lonza, Paris, France), supplemented with 10% of FBS (Lonza). α B-crystallin small interfering RNA (siRNA) (Applied Biosystem, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) sense and antisense sequences were transfected using

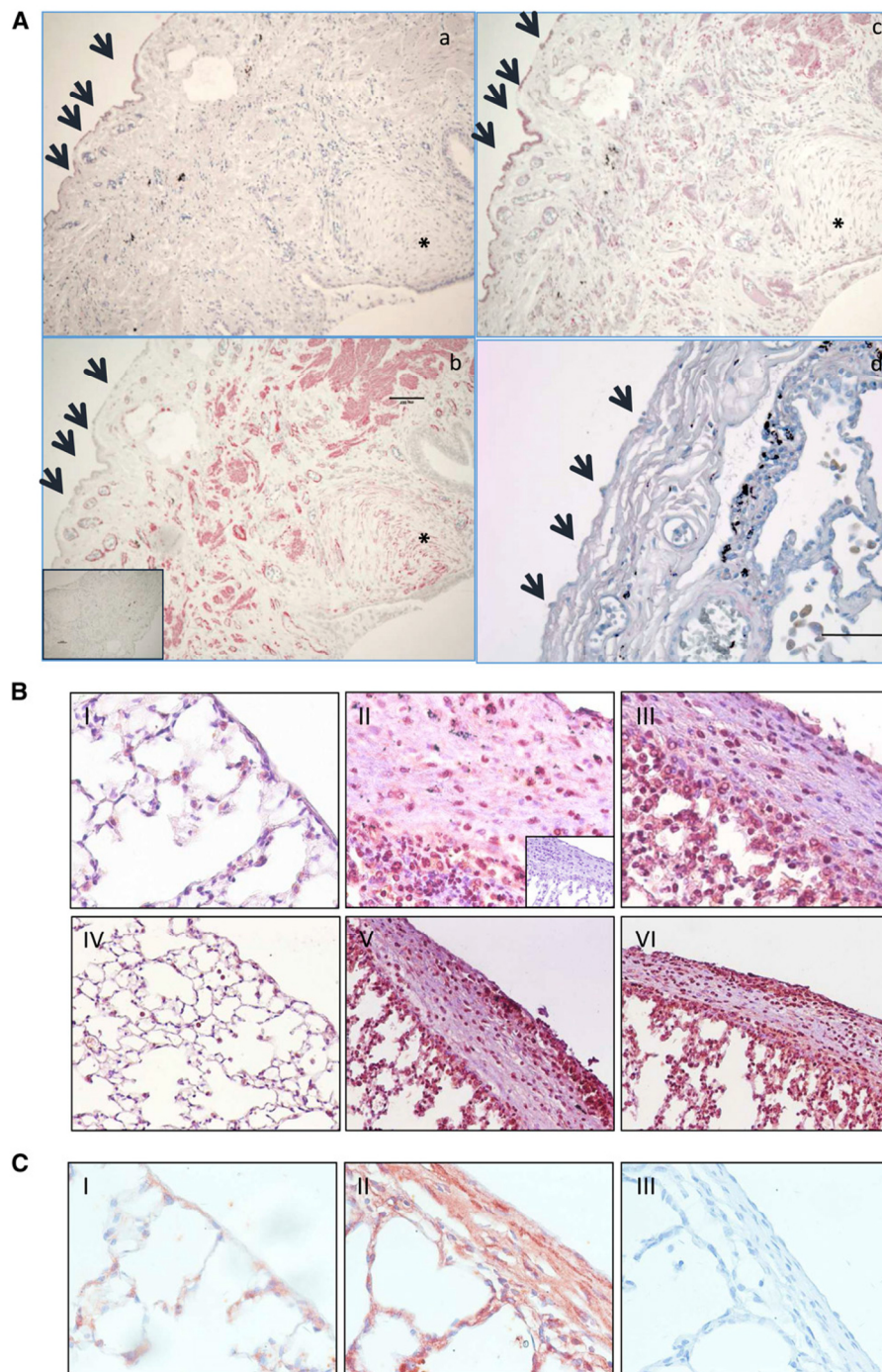


Figure 1. α B-crystallin is expressed in the pleura of fibrotic lungs. (A) Pleural mesothelial cells (arrows) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lungs with fibroblastic focus (asterisk): (a) calretinin; (b) α -smooth muscle actin (α -SMA) (inset, IgG); (c) α B-crystallin (magnification, 10 \times); (d) α B-crystallin in a representative control patient (20 \times); scale bar, 100 μ m. (B) α B-crystallin immunohistochemistry on lung tissues from mice that received intrapleural injection of either NaCl (I and IV) or bleomycin (BLM) combined with carbon particles (II, III, V, and VI). Representative images obtained at Day 10 after adenovirus administration are shown. (Inset) Negative controls using IgG1 antibody ($n = 5$; magnification, I, II, III, 400 \times , and IV, V, VI, 200 \times). (C) α B-crystallin immunohistochemistry on lung tissues from mice that received an intrapleural injection of either a control adenovirus (AdDL, I) or the transforming growth factor (TGF)- β 1-encoding adenovirus (AdTGF- β 1, II and III). A representative image obtained at Day 10 after injection of the adenovirus is shown (magnification, 200 \times). (III) Negative controls using IgG1 antibody.

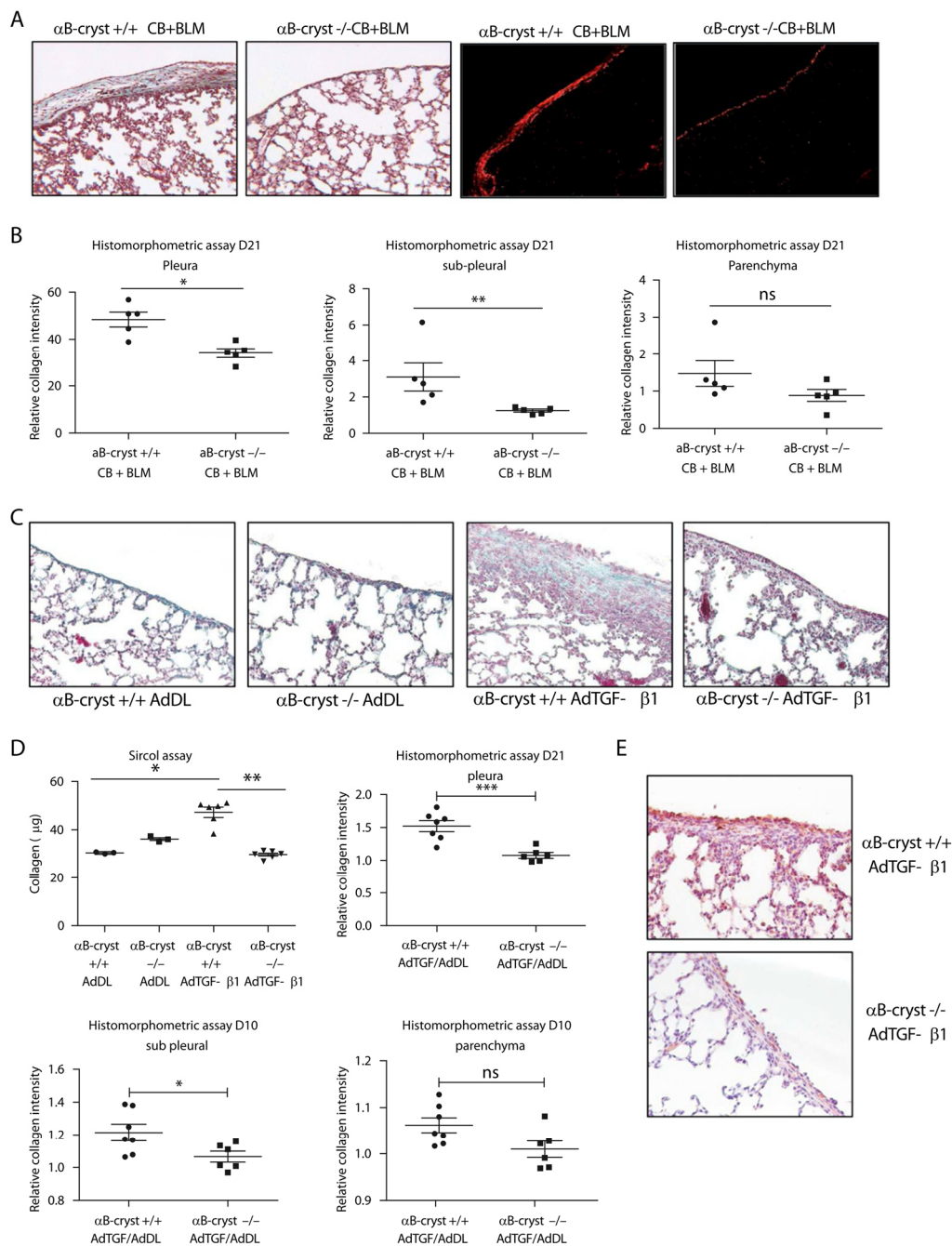


Figure 2. α B-crystallin knockout (KO) mice are protected from BLM/CB-induced pleural fibrosis. (A) Representative histology (left panel) of wild-type (WT) and α B-crystallin KO mice lungs 21 days after intrapleural injection of NaCl or BLM/CB. Masson's trichrome staining; magnification, 200 \times . (*n* = 5). Polarized light photography of lung sections stained with Picosirius red (right panel) from WT and KO mice at Day 21. Representative images are shown (*n* = 5; magnification, 200 \times). (B) Collagen quantification using a histomorphometric method in lungs from WT and KO mice at Day 21. Mean \pm SEM; **P* \leq 0.05, ***P* \leq 0.01; *n* = 5/group. Measurements were made on the pleural, subpleural, and parenchyma areas. (C) Representative histology of WT and α B-crystallin KO mice lungs 10 days after intrapleural injection of AdTGF- β 1 or AdDL (control). Masson's trichrome staining; magnification, 200 \times (*n* = 6). Representative images are shown. (D) Collagen quantification using a Sircol assay on whole-lung extract and a histomorphometric method in lungs from WT and KO mice at Day 10. Mean \pm SEM; **P* \leq 0.05, ***P* \leq 0.01, ****P* < 0.001; *n* = 6/group. Histomorphometric measurements were made on the pleura, the subpleural area, and the parenchyma. (E) Heat shock protein (HSP) 47 staining on lung sections from WT and KO mice 10 days after intrapleural injection of AdTGF- β 1. Representative images are shown (*n* = 5; magnification, 200 \times). α B-cryst, α B-crystallin; CB, carbon black; ns, not significant.

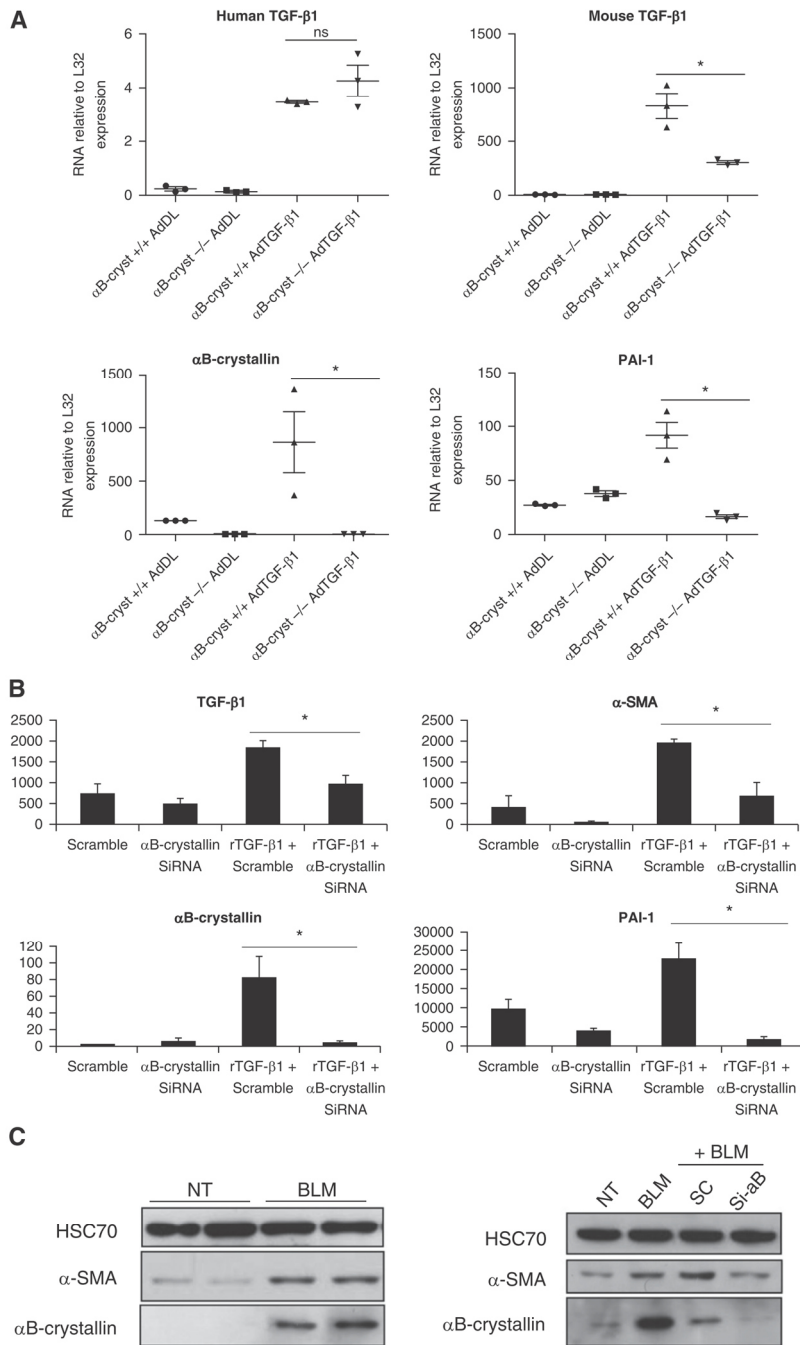


Figure 3. The lack of α B-crystallin KO impairs the TGF- β 1 pathway *in vivo* and *in vitro*. (A) RNA levels of human and mouse TGF- β 1, mouse plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and mouse α B-crystallin were analyzed by quantitative PCR on lung tissues from WT and KO mice 10 days after intrapleural injection of AdTGF- β 1 or AdDL. Mean \pm SEM; * $P \leq 0.05$; $n = 3$ /group. (B) RNA levels of α B-crystallin, TGF- β 1, α -SMA, and PAI-1 were analyzed by quantitative PCR after recombinant TGF- β 1 (rTGF- β 1) treatment, where indicated, 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. (C) α -SMA and α B-crystallin expression were analyzed by Western blot in Met5A cells left untreated, treated with BLM and transfected where indicated by a scramble siRNA, or a specific α B-crystallin siRNA. HSC70 served as a loading control.

INTERFERin (Polyplus, Illkirch, France). See the online supplement for further details.

Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA from Met5A cells was extracted using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). 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). See the online supplement for further details.

Immunohistochemistry

α B-crystallin (Enzo life science), HSP47 (Enzo life science), and α -SMA (Abcam) antibody were used for immunohistochemistry. See the online supplement for further details.

Wound Closure and Proliferation Assay

When Met5A cells were confluent, a wound was made in the middle of the culture with the tip of a needle. Pictures were taken immediately after the scratch and 48 hours after recombinant TGF- β 1 (rTGF- β 1) treatment (Zeiss, Oberkochen, Germany). See the online supplement for further details.

Statistical Analysis

The different groups were compared using the Mann-Whitney test implemented with StatView software (Cary, NC). P values below 0.05 were considered statistically significant. All results are representative of at least three different experiments.

Results

α B-crystallin Is Expressed in the Murine and Human Pleura of Fibrotic Lungs

Histological examination of lung sections from patients affected by IPF showed that α B-crystallin was up-regulated in the pleura of fibrotic lungs. Indeed, pleural mesothelial cells, marked by calretinin, strongly expressed α B-crystallin (Figure 1A). In contrast, α B-crystallin was barely detected in pleura from patients without IPF. This result was confirmed using rodent models of pleural/subpleural fibrosis already developed by our team based on the intrapleural injection of adenoviruses encoding TGF- β 1 (7) or BLM combined with carbon particles (8).

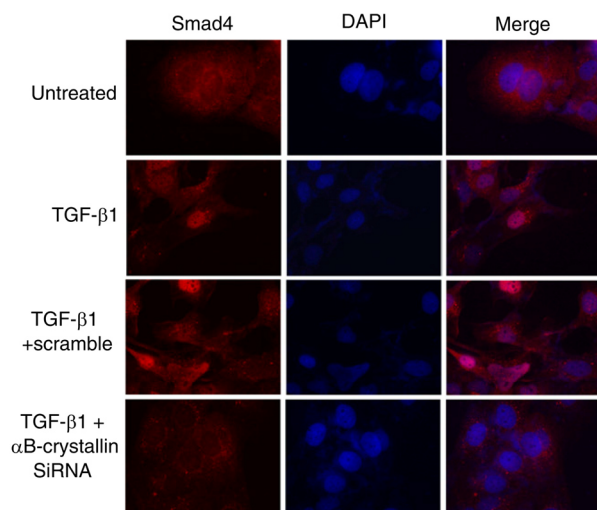


Figure 4. The lack of α B-crystallin impairs nuclear localization of Mothers Against Decapentaplegic homolog (Smad). The cellular localization of Smad4 was determined by immunofluorescence in Met5A cells transfected with an α B-crystallin-specific siRNA or scrambled siRNA (control) and/or treated with rTGF- β 1. Representative images are shown ($n = 4$). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

We observed that pleural fibrosis formation correlated with a significant increase in α B-crystallin expression (Figures 1B–1C). α B-crystallin was strongly expressed in animals that received AdTGF- β 1 or BLM combined with carbon particles, whereas no expression of α B-crystallin was observed in control animals, which had been given injections of an empty adenovirus (AdDL) or NaCl, respectively, and did not develop pleural/subpleural fibrosis (Figures 1B–1C).

α B-Crystallin KO Mice Are Protected from BLM-/Carbon Particle-Induced Pleural Fibrosis

As expected, an intrapleural injection of BLM combined with carbon particles (CB + BLM), our established model of pleural/subpleural fibrosis in mice (8, 27), induced strong pleural and subpleural fibrosis in WT mice (Figure 2A). As previously described, fibrosis induction by intrapleural injection of BLM first led to the establishment of pleural fibrosis (7). The distribution of the fibrotic response, in this model, is bilateral and homogenous, due to anatomical connections between the right and left pleural space in rodents. Lung sections from WT and KO mice receiving both CB and BLM showed that the pleural fibrosis in α B-crystallin-deficient mice was less

severe than that in WT mice at Day 21 (Figure 2A). This observation was confirmed by collagen quantification using histomorphometric measurements. Collagen deposition in the pleura of WT mice was significantly greater than that in KO mice (1.5 times greater; Figure 2B). Furthermore, the amount of collagen in the subpleural area of WT mice was also significantly greater than that in the subpleural area of KO mice after CB plus BLM injections (2.5 times greater; Figure 2B). The accumulation of collagen in the parenchyma of KO mice was not significantly different from that in WT mice (Figure 2B). Thus, CB plus BLM-induced pleural fibrosis invaded the subpleural area of WT mice to a greater extent than in KO mice, but did not lead to an accumulation of collagen in the parenchyma at Day 21.

α B-Crystallin KO Mice Are Protected from AdTGF- β 1-Induced Pleural Fibrosis

To confirm our results, we used another pleural fibrosis model based on the intrapleural injection of AdTGF- β 1 in mice. We have already described this model in rats (7), but this is the first time that it has been used in mice. In this model, α B-crystallin was overexpressed in the pleural and subpleural areas of mice that received AdTGF- β 1 compared with control AdDL

mice (see Figure E1 in the online supplement). In addition, WT mice developed severe pleural fibrosis after the injection of AdTGF- β 1, whereas mice receiving control AdDL did not (Figure 2C). The pleural fibrosis induced by AdTGF- β 1 in α B-crystallin null mice was far less severe than that in WT mice (Figure 2C). An ELISA assay on pleural lavage fluid 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 E2). We then investigated collagen deposition in WT and KO mice using two collagen quantification methods: histomorphometry and Sircol assay. Both methods confirmed higher levels of collagen accumulation in WT mice receiving AdTGF- β 1 than in control (AdDL) WT mice (histomorphometry and Sircol: 1.52 and 1.56 times greater, respectively; Figure 2D). This increase in collagen was not found in mice that lacked α B-crystallin (histomorphometry and Sircol: 1.08 and 0.81 times greater, respectively, compared with control AdDL KO mice; Figure 2D). The higher accumulation of collagen in WT compared with KO mice was also found in the subpleural area, but not in the deeper parenchyma (Figure 2D).

We demonstrated that HSP47, the chaperon of collagen, was also significantly greater in the pleura of WT mice than in KO mice after the intrapleural injection of AdTGF- β 1 (Figure 2E).

The Lack of α B-Crystallin Impairs the TGF- β 1 Signaling Pathway

We showed that the lack of α B-crystallin inhibited the expression of several TGF- β 1 downstream genes, such as plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and endogenous TGF- β 1 itself *in vivo* during pleural fibrosis (Figure 3A). In α B-crystallin-deficient mice, PAI-1 and endogenous TGF- β 1 RNA were up-regulated to a lesser degree compared with WT mice (0.5-fold increase and 70-fold increase, respectively, for KO mice, and 3.5-fold increase and 300-fold increase, respectively, for WT mice; Figure 3A) after the intrapleural injection of AdTGF- β 1. This endogenous TGF- β 1 overexpression suggests a direct effect of α B-crystallin in the autoinduction loop of TGF- β 1.

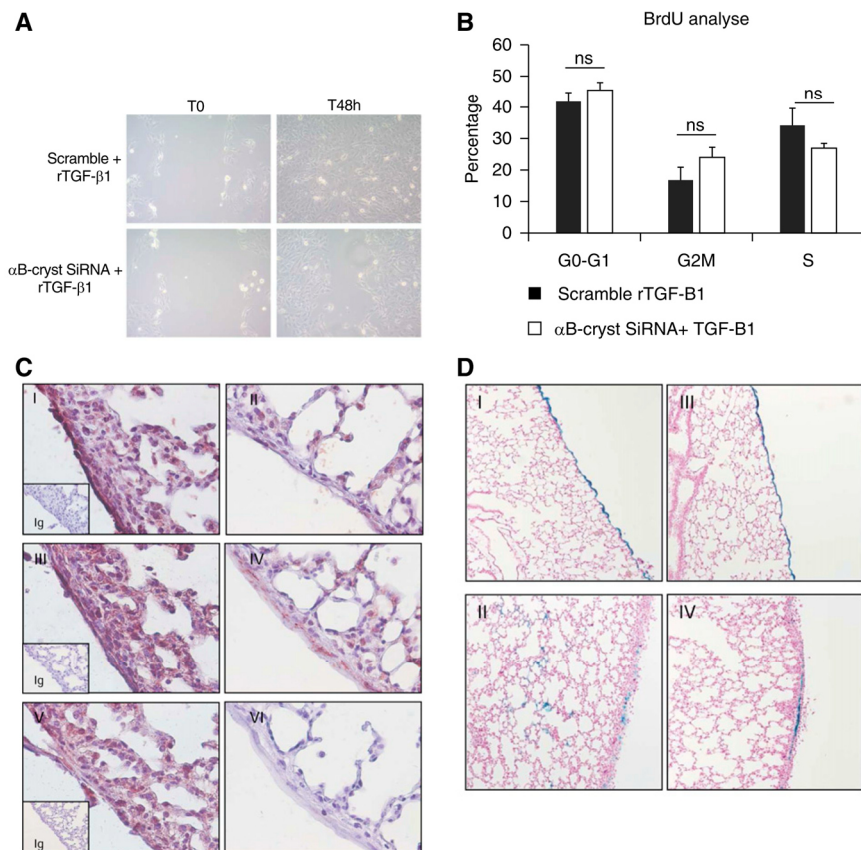


Figure 5. The lack of α B-crystallin impairs pleural cell migration *in vivo*. (A) Scratch test performed on Met5A cells transfected with an α B-crystallin-specific siRNA or scrambled siRNA (control) and treated with rTGF- β 1. Representative images at 0 and 48 hours are shown ($n = 4$). Magnification, 100 \times . (B) Bromodeoxyuridine (BrdU) test showing no effect of α B-crystallin inhibition on cell proliferation at 48 hours ($n = 3$). (C) Calretinin (I and II), α -SMA (III and IV), and α B-crystallin (V and VI) immunohistochemistry on lung tissues from WT mice (I, III, and V) and KO mice (II, IV, and VI) that received the TGF- β 1 encoding adenovirus (AdTGF- β 1) intrapleurally. Representative images obtained at Day 10 after adenovirus injections are shown ($n = 5$; magnification, 400 \times). Ig controls are presented in inserts. (D) Pleural cells were labeled in lungs from WT (I and II) and KO (III and IV) mice treated with AdDL (I and III) and AdTGF- β 1 (II and IV) at Day 10, with β -galactosidase using intrapleural injection of adenovirus expressing β -galactosidase (AdLacZ) combined with intrapleural injection of AdTGF- β 1 to induce pleural fibrosis. Representative pictures are shown ($n = 5$; magnification, 100 \times).

We confirmed these results *in vitro* on Met5A pleural mesothelial cells. In α B-crystallin-deleted cells (using RNA interference against α B-crystallin; Figure E3), 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 3B). Indeed, the known ability of TGF- β 1 to up-regulate α -SMA in mesothelial cells (22) was countered by α B-crystallin inhibition (Figure 3B).

Furthermore, α B-crystallin was up-regulated *in vitro* in human mesothelial cells treated with BLM in correlation with α -SMA up-regulation (Figure 3C),

suggesting that mesothelial cells acquired a myofibroblastic phenotype. The inhibition of α B-crystallin by a specific siRNA was able to counter the BLM-induced α -SMA up-regulation (Figure 3C) in mesothelial cells.

α B-crystallin has already been shown to inhibit Smad4 nuclear export by inhibiting Smad4 monoubiquitination by TIF1 γ , thus favoring the TGF- β 1 signaling pathway in lung epithelial cells and fibroblasts (25). Here, we showed that α B-crystallin inhibition in Met5A pleural mesothelial cells hampers the rTGF- β 1-induced nuclear localization of Smad4 (Figure 4). A similar result was found using primary mesothelial

cells from WT and KO mice (Figure E4). After rTGF- β 1 treatment, Smad4 was located in the nucleus of WT primary mesothelial cells, whereas Smad4 was excluded from the nucleus of α B-crystallin-deficient primary mesothelial cells. Therefore, we concluded from these results that α B-crystallin, as in epithelial cells and fibroblasts, plays a direct role in the TGF- β 1 signaling pathway.

The Lack of α B-Crystallin Impairs Pleural Cell Migration

Mesothelial cells undergoing MMT are known to be able to invade the lung parenchyma during pleural fibrosis induced by TGF- β 1. In line with our hypothesis, we showed that the down-regulation of α B-crystallin limited the migration of mesothelial cells *in vitro* (Figure 5A) without affecting cell proliferation (Figure 5B).

In vivo, the intrapleural injection of AdTGF- β 1 induced an up-regulation of α -SMA and α B-crystallin in the pleural area of WT mice. This up-regulation was barely detectable in KO mice. In this model, calretinin-positive cells (pleural mesothelial cells) also expressed α -SMA and α B-crystallin, and were located not only in the pleura, but also in the subpleural areas in WT mice (Figure 5C). In contrast, in KO mice, calretinin-positive cells were more likely to remain in the pleura (Figure 5C).

To further investigate mesothelial cell fate and migration *in vivo*, mesothelial cells were labeled with β -galactosidase (blue staining) using the intrapleural injection of AdLacZ in association with AdTGF- β 1 to induce pleural fibrosis. We demonstrated that the invasion of the lungs by pleural cells was largely impaired at Day 10 in α B-crystallin-deficient mice in comparison with WT mice after the induction of pleural fibrosis (Figure 5D).

Discussion

In this study, we demonstrate, for the first time, that α B-crystallin is strongly overexpressed in pleural mesothelial cells of patients with IPF. In addition, α B-crystallin is also strongly overexpressed in our pleural/subpleural fibrosis models in mice. We provide evidence that the lack of α B-crystallin has a protective effect on pleural and subpleural fibrosis *in vivo*. *In vitro*, we highlight a mechanism by which α B-crystallin favors the TGF- β 1 pathway via subsequent modulation of the cellular localization of Smad4 in mesothelial

cells. In our models, α B-crystallin down-regulation limited mesothelial cell MMT *in vitro* and hampered their migration *in vivo*.

The potential role of pleural mesothelial cells in pulmonary fibrosis is suggested by the initiation and progression of IPF from lung subpleural areas. During the process of lung fibrosis, mesothelial cells are not quiescent. It has been shown in animal models that they proliferate in response to various stimuli (28), and that they overexpress collagen, suggesting their involvement in fibrotic processes (29). The ability of cells to undergo a phenotypic transformation has been widely studied in cancer and fibrotic disease. In the process of pulmonary fibrosis, alveolar epithelial cells may transform into myofibroblasts in a process named epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). This plasticity of epithelial cells via EMT in IPF is very difficult to assess and prove *in vivo*, and there has been much debate on the importance of this process in recent literature (30). Our team was the first to demonstrate *in vivo* that mesothelial cells are able to undergo MMT, a process similar to EMT. We have shown that mesothelial cells migrate into the lung parenchyma in rodents in pleural/subpleural fibrosis models based on pleural TGF- β 1 overexpression or the combined injection of BLM and carbon nanoparticles (7, 8). The recent study by Mubarak and colleagues showing the presence of calretinin-positive cells within the fibrotic parenchyma of patients with IPF reinforces this hypothesis (9). Interestingly, in their study, the number of mesothelial cells found in lung parenchyma correlated with the severity of the disease (9). The same group further strengthened the hypothesis that mesothelial cells are involved in IPF by showing the presence of WT-1 (another specific mesothelial cell marker) –positive cells in the lung tissue of patients with IPF. They further demonstrated that the inhibition of WT-1 decreased TGF- β 1-induced fibrosis in a rodent model (31). Therefore, mesothelial cells and their

modulation during the IPF process could be a new therapeutic target to counter the initiation of pulmonary fibrosis and limit its progression. In this work, we demonstrate *in vivo* and *in vitro* that α B-crystallin inhibition prevents pleural mesothelial cell MMT and migration into the parenchyma in our rodent models of pleural/subpleural fibrosis. This impact of α B-crystallin inhibition in combination with its role in TGF- β 1 signaling inhibition in lung epithelial cells and fibroblasts, as we have recently shown (25), suggests that α B-crystallin acts at different cellular sites, and might be a new therapeutic target during the early phase of IPF progression.

In our *in vivo* models of pleural fibrosis, we have shown that the activation of mesothelial cells and the accumulation of collagen, first occurring in the pleura, invaded the subpleural areas of the lungs, but were limited in the deep parenchyma. The transformation and migration of pleural mesothelial cells might be responsible for the initiation of lung fibrosis, and the profibrotic environment caused by mesothelial cell activation might eventually lead to lung epithelial cell and fibroblast differentiation, resulting in fibrosis progression and parenchymal collagen deposition, hallmarks of lung fibrosis. In human fibrotic lungs, we showed a strong up-regulation of α B-crystallin in mesothelial cells. However, in lung sections from patients affected by IPF, it was not possible to detect mesothelial cells in subpleural areas. Differences in immunoreactivity patterns for calretinin and α B-crystallin between human IPF samples and our murine model of pleural/subpleural fibrosis might be explained by the temporal difference in the course of fibrosis in these species. Although murine fibrosis is recent, probably with a degree of plasticity from recent fibroblastic and myofibroblastic cellular activity, human fibrosis in IPF is more ancient and well established, with less cellular activity outside the fibroblastic foci and with more collagen. Another hypothesis is that MMT is a

transient state, and that only a few cells, depending on the detection techniques and the antibodies used, can be found in human lungs compared with fibrotic murine lungs.

Mechanisms involving the chaperon, HSP27, and α B-crystallin are not identical. We have recently shown that mesothelial cells from patients with IPF strongly overexpress HSP27, and that the intrapleural administration of an inhibitor of HSP27 blocks the progression of TGF- β 1-induced fibrosis in a rat model of pleural/subpleural fibrosis by favoring the degradation of the transcription factor, Snail, thus inhibiting subsequent MMT (22). We demonstrate here that α B-crystallin deficiency interferes with the TGF- β 1 pathway through the nuclear inhibition of Smad4 in mesothelial cells, thus inhibiting the profibrotic activity of this key cytokine. HSP27 and α B-crystallin are two closely related proteins that have been shown to be colocalized in many organs in normal and pathological conditions. Some publications even report a synergistic role of these two small HSPs, which are able to interact with each other (32). It has also been demonstrated that HSP27 prevented structural changes and aggregation of α B-crystallin induced by heat shock, and thus may play a role in its stabilization (33). It has also been suggested that hetero-oligomers could be formed between HSP27 and α B-crystallin (34). Therefore, targeting both HSP27 and α B-crystallin might be of great interest in preventing the initiation of fibrotic lung disorders when patients are exposed to a known high-risk profibrotic agent (i.e., radiation, chemotherapy), or even to treat the progression of established fibrotic disease, as in patients with IPF. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgments: The authors thank V. Saint Giorgio and the team from the animal quarter, and A. Bouchot and the team from Cellimap for their invaluable and professional help. They also thank Philip Bastable for correcting the early form of the manuscript.

References

- Huggins JT, Sahn SA. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology* 2004;9:441–447.
- 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.
- Hamada K, Nagai S, Kitaichi M, Jin G, Shigematsu M, Nagao T, Sato A, Mishima M. Cyclophosphamide-induced late-onset lung disease. *Intern Med* 2003;42:82–87.
- Malik SW, Myers JL, DeRemee RA, Specks U. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use. Two distinct patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1851–1856.
- 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* 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, *et al.*; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:788–824.
 7. Decolgne 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. Decolgne 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. *Eur Respir J* 2010;35:176–185.
 9. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, Hensel E, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, *et al.* Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2012;39:133–140.
 10. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000;2:469–475.
 11. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000;2:645–652.
 12. Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C, *et al.* Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(172):171–198.
 13. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000;2:476–483.
 14. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000;6:435–442.
 15. Tamura Y, Torigoe T, Kutomi G, Hirata K, Sato N. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Curr Mol Med* 2012;12:1198–1206.
 16. Wettstein G, Bellaye PS, Micheau O, Bonniaud P. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1680–1686.
 17. Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013;332:275–285.
 18. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008;283:5188–5194.
 19. Lemieux P, Oesterreich S, Lawrence JA, Steeg PS, Hilsenbeck SG, Harvey JM, Fuqua SA. The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis* 1997;17:113–123.
 20. Sanderson S, Valenti M, Gowan S, Patterson L, Ahmad Z, Workman P, Eccles SA. Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2006;5:522–532.
 21. Thuringer D, Jego G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, Hébrard S, Bouchot A, Hazoumé A, Joly AL, *et al.* Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J* 2013;27:4169–4183.
 22. Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, Marchal-Somme J, Hazoume A, Gauldie J, Gunther A, *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 2013;27:1549–1560.
 23. Welge-Lüssen U, May CA, Eichhorn M, Bloemendal H, Lütjens-Drecoll E. AlphaB-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2235–2241.
 24. Yu AL, Fuchshofer R, Birke M, Priglinger SG, Eibl KH, Kampik A, Bloemendal H, Welge-Lussen U. Hypoxia/reoxygenation and TGF-beta increase alphaB-crystallin expression in human optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res* 2007;84:694–706.
 25. Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, Besnard V, Joannes A, Colas J, Causse S, Marchal-Somme J, Fabre A, Crestani B, *et al.* The small heat-shock protein alphaB-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. *J Pathol* 2014;232:458–472.
 26. 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.
 27. Tucker TA, Jeffers A, Alvarez A, Owens S, Koenig K, Quaid B, Komissarov AA, Florova G, Kothari H, Pendurthi U, *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency augments visceral mesothelial organization, intrapleural coagulation, and lung restriction in mice with carbon black/bleomycin-induced pleural injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:316–327.
 28. Adamson IY, Bakowska J, Bowden DH. Mesothelial cell proliferation: a nonspecific response to lung injury associated with fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:253–258.
 29. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003;63:1530–1539.
 30. Rock JR, Barkauskas CE, Cronce 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:E1475–E1483.
 31. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, Ye T, Thannickal VJ, Antony VB. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J* 2014;28:1122–1131.
 32. MacIntyre DA, Tyson EK, Read M, Smith R, Yeo G, Kwak K, Chan EC. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology* 2008;149:245–252.
 33. Fu L, Liang JJ. Enhanced stability of alpha B-crystallin in the presence of small heat shock protein Hsp27. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:710–714.
 34. Aquilina JA, Shrestha S, Morris AM, Ecroyd H. Structural and functional aspects of hetero-oligomers formed by the small heat shock proteins alphaB-crystallin and HSP27. *J Biol Chem* 2013;288:13602–13609.

L'initiation et la progression de la FPI depuis les zones pulmonaires sous-pleurales suggèrent un rôle des cellules mésothéliales dans la fibrose pulmonaire. Durant ce processus de fibrose pulmonaire, ces cellules mésothéliales ne sont pas quiescentes. Leur prolifération en réponse à divers stimuli a été montré dans plusieurs modèles animaux (415). Elles sont alors capables de produire du collagène, suggérant leur rôle dans le processus fibrosant (416). Dans la FPI, Mubarak *et al.* ont montré que des cellules mésothéliales peuvent se retrouver dans le parenchyme pulmonaire (257). Cette présence est corrélée avec un mauvais pronostic.

Les HSP sont largement étudiées dans différents processus impliqués dans les maladies fibrosantes et semblent être des régulateurs importants de la voie du TGF- β 1 (16). Notre équipe a déjà caractérisé le rôle d'HSP27, une autre petite HSP surexprimée dans les cellules mésothéliales, dans le contexte de la FPI (407). L'inhibition pharmacologique d'HSP27 est capable d'inhiber la fibrose induite par injection intra-pleurale d'AdTGF- β 1 chez le rat. Récemment, nous avons montré le potentiel anti-fibrotique de l'inhibition d' α B-crystallin dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire (211). Dans cette étude, nous avons observé que le rôle pro-fibrosant d' α B-crystallin passe par une action directe sur la voie du TGF- β 1. En effet, α B-crystallin protège Smad4 de l'ubiquitinylation par TIF-1 γ dans le noyau de cellules structurales pulmonaires (épithéliales alvéolaires ou fibroblastes), augmentant les effets de la stimulation du TGF- β 1.

Dans le travail présent, nous montrons que l'inhibition d' α B-crystallin interfère avec deux processus impliqués dans la fibrose pulmonaire : la transformation des cellules mésothéliales pleurales et la migration de ces cellules vers le parenchyme.

Ces résultats laissent penser que l'inhibition d' α B-crystallin pourrait déboucher sur une option thérapeutique dans les maladies fibrosantes, chez les patients atteints de FPI ou chez les patients cancéreux développant une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

II. Article 2. L'inhibition pleurale de l'axe caspase-1/IL-1 β diminue la toxicité pro-fibrotique de la bléomycine

La signalisation caspase-1/IL-1 β est un axe important du phénomène d'inflammation. La surexpression d'IL-1 β au niveau pulmonaire est capable d'induire une forte réaction fibrosante. De la même manière, des souris déficientes pour l'expression de protéines impliquées dans la signalisation ou l'activation de l'IL-1 β sont protégées de la fibrose induite par la bléomycine.

L'inflammation est un processus largement impliqué dans les premières phases d'initiation des réactions fibrosantes. Nous avons vu dans le chapitre précédant que l'activité pro-fibrosante des cellules mésothéliales peut être médiée par leur plasticité permettant d'acquérir un phénotype de myofibroblastes producteurs de collagène dans le poumon. Cependant la participation de la plèvre et des cellules mésothéliales pleurales dans le processus d'inflammation, phénomène important dans l'initiation de la réaction fibrosante, n'est pas documentée.

Dans ce travail, nous confirmons, dans un modèle de fibrose pleuro-pulmonaire basé sur des injections intraveineuses répétées de bléomycine, l'implication des cellules mésothéliales. Ces cellules migrent vers l'intérieur du parenchyme pulmonaire en parallèle de l'accumulation de collagène observée. Nous mettons en évidence dans ce modèle une activation de la caspase-1 observée au niveau des cellules localisées à la plèvre et dans les régions sous-pleurales. Dans ce modèle, nous soulignons l'importance de l'axe caspase-1/IL-1 β . Dans notre modèle animal, l'inhibition au niveau pleural de l'IL-1 β diminue la surexpression de TGF- β 1 et l'accumulation de collagène induite par la bléomycine. *In vivo*, l'activation de la caspase-1 par injection intra-pleurale de nigéricine induit une réaction fibrosante au niveau de la plèvre. *In vitro*, l'activation de la caspase-1 entraîne une transformation des cellules mésothéliales pleurales Met5A et son inhibition interfère avec l'EMT induite par la bléomycine ou le TGF- β 1.

Ce travail, dont je suis premier auteur, a été accepté pour publication dans le journal « *Respiratory Research* » (facteur d'impact : 3,75). Les travaux supplémentaires soumis pour publication en ligne sont présentés dans les annexes.

Pleural inhibition of the caspase-1/IL-1 β pathway diminishes profibrotic lung toxicity of bleomycin.

Running title: Caspase-1 blockade hampers bleomycin lung toxicity

Authors: Olivier Burgy^{*}, Pierre-Simon Bellaye^{*}, Sebastien Causse^{*}, Guillaume Beltramo^{*,†}, Guillaume Wettstein^{*}, Pierre-Marie Boutanquoi^{*}, Françoise Goirand^{*}, Carmen Garrido^{*,§}, Philippe Bonniaud^{*,†}.

Affiliations: ^{*} INSERM, LNC UMR866, LipSTIC LabEx team, Université Bourgogne Franche-Comté 21000, Dijon, France, [†] Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre Hospitalo-Universitaire de Bourgogne, 21000, Dijon, France, [§] Anticancer Centre Georges François Leclerc, CGFL, 21000, Dijon, France.

Corresponding author:

Philippe Bonniaud, MD, PhD. Hôpital Universitaire François Mitterrand, Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, 21000, Dijon, France. Tél : +33 3 80 29 32 63.
E-mail : philippe.bonniaud@chu-dijon.fr

Abstract

Background: Idiopathic and toxic pulmonary fibrosis are severe diseases starting classically in the subpleural area of the lung. It has recently been suggested that pleural mesothelial cells acquire a myofibroblast phenotype under fibrotic conditions induced by TGF- β 1 or bleomycin. The importance and role of inflammation in fibrogenesis are still controversial. In this work, we explored the role of IL-1 β /caspase-1 signaling in bleomycin lung toxicity and in pleural mesothelial cell transformation.

Methods: C57BL/6 mice were intravenously injected with either bleomycin or nigericin or NaCl as control. *In vitro*, the Met5A cell line was used as a model of human pleural mesothelial cells.

Results: Intravenous injections of bleomycin induced lung fibrosis with histologically-proven peripheral distribution, collagen accumulation in the pleural and subpleural area, and overexpression of markers of myofibroblast transformation of pleural cells which migrated into the lung. These events were associated with an inflammatory process with an increase in neutrophil recruitment in pleural lavage fluid and increased caspase-1 activity. TGF- β 1 was also overexpressed in pleural lavage fluid and was produced by pleural cells following intravenous bleomycin. In this model, local pleural inhibition of IL-1 β with the IL-1 β inhibitor anakinra diminished TGF- β 1 and collagen accumulation. *In vitro*, caspase-1 inhibition interfered with Met5A cell transformation into the myofibroblast-like phenotype induced by bleomycin or TGF- β 1. Moreover, nigericin, a caspase-1 activator, triggered transformation of Met5A cells and its intra-pleural delivery induced fibrogenesis in mice.

Conclusions: We demonstrated, after intravenous bleomycin injection in mice, the role of the pleura and highlighted the key role of IL-1 β /caspase-1 axis in this fibrogenesis process.

Keywords: Idiopathic Pulmonary Fibrosis, bleomycin, pleural cells, caspase-1, TGF- β 1

Introduction

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a devastating disease characterized by matrix accumulation in the lung leading to death with a mean survival of three to 5 years after diagnosis [1]. To date, the causes of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) remain elusive and the therapeutic options available to patients are limited, with only two drugs recently approved, pirfenidone and nintedanib, both of which have demonstrated only a slight impact on disease progression [1-3]. IPF typically starts from subpleural areas of the lung and then progresses deeper towards the lung parenchyma, where it disturbs alveolar architecture and gas exchange. Bleomycin (BLM) is an effective chemotherapeutic agent widely used intravenously in humans mainly in patients with Hodgkin's lymphoma. However, the pulmonary toxicity of BLM has restricted its use in clinical practice (www.pneumotox.com).

The role of mesothelial cells in animal models of pulmonary fibrosis and in human IPF has recently been reported [4-11]. In these diseases, they differentiate into myofibroblast-like cells via a cellular mechanism called Mesothelio-Mesenchymal Transition (MMT) [5]. However, the exact mechanisms that lead to the involvement of the pleura and pleural mesothelial cells in the onset and progression of fibrosis are not yet fully understood.

The role of chronic inflammation in human IPF is still controversial. Inflammatory cytokines and the infiltration of immune cells are found in IPF [12, 13]. IL-1 β overexpression in rodent lung induced the upregulation of TGF- β 1, a major pro-fibrotic growth factor, and lung fibrosis [14, 15]. IL-1 β is synthesized as a latent form and is activated following cleavage by caspase-1. Pro-caspase-1 is activated in multiprotein complexes, called the inflammasome, which contains a NOD-like receptor and a scaffold protein such as the apoptosis associated speck-like protein containing a CARD (ASC). The importance of IL-1 β /caspase-1 signaling has been shown in the BLM model of lung fibrosis [16]. Mice deficient for inflammasome components such as the NOD-like receptor NLRP3 and thereby unable to activate caspase-1 and thus produce active IL-1 β develop less severe fibrosis after BLM challenge [17]. Even though most studies on IL-1 β /caspase-1 signaling focused on immune cells, some studies highlighted the involvement of this signaling pathway in structural cells [18, 19]. The role of caspase-1 on lung structural cells and its involvement during fibrotic processes is still poorly understood.

In the present study, using repetitive intravenous injections of BLM in mice, we highlighted the pleural activation of IL-1 β /caspase-1 signaling as a seminal event in BLM-induced pleural and subpleural fibrotic toxicity. Our work suggests that caspase-1 could be a therapeutic target for IPF as well as BLM lung fibrotic toxicity.

Material and Methods

Animal procedures

Eight-week-old C57BL/6J mice (Charles River, Saint Germain-sur-l'Arbresle, France) were housed accordingly to the guidelines of the "*Ministère de la Recherche et de la Technologie*". All experiments were approved by the "*Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale (C2EA) du grand campus Dijon, n°105*" (ref number : 4612). Mice were intravenously injected three times per week with bleomycin (BLM, Calbiochem) at a dose of 20mg/kg for a total of 6 injections (Fig. S1A). IL-1 β signaling was blocked with IL-1ra (anakinra) that was injected (0.1, 1 or 5mg) intra-pleura every other day from day 0 to day 14 (Fig. S1B). Caspase-1 was activated by intrapleural injection of nigericin (Sigma Aldrich). Three, 14 or 21 days after the beginning of the injections and after a sample of blood was collected, mice were euthanized by abdominal aortic bleeding. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and pleural lavage fluid (PLF) were then collected as previously described [5]. For histological analysis, lungs were harvested, inflated and fixed in formalin. Intrapleural injection of β -Galactosidase coding adenoviruses (AdLacZ) were administered as previously described [4, 5]. After being harvested, the lungs were placed in a solution containing β -Galactosidase substrate. Hydrolysis of this substrate released a blue-colored product highlighting pleural adenovirus-infected cells.

Histology and fibrosis assessment

Fibrosis in pleural and subpleural areas was assessed on lung sections after H&E staining using a scoring method based on the modified Ashcroft score previously described [20]. Lung sections were analyzed in a double-blinded test to assess the pleural area using x100 magnification and were graded from 0 (normal lung) to 8 (completely fibrotic lung). When varying degrees of fibrosis were present, the highest score was retained. Collagen was quantified using a histomorphometric assay on picrosirius red stained sections [5]. Ten areas targeting the pleura were randomly acquired under polarized light (x100, Nikon Eclipse E600)

with a high-resolution microscope camera (Nikon DS-Ri1). Signal intensity was quantified using a homemade ImageJ macro and plotted as signal intensity according to distance to the pleura (up to 500 μ m into the lung parenchyma) (Supplemental Figure S1). Briefly, the user inputs a pleura limit, a parenchymal side (above, below, left, right), a background area and areas to exclude from the analysis (staining artifacts, vessels and large airways). The program adjusts the pleural limits, the beginning of the pleura being set as the first of two consecutive pixels (in an order from the background to the parenchyma) with an intensity higher than the mean background signal plus two standard deviations from the background. From there on, the program maps the distance from the parenchymal area to the pleura (Supplemental Figure S1A). It then measures the intensity of each parenchymal pixel in the picrosirius red channel. The program returns a text file with the intensity and distance to pleura of each measured pixel. The data are plotted to form a curve with the mean intensity of all pixels with a given distance to the pleura (Supplemental Figure S1B). Statistical analyses were performed by comparing areas under the curve over the whole range in the pleura (0-60 μ m) or subpleural (60-500 μ m) area. Picrosirius red was also monitored in the parenchymal area as previously described [21]. For collagen quantification, vessels and large airways were excluded. Total TGF- β 1 levels in BALF or PLF were assessed with a specific ELISA for mouse TGF- β 1 (Quantikine® ELISA. R&D Systems) according to the manufacturer's guidelines.

Immunohistology

Formalin fixed, paraffin embedded lung sections were dewaxed with xylene and endogenous peroxidases were inhibited (H₂O₂ 3%). Frozen sections were fixed with ice-cold acetone and cells fixed with PFA and permeabilized with triton. Before saturation (BSA 5%), samples were incubated overnight at 4°C with specific antibody. HSP47 (LF-PA41903) was from Ab Frontier, WT-1 (ab89901) from Abcam, Ki-67 (PA1-21520) from Thermo, HSP27 (SPA-803) and α B-crystallin (SPA-223) from Enzo Life Sciences, α -SMA (ab5694) from Abcam and NLRP3 (Cryo-2) from Adipogen. After washing, sections were incubated with HRP-coupled anti-rabbit antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories) or Alexa568- or Alexa488-coupled antibody (Invitrogen). NovaRED (Vector Labs) was used to detect HRP followed by counterstaining with hematoxylin for immunohistochemistry. DAPI-containing ProLong® Gold (Invitrogen) was used for immunofluorescence experiments. For caspase-1 fluorescent staining, frozen lung sections were labeled according to the manufacturer's instructions (FAM-FLICA YVAD. ImmunoChemistry Technologies). TGF- β 1 expression was

followed by a FISH analysis on dewaxed sections. Briefly, sections were incubated in hybridization solution (Formamide 20%, SSPE 2X) and then incubated with a mix of Quasar 570-coupled probes (“Stellaris”, Biosearch Technologies) specifically targeting murine TGF- β 1 mRNA. After incubation, excess was eliminated from the probes and sections were mounted. Images were acquired with a Nikon Eclipse E600 with a high-resolution microscope camera (Nikon DS-Ri1). Fluorescent images were visualized using an Axio Imager.M2 microscope (Zeiss).

Cell culture

Human pleural mesothelial cells Met5A were cultured in Medium-199 (Lonza) supplemented with 10% serum (Hyclone, Fisher Scientific). Proliferating cells were treated with BLM (Calbiochem). For Il-1 β assessment in supernatant, cells were treated with BLM in serum-free medium. When indicated, caspase-1 was blocked using YVAD (Bachem AG) as previously described [19].

Western Blot

Proteins from cells or lung tissues were extracted using a Triton X-100 and anti-protease (Roche) containing buffer for 30 to 40 minutes on ice. Proteins were quantified using a colorimetric method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) before thermic denaturation in loading buffer containing SDS and β -mercaptoethanol. For Il-1 β assessment, supernatants were collected and centrifuged to pellet debris. Samples were concentrated using a methanol-chloroform method before denaturation. To evaluate active MMP expression, a non-denaturant loading buffer was used to deposit BALF or PLF for the SDS-PAGE. 30 μ g of proteins for lysates or constant volume for supernatant were deposited for migration on 12-15% acrylamide gels according to the molecular weight of the targeted proteins. After electrophoresis, proteins were transferred on to PVDF membranes (GE Healthcare Europe GmbH) in a boric acid containing buffer. For IL-1 β transfer, an ethanol-supplemented glycine buffer was used. Membranes were saturated with BSA before incubation with primary antibodies. MMP-9 (BML-SA620) from EnzoLife Science, MMP-2 (sc-13594) and HSC70 (clone B-6) from Santa Cruz Biotechnology, HSP47 (LF-PA41903) from Abfrontier, Caspase-1 (AHZ0082) from Invitrogen, Il-1 β (clone 166926) from R&D, α -SMA (ab5694) from Abcam, E-Cadherin (24E10) from Cell Signaling and β -actin (AC-74) from Sigma-Aldrich. After washing in TBS-Tween 0.1%, membranes were incubated with HRP-coupled secondary antibody (Jackson

Immunoresearch Laboratories). The signal was revealed using a chemiluminescent reagent (Western Blotting Luminol Reagent. Santa Cruz Biotechnology) and was followed by a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

RT-qPCR analysis

Total RNA from mouse lung was extracted using TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription was performed on the total RNA using the M-MLV kit (Promega) and quantitative RT-PCR was performed on the cDNA using SYBR green master mix (Promega). The forward and reverse primer sequences were the following: for mouse samples: TGF- β 1, 5'-CGTGGCTTCTAGTGCTGACGC-3' and 5'-CCATGTCGATGGTCTTGCAGGT-3'; PAI-1, 5'-GGCCGTGGAACAAGAATGAGAT-3' and 5'-GCTTGAAGAAGTGGGGCATGAAG-3'; E-cadherin, 5'-GGAGAGGCACCTGGAGAG-3' and 5'-TCCGAAAAGAAGGCTGTC-3'; L32, 5'-GAAACTGGCGGAAACCCA-3' and 5'-GGATCTGGCCCTTGAACCTT-3', for human samples: E-cadherin, 5'-ACA GCC CCG CCT TAT GAT T-3' and 5'-CTTCGGAACCGCTTCCTTCA-3'; α -SMA, 5'-TGGTCGGTATGGGTCAGAAAG-3' and 5'-TCAGGGTCAGGATACCTCTCTTG-3'; procollagen, 5'-GCTACCCAACCTGCCTTCATG-3' and 5'-GCAGTGGTAGGTGATGTTCTAAGA-3'; L32, 5'-TGTCCTGAATGTGGTCACCTGA-3' and 5'-CTGCAGTCTCCTTGCACACCT-3'.

Proteome profiler

Relative levels of several cytokines were assessed with the “Mouse Cytokine Array Panel A Array kit” (R&D Systems). Mouse plasma was tested as recommended by the manufacturer. Signal intensity was quantified by ImageJ software and data expressed as a percentage of intensity normalized to positive controls.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times independently. The different groups were compared using a two-tailed nonparametric unpaired Mann Whitney test. P values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Subpleural fibrosis induced by intravenous bleomycin administration is associated with pleural cell migration

Histological analysis of lung sections, quantified by modified Ashcroft scoring and picosirius red quantification, showed that repeated intravenous injections of bleomycin (BLM) induced progressive subpleural morphological changes in mouse lungs, compared with NaCl controls (Fig. 1A, S3A, S3B). By D14, morphological changes were mainly observed in the subpleural areas, and progressed towards the inner parenchyma by D21 (Fig. 1A, S3C-E). We set up a novel method to quantify picosirius red staining by taking into consideration the distance to the pleura, and performed in-depth analyses (Fig. S2). We thus showed that, following intravenous administration of BLM, collagen started to accumulate in the pleura at D3 and progressed towards the lung parenchyma in a time-dependent manner (Fig. 1C, 1D). In line with this, in the lungs of BLM-treated mice but not in those of control mice, HSP47 was overexpressed in pleural cells as early as D3 and in fibrotic subpleural areas at D14 (Fig. S2F, S2G). Intravenous BLM promoted the upregulation of HSP27 and α B-crystallin in the fibrotic areas (Fig. 1E). These proteins have been reported to promote pleural mesothelial cell transformation [4, 9]. We also observed an increase in the expression of the marker of Ki-67 proliferation in pleural cells next to the fibrotic areas (Fig. 1E). Moreover, we detected an increase in proMMP-9 expression and MMP-2 activation in the pleural lavage fluid (PLF) from BLM-treated mouse lung, compared with the control group (Fig. 1F). We thus investigated the migration of pleural cells after intravenous BLM injection. Following intrapleural injection of LacZ-coding adenovirus (AdLacZ), which specifically labels pleural cells [5], we noticed a change in pleural cell morphology (arrows) at D5 in BLM-treated mice, compared with control mice (Fig. 1G). Furthermore, at D10 after the BLM injection, pleural cells were found within the subpleural lung parenchyma whereas in control animals the pleural cells remained in the pleural layer. These results demonstrate that systemic BLM injections trigger the transformation of pleural cells, which then migrate into the lung parenchyma.

Pleural cells are involved in bleomycin-induced inflammation

Compared with controls, intravenous BLM induced an increase in the total number of cells in PLF starting at D14 (Fig. 2A). At D14 and D21 after the BLM systemic administration, we also found an increase in the percentage of neutrophils and leucocytes in the PLF (Fig. 2B).

This pro-inflammatory profile at the pleural level was also found in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF) following BLM (Fig. S4A, S4B). This suggests that the inflammatory response to the intravenous administration of BLM may involve the lung as well as the pleural area. Moreover, no differences were found in total cell count in the blood (monocytes, granulocytes, lymphocytes) or in serum levels of the major pro-inflammatory cytokines. (Fig. S4C, S4D). We then focused on the caspase-1/IL-1 β pathway. Systemic administration of BLM in mice triggered the activation of caspase-1 in the lung in particular in the pleural and subpleural area (Fig. 2C, 2D). In the human pleural mesothelial Met5A cell line, BLM induced caspase-1 activation as well as active IL-1 β secretion into the supernatant (Fig. 2E, 2F), and caspase-1/IL-1 β activation correlated with the presence of NLPR3 aggregates, suggesting inflammasome formation (Fig. S5).

Pleural delivery of IL-1ra hampers bleomycin-induced TGF- β 1 upregulation

We observed at D14 that cells localizing in the pleura exhibited transformation features such as Ki-67 or HSP27/ α B-crystallin overexpression. To investigate if pleural cells were also involved in the establishment of a profibrotic milieu, we investigated TGF- β 1 production at this same time-point (e.g. D14). We observed an upregulation of TGF- β 1 in the PLF from BLM-injected mice compared with controls (Fig. 3A). A Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) analysis of lung sections showed that BLM treatment increased the expression of TGF- β 1 mRNA in pleural cells whereas barely any expression was observed in control animals (Fig. 3B). A similar upregulation of TGF- β 1 production was observed at D21 (Fig. S6). As inflammation is linked to TGF- β 1 upregulation, we next investigated the relationship between BLM-induced IL-1 β production by pleural cells and fibrosis markers such as TGF- β 1 upregulation. Repeated intra-pleural administration of a specific inhibitor of IL-1 β (IL-1ra) during the inflammation step (from day 0 to day 14) decreased TGF- β 1 induction in the lungs (both mRNA and protein) induced by the intravenous administration of BLM at D21 (Fig. 3C, 3D). FISH analysis showed that the injection of IL-1ra was able to inhibit TGF- β 1 expression in both pleural cells and cells localized in subpleural areas (Fig. 3E).

Pleural IL-1ra prevents bleomycin-induced lung fibrosis

We studied whether the intra-pleural delivery of IL-1ra interfered with BLM pro-fibrotic toxicity in the lung. Pleural delivery of IL-1ra increased expression levels of E-Cadherin and decreased those of PAI-1 (Fig. 4A). In line with this finding, IL-1ra reduced collagen

accumulation in mouse lung following BLM injection in a dose-dependent manner as observed by histomorphometric analysis (Fig. 4B). Further, as shown in Figure 4C, in BLM-injected mice compared with the NaCl control, α -SMA was overexpressed in lung areas where caspase-1 was activated. Altogether, these data suggest that caspase-1/IL-1 β signaling is involved in the transformation process occurring in the subpleural area, which represents a triggering event in fibrogenesis.

Caspase-1 inhibition hampers pleural structural cell differentiation

We then investigated the role of caspase-1 in pleural cell differentiation *in vitro*. In the presence of BLM, Met5A cells exhibited a mesenchymal phenotype with the overexpression of α -SMA (Fig. 5A). The specific caspase-1 inhibitor YVAD was able to counteract these changes. Furthermore, YVAD also abolished the E-Cadherin downregulation induced by TGF- β 1 (Fig. 5B). To further confirm the involvement of caspase-1 in the process of pleural cell transformation, Met5A cells were cultured in the presence of the caspase-1 activator nigericin. As shown in figure 5C, E-cadherin expression gradually decreased as caspase-1 was activated. Compared with the control, nigericin induced other MMT-like changes such as α -SMA overexpression (Fig. 5D). In the same way, intra-pleural delivery of nigericin in mice induced a fibrotic response in the pleura (Fig. 5E). Moreover, when injected into the pleura, nigericin induced an increase in cell recruitment in the pleura of these animals (Fig. 5F). Collectively, these data indicate that caspase-1 is involved in the activation and subsequent transformation of pleural cells triggered by BLM or TGF- β 1.

Discussion

In recent decades, chronic inflammation has been considered a non-essential factor in the development of IPF. However, there is evidence that inflammation plays a role not only at the onset of the fibrotic process but also during fibrosis progression [22]. IPF progression is interspersed with stable periods interrupted by acute exacerbation, in which TGF- β 1 plays a key role [23, 24]. The cause of these exacerbations remains unknown, though inflammation is thought to be a triggering event [25]. A retrospective study highlighted the beneficial effect of soluble thrombomodulin on mortality in patients with an acute exacerbation of IPF [26]. Interestingly, thrombomodulin, besides its role in the modulation of intravascular coagulation, also inhibits HMGB1, a trigger of the NLRP3 inflammasome and subsequent caspase-1 activation [27]. The involvement of caspase-1/IL-1 β in BLM-induced lung toxicity has already been reported in animal models [16, 17]. Recently, structural cells have been reported to be involved in caspase-1 activation and IL-1 β secretion in the lung following different profibrotic stimuli [18, 19]. Mesothelial cells have already been shown to be involved in the initiation of the inflammatory response in a model of talc-induced pleurodesis [28]. Furthermore, asbestos can induce caspase-1 activity through the NLRP3 inflammasome and thus triggers an inflammatory signal in mesothelial cells [29]. Our work highlighted the fact that local intrapleural treatment with an IL-1 β inhibitor such as IL-1ra (to counteract BLM-induced pleural inflammation) limited fibrosis progression and could thus be a therapeutic option notably in the management of acute exacerbation of IPF. It worth to note that IL-1ra effect on established fibrosis still needs to be investigated.

We and others have demonstrated the involvement of pleural mesothelial cells in the process of pleuro-pulmonary fibrosis in animal models as well as in human IPF [5, 6, 8]. We previously described in several animal models that pleural mesothelial cells can differentiate into myofibroblast-like cells under TGF- β 1 through a transformation process called MMT [4-6, 9]. Interestingly, recent studies revealed the presence of calretinin and mesothelin expressing cells, two markers of pleural mesothelial cells, in IPF lung parenchyma suggesting the migration of pleural mesothelial cells [7, 8, 30]. Our present work further endorses these results as we described the differentiation and migration of pleural cells together with increased collagen production after systemic administration of BLM. Moreover, we provide evidence regarding the direct role of caspase-1 in BLM- and TGF- β 1-induced pleural cell transformation. NLRP3 has been reported to interfere with TGF- β signaling [31, 32]. NLRP3 can regulate

cardiac fibroblast differentiation, and its deficiency seems to protect mice from angiotensin II-induced cardiac fibrosis [31]. NLRP3 hampers TGF- β -induced EMT in vitro in renal tubular epithelial cells [32]. In line with these findings, we showed here that activation of caspase-1 was able to trigger transformation/differentiation of pleural cells in vitro. Moreover, intra-pleural delivery of nigericin in mice elicits fibrogenesis with a restrictive pleural localization at D21, suggesting that pleural activation of caspase-1 could induce pleural cells transdifferentiation. Supporting this hypothesis, caspase-1 inhibition inhibited transdifferentiation of Met5A cells induced by either BLM or TGF- β 1. Thus, targeting caspase-1 in pulmonary fibrotic disorders might represent an interesting therapeutic option by interfering with two pro-fibrotic events: inflammation and the transformation of pleural structural cells that acquire a myofibroblast-like phenotype.

Conclusion

Using a murine model of pulmonary fibrosis induced by repetitive intravenous injections of BLM, which corresponded to a robust experimental model of pulmonary fibrosis mimicking human IPF and human BLM-induced lung toxicity, we confirmed the direct role of pleural cells in the observed fibrotic process. Further, our results suggest that caspase-1 should be considered as a therapeutic target in the management of pulmonary fibrotic disorders.

Abbreviations

IPF, idiopathic pulmonary fibrosis ; BLM, bleomycin ; TGF- β , transforming growth factor- β 1 ; BALF, broncho-alveolar lavage fluid ; PLF, pleural lavage fluid ; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ; EMT, epithelial to mesenchymal transition ; MMT, mesothelio-mesenchymal transition ; HMGB1, high mobility group box 1 ; IL-1 β , interleukin-1 β ; α -SMA, α -smooth muscle actin ; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1 ; FISH, fluorescence in situ hybridization.

Declarations

Acknowledgements

We thank V. Saint Giorgio, A. Bouchot for their invaluable help and P. Bastable for correcting the manuscript. We thank Dr M. Kolb for providing the AdLacZ.

Funding

This work has received funding from the European Union, 7th Framework Programme, HEALTH-F2-2007-202224 European IPF Network, the Fonds Européen de Développement Économique et Régional, Agence Nationale de la Recherche (11-BSV-011-01 meso-IPF and Investissement d’Avenir ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx), La Ligue Régionale Grand Est Contre le Cancer, Le conseil Régional de Bourgogne, l’Institut National du Cancer (INCa), and the Fonds de Dotation “Recherche en Santé Respiratoire“, the Société de Pneumologie de Langue Française and the Fondation du Souffle. O. B. and P.B. are lauréat 2014 de la Fondation du Souffle et du Fonds de dotation Recherche en Santé Respiratoire. O.B., PS.B. and G.W. are supported by Fonds de Dotation « Recherche en Santé Respiratoire » et la Société de Pneumologie de Langue Française. O.B. is supported by La Ligue National Contre le Cancer. The team of C.G. has been awarded the « label d’excellence » by La Ligue National Contre le Cancer and L’Association pour la Recherche sur le Cancer and belongs to the LabEx LipSTIC and GR-Ex.

Authors contributions

O.B. and PS.B. designed and performed all experiments and analyzed the data. SC wrote the ImageJ program for picrosirius red quantification and set up FISH staining. G.B., G.W., PM.B. and F.G helped with the *in vivo* experiments. C.G. supervised the overall project and revised the manuscript. P.B. and O.B. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Animal experiments were performed accordingly to the guidelines of the French government (*Ministère de la Recherche et de la Technologie*, France). All animals experiments were approved by the *Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale (C2EA) du grand campus Dijon, n°105* (France) (ref number : 4612).

Consent to publication

Not applicable.

Availability of data and materials

Essential datasets supporting the conclusions are included in this published article.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

List of online supplemental material

- Figure S1. Scheme of the different models used in this work.
- Figure S2. In depth subpleural collagen quantification.
- Figure S3. Intravenous BLM injections trigger collagen accumulation mainly in the subpleural areas by D14 with overexpression of HSP47.
- Figure S4. BLM promotes an inflammation profile of the BALF but not in the blood.
- Figure S5. BLM triggers the accumulation of NLRP3 protein in Met5A cells.
- Figure S6. Intravenous BLM induces TGF- β 1 overproduction in mouse lung at D21.

References

1. Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, et al: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2015, 192:e3-19.
2. Mazzei ME, Richeldi L, Collard HR: Nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis* 2015.
3. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE, Jr., Lancaster L, Sahn SA, Szwarcberg J, et al: Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 2011, 377:1760-1769.
4. Bellaye PS, Burgy O, Colas J, Fabre A, Marchal-Somme J, Crestani B, Kolb M, Camus P, Garrido C, Bonniaud P: Antifibrotic role of alphaB-crystallin inhibition in pleural and subpleural fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015, 52:244-252.
5. 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.
6. 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. *Eur Respir J* 2010, 35:176-185.
7. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, Ye T, Thannickal VJ, Antony VB: Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J* 2014, 28:1122-1131.

8. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, Hensel E, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, et al: Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2012, 39:133-140.
9. Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, Marchal-Somme J, Hazoume A, Gauldie J, Gunther A, et al: Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 2013, 27:1549-1560.
10. Chen LJ, Ye H, Zhang Q, Li FZ, Song LJ, Yang J, Mu Q, Rao SS, Cai PC, Xiang F, et al: Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015, 283:75-82.
11. Tucker TA, Jeffers A, Alvarez A, Owens S, Koenig K, Quaid B, Komissarov AA, Florova G, Kothari H, Pendurthi U, et al: Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency augments visceral mesothelial organization, intrapleural coagulation, and lung restriction in mice with carbon black/bleomycin-induced pleural injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014, 50:316-327.
12. Boomars KA, Schweizer RC, Zanen P, van den Bosch JM, Lammers JW, Koenderman L: Eosinophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage from idiopathic pulmonary fibrosis is dependent on cytokine priming of eosinophils. *Eur Respir J* 1998, 11:1009-1014.
13. Daniil Z, Kitsanta P, Kapotsis G, Mathioudaki M, Kollintza A, Karatza M, Milic-Emili J, Roussos C, Papiris SA: CD8⁺ T lymphocytes in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2005, 6:81.
14. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J: Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2001, 107:1529-1536.
15. 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.
16. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, et al: IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007, 117:3786-3799.
17. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I: Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 179:903-913.
18. Aumiller V, Balsara N, Wilhelm J, Gunther A, Konigshoff M: WNT/beta-catenin signaling induces IL-1beta expression by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, 49:96-104.

19. Burgy O, Wettstein G, Bellaye PS, Decologne N, Racœur C, Goirand F, Beltramo G, Hernandez JF, Kenani A, Camus P, et al: Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Sci Transl Med* 2016, 8:326ra320.
20. Hubner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, Freitag-Wolf S, Bewig B: Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* 2008, 44:507-511, 514-507.
21. Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, Besnard V, Joannes A, Colas J, Causse S, Marchal-Somme J, Fabre A, Crestani B, et al: The small heat-shock protein alphaB-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. *J Pathol* 2014, 232:458-472.
22. Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB: The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10:287-301.
23. Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, Brown KK, Kaner RJ, King TE, Jr., Lasky JA, Loyd JE, Noth I, Olman MA, et al: Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:636-643.
24. Smoktunowicz N, Alexander RE, Franklin L, Williams AE, Holman B, Mercer PF, Jarai G, Scotton CJ, Chambers RC: The anti-fibrotic effect of inhibition of TGFbeta-ALK5 signalling in experimental pulmonary fibrosis in mice is attenuated in the presence of concurrent gamma-herpesvirus infection. *Dis Model Mech* 2015, 8:1129-1139.
25. Wootton SC, Kim DS, Kondoh Y, Chen E, Lee JS, Song JW, Huh JW, Taniguchi H, Chiu C, Boushey H, et al: Viral infection in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 183:1698-1702.
26. Isshiki T, Sakamoto S, Kinoshita A, Sugino K, Kurosaki A, Homma S: Recombinant human soluble thrombomodulin treatment for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: a retrospective study. *Respiration* 2015, 89:201-207.
27. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, Uchimura T, Ida N, Yamazaki Y, Yamada S, et al: The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005, 115:1267-1274.
28. Acencio MM, Vargas FS, Marchi E, Carnevale GG, Teixeira LR, Antonangelo L, Broaddus VC: Pleural mesothelial cells mediate inflammatory and profibrotic responses in talc-induced pleurodesis. *Lung* 2007, 185:343-348.
29. Hillegass JM, Miller JM, MacPherson MB, Westbom CM, Sayan M, Thompson JK, Macura SL, Perkins TN, Beuschel SL, Alexeeva V, et al: Asbestos and erionite prime and activate the NLRP3 inflammasome that stimulates autocrine cytokine release in human mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2013, 10:39.

30. Zolak JS, Jagirdar R, Surolia R, Karki S, Oliva O, Hock T, Guroji P, Ding Q, Liu RM, Bolisetty S, et al: Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury. *Am J Pathol* 2013, 182:1239-1247.
31. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR, Jr., Fedak PW, Beck PL, Muruve DA, Duff HJ: Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *J Biol Chem* 2014, 289:19571-19584.
32. Wang W, Wang X, Chun J, Vilaysane A, Clark S, French G, Bracey NA, Trpkov K, Bonni S, Duff HJ, et al: Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *J Immunol* 2013, 190:1239-1249.

Figure legends

Figure 1. Intravenous bleomycin induces subpleural fibrosis associated with pleural cell differentiation and migration. A) Histological analysis of lung sections from mice receiving either NaCl or BLM intravenously at D14 and D21. Representative images (insert: NaCl at the corresponding time point. Scale bars : 500 μ m). B) Ashcroft scoring of lung sections. C) Profiles of Picosirius Red signal according to distance to the pleura at D3, D14 and D21. D) Area Under Curve comparison of areas targeting the pleura (left) or subpleural (right) areas at D3, D14 and D21. For collagen quantification, data are represented as mean of Picosirius Red signal normalized to the NaCl condition at the corresponding time point. Data expressed as mean \pm SEM. n=4 for NaCl groups, n=6 for BLM groups at D3 and D21, and n=6 for NaCl and n=8 for BLM at D14. E) Representative images of immunostaining for HSP27, α B-crystallin and KI-67 of lung sections from mice receiving NaCl or BLM at D14 (arrows indicate positive cells. Counterstaining: Harris hematoxylin. Scale bars : 100 μ m). F) Levels of proMMP-9 and active MMP-2 in PLF was determined by western blot. Representative results from NaCl (n=3) or BLM (n=3) treated mice at D14 are shown. G) AdLacZ-labeled pleural cells were stained for β -galactosidase activity (blue staining) in lung section from mice receiving intravenously NaCl or BLM at D5 or D10. Representative images are shown (n=4 NaCl, n=6 BLM. Scale bars: 200 μ m), Insert: magnification; scale bars: 100 μ m . Arrows indicate pleural cells with modified morphology. Counterstaining: Nuclear fast red). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Figure 2. Pleural cells are involved in bleomycin-induced inflammation. A) Cell recruitment in PLF was assessed by total cell count at D3, D14 and D21. Results are expressed as mean \pm SEM. B) Inflammation was estimated by differential count in PLF after May-Grünwald Giemsa staining. Results are expressed as percentages of total cells. n=4 for NaCl groups, n=6 for BLM groups at D3 and D21, n=6 for NaCl and n=8 for BLM at D14. C, D) Caspase-1 activation was assessed at D14 by C) western blot in whole lung extracts (n=3 mice/group) or by D) specific caspase-1 FLICA analysis on lung section from NaCl or BLM injected mice (Representative images are shown. Active caspase-1: green, DAPI: blue, dotted lines represent the pleura, scale bars: 50 μ m). E, F) Met5A cells were treated with BLM (100 μ M) and E) activation of caspase-1 was followed (western blot ; left, densitometric analysis ; right). F) active IL-1 β was assessed in the supernatant of Met5A cells after 24h of culture. Representative results from 3 independent experiments. HSC70 serves as a loading control. *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001.

Figure 3. Pleural delivery of IL-1ra hampers bleomycin-induced TGF- β 1 upregulation. A) TGF- β 1 accumulation in the PLF of NaCl- or BLM-injected mice at D14 was measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM. n=8 NaCl, n=10 BLM. B) Representative pictures from TGF- β 1 mRNA expression analysis at D14 by FISH in lung sections from mice receiving NaCl (n=4) or BLM (n=6). TGF- β 1 mRNA: red, DAPI: blue, dotted lines represent the pleura, scale bars: 50 μ m. Pleura (dotted line) and TGF- β 1 mRNA expression spots (arrows) are indicated. C) qPCR analysis for the expression of TGF- β 1 mRNA on whole lung from mice co-injected intravenously with NaCl or BLM together with intrapleural IL-1ra (from day 0 to 14) at the indicated doses or NaCl as a control at D21. Expression relative to L32 and normalized with the NaCl group is shown, n=5 mice/group. D) TGF- β 1 protein level at D21 assessed by western blot. HSC70 serves as a loading control. n=3 mice/group. E) FISH staining for TGF- β 1 mRNA expression on lung sections from the above described mice mice co-injected with BLM and IL-1ra (n=5 mice/group, scale bars: 50 μ m). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01.

Figure 4. Pleural IL-1 β /caspase-1 inhibition interferes with bleomycin-induced lung fibrosis. Mice were injected intravenously with NaCl or BLM together with intrapleural delivery of IL-1ra at the indicated doses or NaCl as a control (n=5 mice/group). A) qPCR analysis for the expression of E-Cadherin and PAI-1. Expression relative to L32 and normalized with the NaCl group is shown. B) Histomorphometric quantification of collagen in lung

parenchyma on lung sections from the above described mice. C) Double staining for FLICA caspase-1 (green) and α -SMA (red) on lung sections of mice intravenously injected with BLM or NaCl. Representative images, n=5/group. Nuclear staining: DAPI (blue), dotted lines represent the pleura, scale bars: 50 μ m. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Figure 5. Caspase-1 inhibition hampers pleural structural cell transformation. A,B) Met5A cells were cultured with A) BLM or B) TGF alone or in combination with caspase-1 inhibitor YVAD (western blot ; left, densitometric analysis ; right). Expression of α -SMA and E-Cadherin were assessed by western blot. HSC70 and β -actin: loading control. Representative results from three independent experiments. C, D) qPCR analysis of E-Cadherin and α -SMA mRNA on Met5A cells cultured in the presence of nigericin (0.1 μ M) or control C) at the indicated times or D) for 24h. C57Bl/6 mice were given intrapleural injections of nigericin (1.25mg/kg) or control. E) Histological analysis at D21 post-intrapleural injection. Representative observations after H&E staining, scale bars: 100 μ m. F) Total cell count in the PLF at D14 after intrapleural injection of nigericin or control. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Figure 1

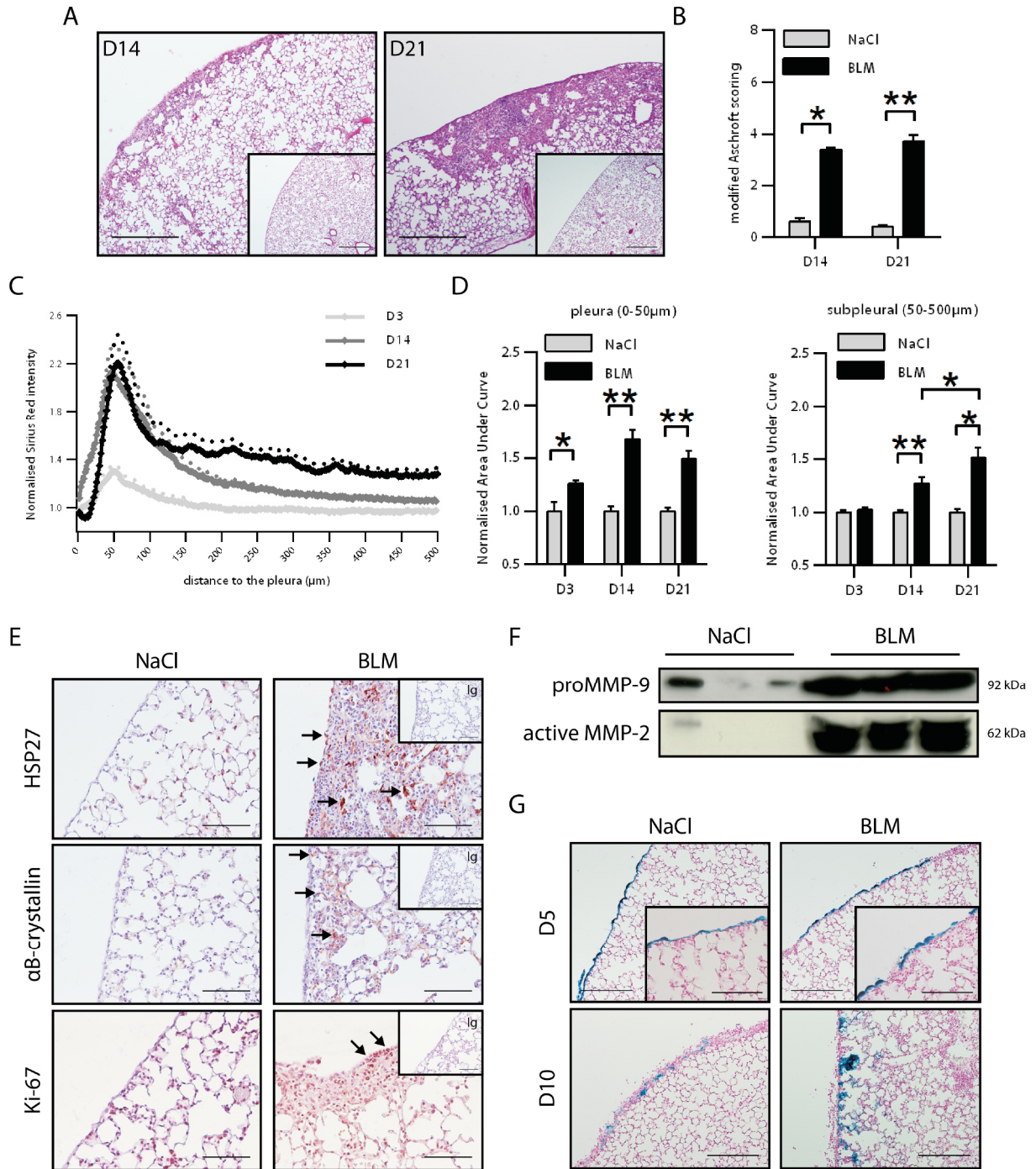


Figure 2

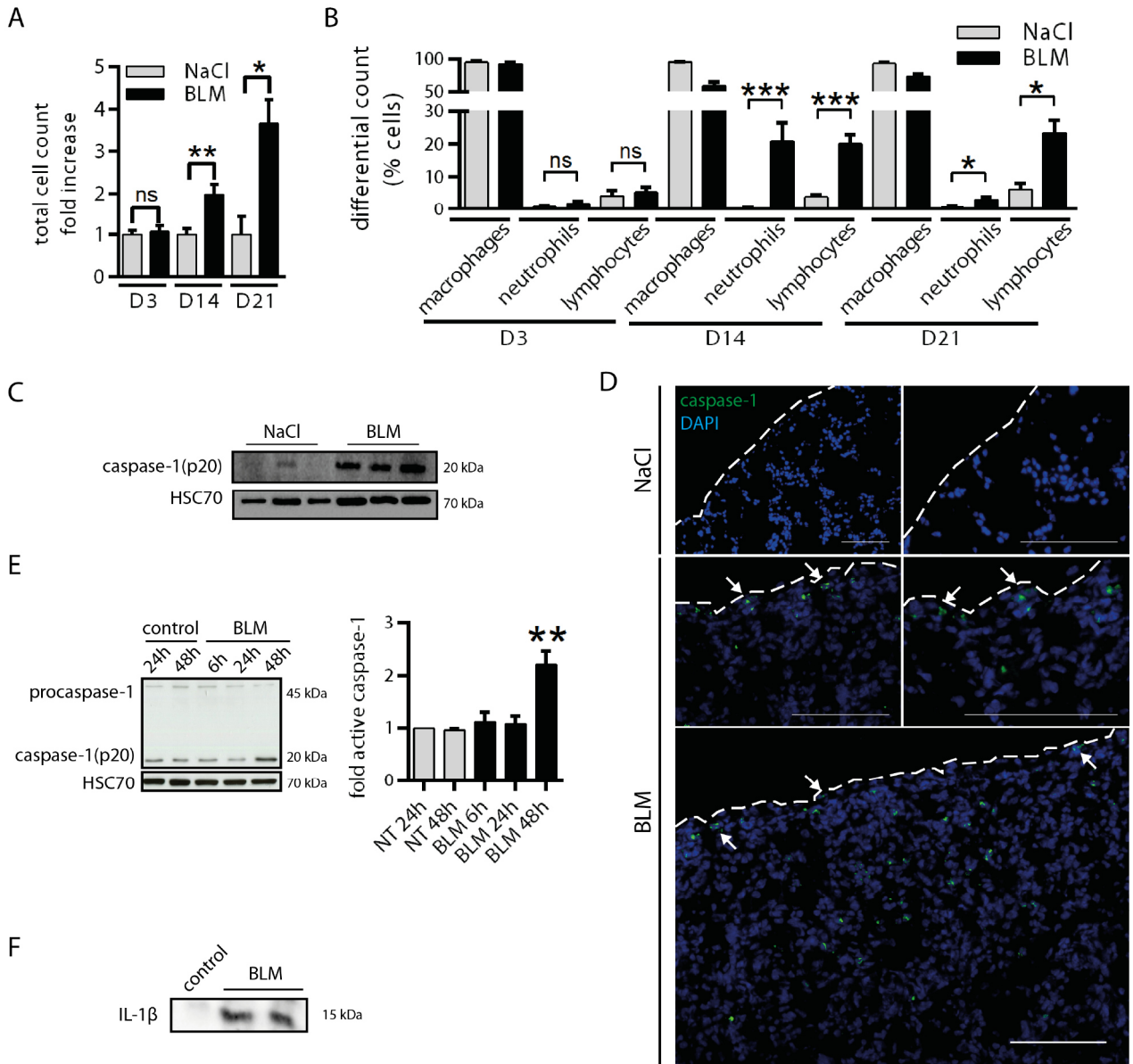


Figure 3

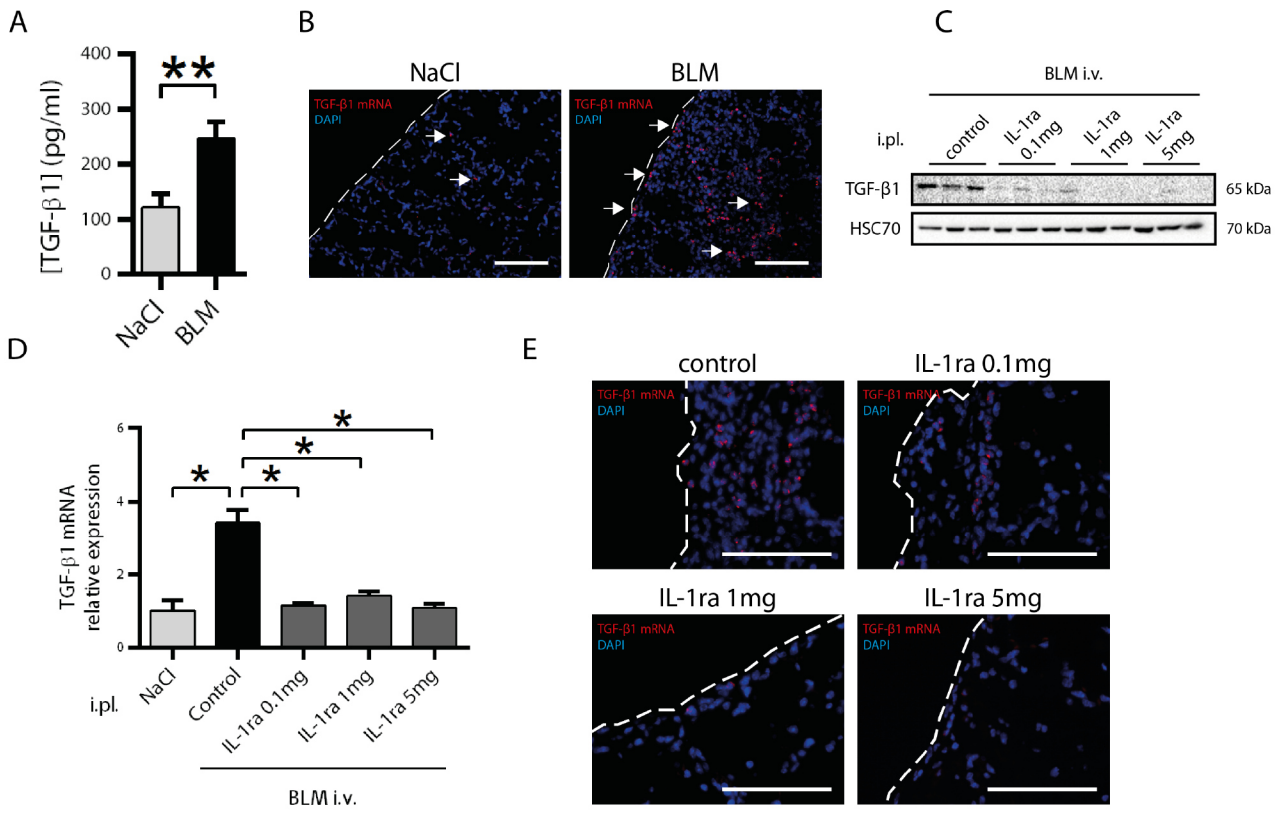


Figure 4

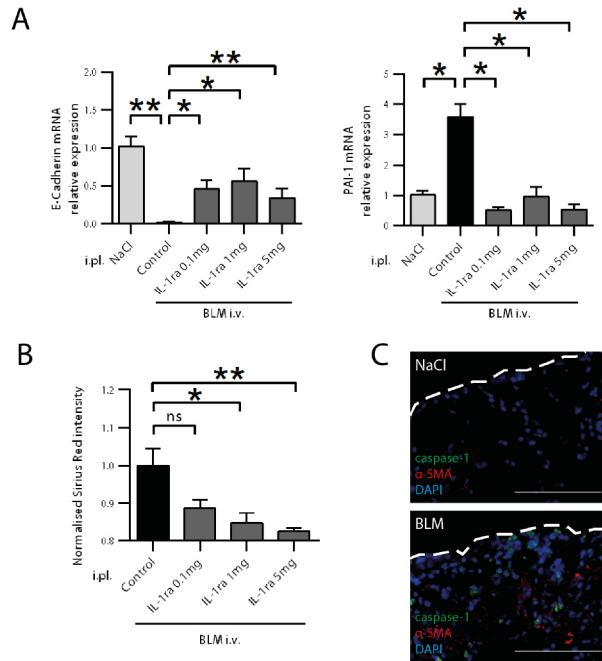
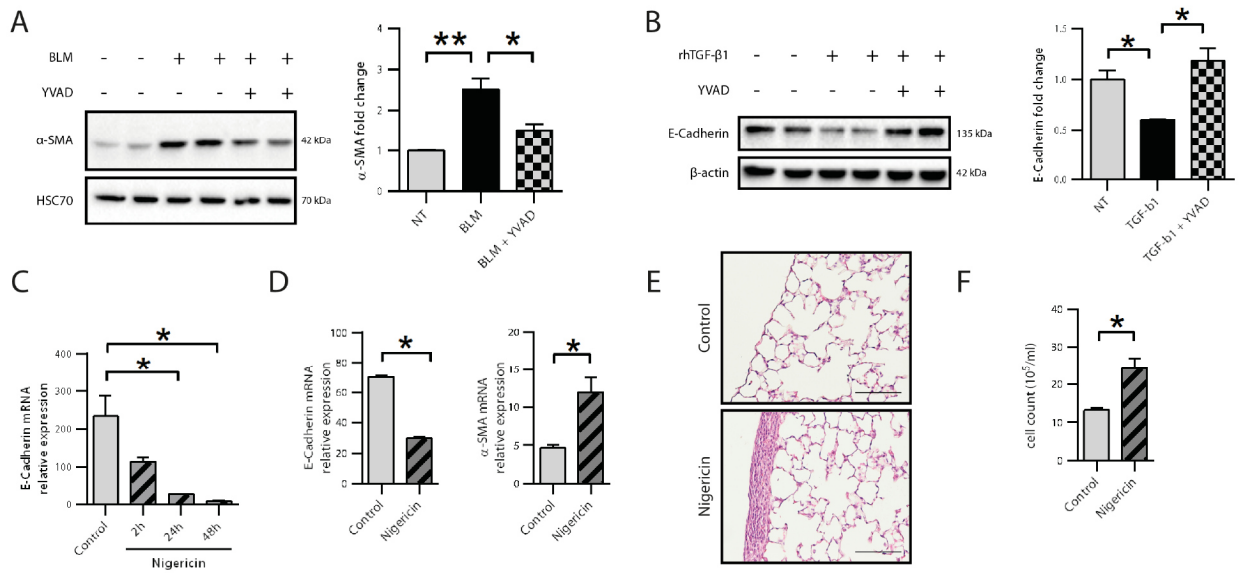


Figure 5



L'importance de l'inflammation dans la FPI reste discutée. Cependant, plusieurs évidences existent pour montrer un lien fort de l'inflammation dans l'origine du processus fibrosant mais aussi dans sa progression. C'est particulièrement le cas dans les phénomènes d'exacerbation aiguë de la FPI, où le développement d'une phase d'inflammation semble être bien admis.

L'implication de l'axe caspase-1/IL-1 β dans la toxicité pulmonaire de la bléomycine a été démontrée chez le rongeur (11). La majorité de ces études s'intéresse particulièrement à l'étude de l'axe caspase-1/IL-1 β dans les cellules immunitaires. Récemment, le rôle de cellules structurales dans la production d'IL-1 β a été observé (12). Dans cette étude, des cellules épithéliales alvéolaires primaires de souris, isolées de souris fibrotiques, sécrètent plus d'IL-1 β en comparaison à ces mêmes cellules isolées de souris contrôles.

Dans un modèle de pleurodèse induite par le talc, les cellules mésothéliales sont impliquées dans la phase d'inflammation décrite (262). Une activation de l'inflammasome NLRP3 a été observée dans des cellules mésothéliales cultivées *in vitro* en présence d'amiante (263). De la même manière, nous mettons en évidence l'implication des cellules mésothéliales pleurales dans l'inflammation, via la signalisation caspase-1/IL-1 β , dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Le rôle des cellules mésothéliales dans la FPI résulte de la transformation de ces cellules qui acquièrent un phénotype myofibroblastique et migrent vers le parenchyme pulmonaire. Récemment, des études ont montré un rôle de NLRP3, un récepteur fortement lié à la caspase-1 et dont il permet l'activation, dans des phénomènes de transformation cellulaire liés au TGF- β 1. NLRP3 interfère avec la voie du TGF- β 1 et serait capable de réguler la différenciation de fibroblastes cardiaques (153). L'inhibition de NLRP3 protège *in vitro* des cellules épithéliales rénales de l'EMT induite par le TGF- β 1 (151). De plus, des souris déficientes pour NLRP3 sont protégées de la fibrose cardiaque induite par l'angiotensine (153).

A travers cette étude, nous avons confirmé le rôle clé de l'axe caspase-1/IL-1 β dans la fibrogenèse. Nos résultats suggèrent que les cellules mésothéliales sont impliquées dans cette signalisation inflammatoire. Le rôle de l'axe caspase-1/IL-1 β au niveau des cellules mésothéliales semble être double avec l'augmentation d'une phase d'inflammation via l'IL-1 β et un rôle plus « direct » de la caspase-1 dans le phénomène de transformation des cellules pleurales.

III. Article 3. La bléomycine déglycosylée possède l'activité anti-tumorale de la bléomycine sans toxicité pulmonaire

La bléomycine est un agent de chimiothérapie principalement utilisé dans le traitement de cancer comme le lymphome de Hodgkin. Son utilisation est largement limitée par sa toxicité pulmonaire pouvant aller jusqu'à des fibroses pulmonaires. La recherche d'une stratégie pour diminuer voire empêcher l'apparition de cette toxicité pulmonaire de la bléomycine serait à l'évidence une grande avancée dans la prise en charge thérapeutique de certaines tumeurs chez l'homme.

La bléomycine déglycosylée (déglyco-bléomycine) est une molécule dérivée de la bléomycine sur laquelle le disaccharide D-mannosyl-L-glucose, localisé dans la partie glycosylée, a été retiré (417). En dehors de ceci, la déglyco-bléomycine et la bléomycine ont la même structure. La déglyco-bléomycine est une molécule de 1047 Da. Bien que le rôle de la partie sucrée de la molécule de bléomycine ne soit pas connu, il a été montré *in vitro*, sur des cellules de cancer laryngé, que la déglyco-bléomycine a une affinité moindre pour l'ADN et est par conséquent moins efficace dans le clivage de celui-ci (297). La déglycosilation de la bléomycine n'altère pas sa capacité à induire la mort cellulaire par apoptose *in vitro* indépendamment de la mise en jeu des caspases, mais par contre, inhibe la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) normalement induites par la forme complète de la bléomycine (418).

Dans ce travail, nous démontrons que la déglyco-bléomycine a la même efficacité anti-tumorale que la bléomycine dans plusieurs modèles de croissance tumorale chez la souris. Contrairement à la bléomycine, la déglyco-bléomycine n'entraîne aucun signe clinique de toxicité chez la souris. L'absence de toxicité pulmonaire de la déglyco-bléomycine a été confirmée après injection intra-trachéale. Dans ces modèles animaux et contrairement à la bléomycine, la déglyco-bléomycine n'induit pas d'activation de la caspase-1. Dans les cellules A549, nous mettons en évidence le rôle crucial d'un phénomène de mort cellulaire dépendante de la caspase-1 dans la cytotoxicité de la bléomycine.

Ce travail, dont je suis co-premier auteur, a donné lieu à une publication originale en 2016 dans le journal « *Science Translational Medicine* » (facteur d'impact : 16,2). Les travaux supplémentaires publiés en ligne sont présentés dans les annexes.

CANCER

Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity

Olivier Burgy,^{1,2,3*} Guillaume Wettstein,^{1,2,3*} Pierre S. Bellaye,^{1,2,3} Nathalie Decolgne,^{3,4} Cindy Racoer,^{3,4} Françoise Goirand,^{1,2,3} Guillaume Beltramo,^{1,2,3,5} Jean-François Hernandez,⁶ Abderraouf Kenani,⁷ Philippe Camus,^{1,2,3,5} Ali Bettaieb,^{3,4} Carmen Garrido,^{1,2,3,8†} Philippe Bonniaud^{1,2,3,5†‡}

Bleomycin (BLM) is a potent anticancer drug used to treat different malignancies, mainly lymphomas, germ cell tumors, and melanomas. Unfortunately, BLM has major, dose-dependent, pulmonary toxicity that affects 20% of treated individuals. The most severe form of BLM-induced pulmonary toxicity is lung fibrosis. Deglyco-BLM is a molecule derived from BLM in which the sugar residue D-mannosyl-L-glucose disaccharide has been deleted. The objective of this study was to assess the anticancer activity and lung toxicity of deglyco-BLM. We compared the antitumor activity and pulmonary toxicity of intraperitoneally administrated deglyco-BLM and BLM in three rodent models. Pulmonary toxicity was examined in depth after intratracheal administration of both chemotherapeutic agents. The effect of both drugs was further studied in epithelial alveolar cells *in vitro*. We demonstrated in rodent cancer models, including a human Hodgkin's lymphoma xenograft and a syngeneic melanoma model, that intraperitoneal deglyco-BLM is as effective as BLM in inducing tumor regression. Whereas the antitumor effect of BLM was accompanied by a loss of body weight and the development of pulmonary toxicity, deglyco-BLM did not affect body weight and did not engender lung injury. Both molecules induced lung epithelial cell apoptosis after intratracheal administration, but deglyco-BLM lost the ability to induce caspase-1 activation and the production of ROS (reactive oxygen species), transforming growth factor- β 1, and other profibrotic and inflammatory cytokines in the lungs of mice and *in vitro*. Deglyco-BLM should be considered for clinical testing as a less toxic alternative to BLM in cancer therapy.

INTRODUCTION

Bleomycin (BLM) is a potent antineoplastic agent produced by *Streptomyces verticillus*. In clinical practice, it is used in combination chemotherapy regimens to treat malignant lymphoma, germ cell tumors, squamous cell carcinoma, melanoma, and malignant pleural effusion with good results. The pulmonary toxicity of BLM, however, is often a limitation to its use. About 20% of patients treated with BLM develop lung toxicity (1), which may present in various forms (2), with lung fibrosis being the most severe. Among the different risk factors for lung toxicity, the cumulative dosage is a major parameter (1, 2).

Besides its clinical use as an anticancer agent, BLM is currently one of the most studied compounds for the induction of experimental acute pulmonary injury and pulmonary fibrosis in animals (3).

Apoptosis, extended cell cycle arrest, and mitotic cell death are the most commonly cited outcomes of BLM treatment in cancer cells (4). In the lung, in addition to its proapoptotic effect on epithelial and endothelial cells, the drug induces a strong inflammatory response, an increase in reactive oxygen species (ROS) production, and the expression of transforming growth factor- β (TGF- β) (5). These events all play a well-known role in the process of lung fibrosis.

Three main parts characterize the BLM molecule: (i) a metal ion-chelating segment that combines with iron and molecular oxygen to

form an active complex responsible for DNA cleavage, (ii) a bithiazole-containing moiety that contributes to the binding of BLM to DNA, and (iii) a carbohydrate moiety. The exact role of the latter remains unknown.

Deglyco-BLM is a BLM-derived molecule in which the sugar residue D-mannosyl-L-glucose disaccharide located in the glycosylated portion has been deleted (6). Apart from this, deglyco-BLM still has the same structural arrangement as BLM and is a complex molecule of 1047 daltons. Although the role of this sugar is still unknown, *in vitro* studies in laryngeal cancer cells have shown that deglyco-BLM has reduced affinity for DNA and is less effective in mediating DNA cleavage (7). In laryngeal cancer cells, BLM deglycosylation does not alter the ability of BLM to induce cell death through apoptosis in a caspase-independent manner but does suppress the ability of BLM to induce ROS formation (8, 9).

However, how this deletion of the sugar moiety affects the most relevant *in vivo* effects of BLM (antitumor effects and lung toxicity) has not been explored. Here, we demonstrate in different animal models that deglyco-BLM retains the antitumor effect of BLM but lacks any demonstrable fibrotic activity in the lung. This characteristic seems to be associated with the inability of deglyco-BLM to activate caspase-1 and to induce the production of ROS, TGF- β 1, and other profibrotic cytokines in the lung.

RESULTS

Deglyco-BLM has a powerful anticancer effect similar to BLM in mice already bearing a tumor

To assess whether the removal of D-mannosyl-L-glucose disaccharide affected the antitumor effect of BLM, we performed a dose-response experiment to compare the activity of BLM and deglyco-BLM in three

¹INSERM, LNC UMR 866, Laboratoire d'Excellence LipSTIC, Dijon 21079, France. ²Equipe "Heat Shock Proteins" Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Dijon 21079, France. ³Faculty of Medicine and Pharmacy of Dijon, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon 21079, France. ⁴EPHE, Tumor Immunology and Immunotherapy Laboratory, Dijon 21079, France. ⁵Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Dijon 21079, France. ⁶Institut des Biomolécules Max Mousseron, Faculty of Pharmacy, University of Montpellier, Montpellier 34093, France. ⁷Department of Biochemistry, University of Monastir, Monastir 5000, Tunisia. ⁸Anticancer Centre Georges François Leclerc, CGFL, Dijon 21079, France.

*These authors contributed equally to this work.

†These authors codirected this work and contributed equally to this work.

‡Corresponding author. E-mail: philippe.bonniaud@chu-dijon.fr

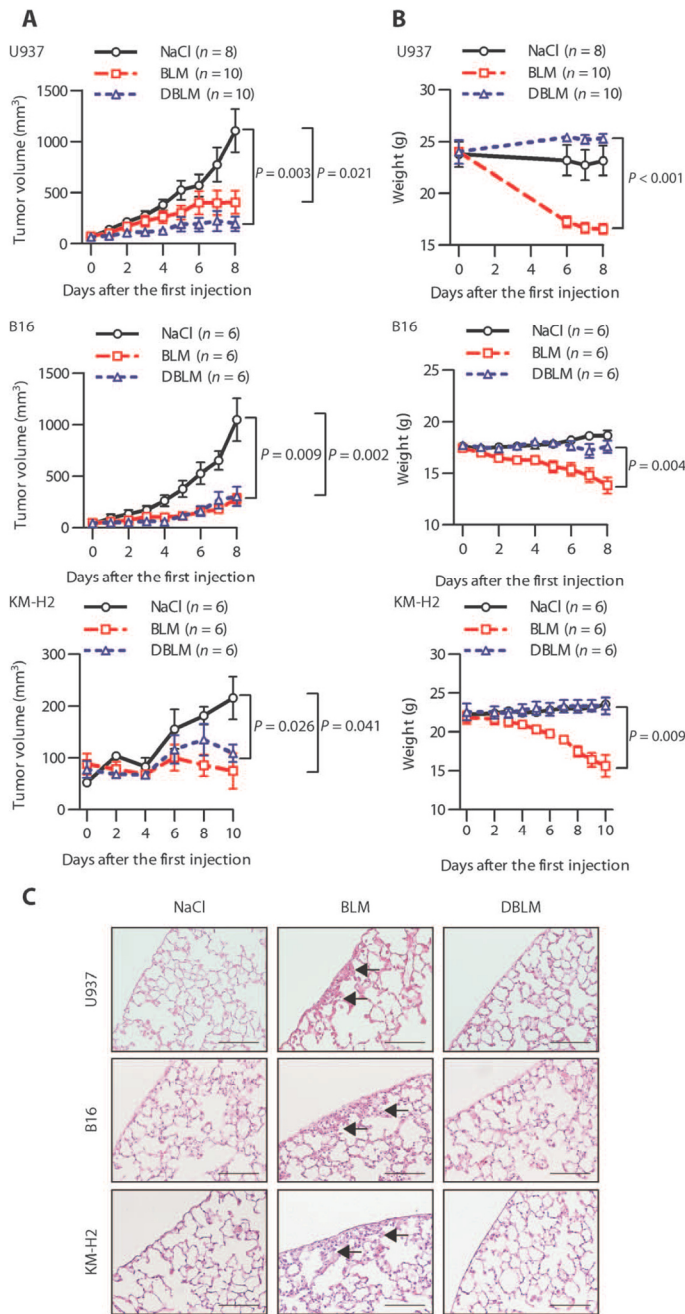


Fig. 1. Deglyco-BLM has an anticancer effect in mice without evidence of toxicity. U937 human leukemia, B16 mouse melanoma, or KM-H2 human Hodgkin’s lymphoma cells were subcutaneously injected into nude, C57BL/6, or NOG mice, respectively. When tumor size reached 62.5 mm³ (day 0), mice received intraperitoneal injections of NaCl, BLM, or deglyco-BLM (DBLM) every other day for 8 days (U937, B16) or 10 days (KM-H2). **(A)** Detailed tumor growth kinetics after injections of BLM or deglyco-BLM (20 mg/kg) or control NaCl for 8 days (U937, B16) or 10 days (KM-H2). **(B)** Animals’ weight after injection of BLM, deglyco-BLM (20 mg/kg), or NaCl. **(C)** Representative histology of mouse lungs 8 or 10 days after intraperitoneal treatment with BLM, deglyco-BLM, or NaCl at the indicated doses [hematoxylin and eosin (H&E) staining; scale bars, 100 μm; arrows highlight the areas of inflammation]. P values were determined using two-tailed Mann-Whitney test.

Table 1. Deglyco-BLM does not induce inflammatory cell recruitment. Quantification of macrophages, neutrophils, and lymphocytes in BALF of C57BL/6 mice. Measurements were made 8 days after intraperitoneal administration of BLM, deglyco-BLM (DBLM; 5, 10, 15, or 20 mg/kg), or NaCl and 4 days after intratracheal injection of NaCl, BLM, or deglyco-BLM (2.5 mg/kg). Data are presented as means ± SEM (n = 6 mice per group and n = 10 for the intratracheal BLM group). Statistics were compared to the NaCl group. P values were determined by two-tailed Mann-Whitney test.

	Cell count (×10 ⁴ /ml)	Macrophages (%)	Neutrophils (%)	Lymphocytes (%)
Intraperitoneal				
NaCl	9.0 ± 1.3	97.4 ± 0.8	0.4 ± 0.2	2.2 ± 0.8
BLM				
5 mg/kg	5.6 ± 1.3	86.3 ± 3.4 (P = 0.008)	2.0 ± 1.2	11.7 ± 3.8 (P = 0.015)
10 mg/kg	17.1 ± 6.9	92.3 ± 2.0 (P = 0.020)	2.3 ± 0.9	5.3 ± 2.4
15 mg/kg	38.8 ± 5.2 (P = 0.005)	79.0 ± 8.0 (P = 0.013)	11.3 ± 7.4	8.5 ± 4.5
20 mg/kg	43.0 ± 8.6 (P = 0.005)	82.5 ± 1.8 (P = 0.005)	5.3 ± 1.7 (P = 0.005)	12.2 ± 1.8 (P = 0.006)
DBLM				
5 mg/kg	6.1 ± 1.1	94 ± 1.6	1.8 ± 1.4	4.2 ± 0.6
10 mg/kg	4.8 ± 0.8	93.6 ± 0.6	1.7 ± 1.2	4.7 ± 0.9
15 mg/kg	5.5 ± 0.7	97.7 ± 0.7	0.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3
20 mg/kg	6.8 ± 0.9	95.4 ± 2.2	2.2 ± 1.7	2.4 ± 0.7
Intratracheal				
NaCl	2.3 ± 0.3	99.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3
BLM	236.6 ± 29.2 (P = 0.001)	76.6 ± 1.9 (P = 0.001)	9.4 ± 1.2 (P = 0.001)	14.0 ± 1.6 (P = 0.001)
DBLM	12.9 ± 2.6	94 ± 1.6	0.5 ± 0.2	2.5 ± 0.3

subcutaneous tumor models in mice (fig. S1A). When the tumor volume reached 62.5 mm³, four doses (5, 10, 15, and 20 mg/kg) of BLM or deglyco-BLM were administered intraperitoneally every other day for 8 to 10 days depending on the model.

We first used a xenograft model of human monocytic leukemia (U937 cells) in nude mice. As shown in Fig. 1A, both drugs demonstrated the same antitumor activity compared to the control NaCl-treated animals; only at the dose of 20 mg/kg the antitumor effect of both drugs was statistically significant compared to the control animals (P = 0.003 and P = 0.021 for deglyco-BLM and BLM, respectively) (Fig. 1A and fig. S1A).

Because this experiment was performed in a xenograft model and because nude mice, which are immunodeficient, may respond differently to proinflammatory and other toxic effects of the treatment, we confirmed the antitumor efficacy of deglyco-BLM in a syngeneic mouse melanoma model (B16 cells). As shown in Fig. 1A and fig. S1A, in this model, BLM and deglyco-BLM also presented similar antitumor effects.

BLM is often used to treat patients with Hodgkin’s disease. Therefore, the antitumor effect of deglyco-BLM was also confirmed in a

subcutaneous xenograft model of human Hodgkin’s lymphoma (KM-H2 cells) in nonobese diabetic–severe combined immunodeficient interleukin-2 (IL-2) receptor γ -chain null (NOG) mice. As in the two previously described models, both drugs showed similar antitumor activity (Fig. 1A and fig. S1A).

In contrast to these results, we found significant differences between BLM and deglyco-BLM with regard to the weight of the treated tumor-bearing animals ($P < 0.001$, $P = 0.004$, and $P = 0.009$ for U937, B16, and KM-H2, respectively; Fig. 1B). We found in the three models that BLM treatment induced a substantial decrease in the animals’ weight, whereas the animals treated with deglyco-BLM did not lose weight compared to the control group even at the higher dose used (Fig. 1B and fig. S1B).

Because pulmonary toxicity is the main unwanted effect of BLM when the drug is used to treat malignancies, we explored whether we reproduced this clinical lung toxicity in our experimental cancer mouse models. Indeed, BLM given at an effective antitumor dose (15 to 20 mg/kg) induced lung damage as demonstrated by histological analysis of the lungs in the three mouse models used in this work (Fig. 1C and fig. S2). In contrast, no lung toxicity was observed with deglyco-BLM, even at the highest dose used (20 mg/kg) (Fig. 1C and fig. S2). To confirm these results, we also quantified the immune cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the syngeneic B16 tumor model. After intraperitoneal administration, BLM increased the total cell count, neutrophils, and lymphocytes. In contrast, in the BALF from animals treated with deglyco-BLM, even at the highest dose (20 mg/kg), the numbers of neutrophils and lymphocytes remained unchanged (Table 1). Therefore, only in BLM-treated animals, but not in deglyco-BLM–treated mice, BALF presented an inflammatory profile consistent with the lung damage observed by histology.

Deglyco-BLM does not induce lung toxicity

We then studied in depth the ability of these two molecules to induce lung injury. BLM-induced pulmonary fibrosis has been extensively studied after intratracheal injection of the drug (3). We therefore compared the effect of intratracheal administration of deglyco-BLM, BLM, or NaCl in C57BL/6 mice. We first determined the effect of three different doses (1.25, 2.5, or 5 mg/kg) of BLM on body weight and mortality. All of the mice treated with BLM at any

of the three doses were lethargic and breathing faster, had ruffled fur, and lost up to 35% body weight by day 10. Mortality was greater than 50%, and the few surviving animals had to be sacrificed by days 7, 8, and 10 for BLM doses of 5, 2.5, and 1.25 mg/kg, respectively, to alleviate suffering (Fig. 2A). In sharp contrast, mice treated with deglyco-BLM (any dose) survived up to day 21 and presented no noticeable increase in their respiratory rate and did not lose body weight compared with control NaCl-treated animals (Fig. 2A). Similarly to what we found after intraperitoneal injection of BLM, there was an increase in neutrophils and lymphocytes in the BALF of mice 4 days after intratracheal administration of BLM as opposed to NaCl- or deglyco-BLM–treated mice, in which only a very minor increase was observed (Table 1).

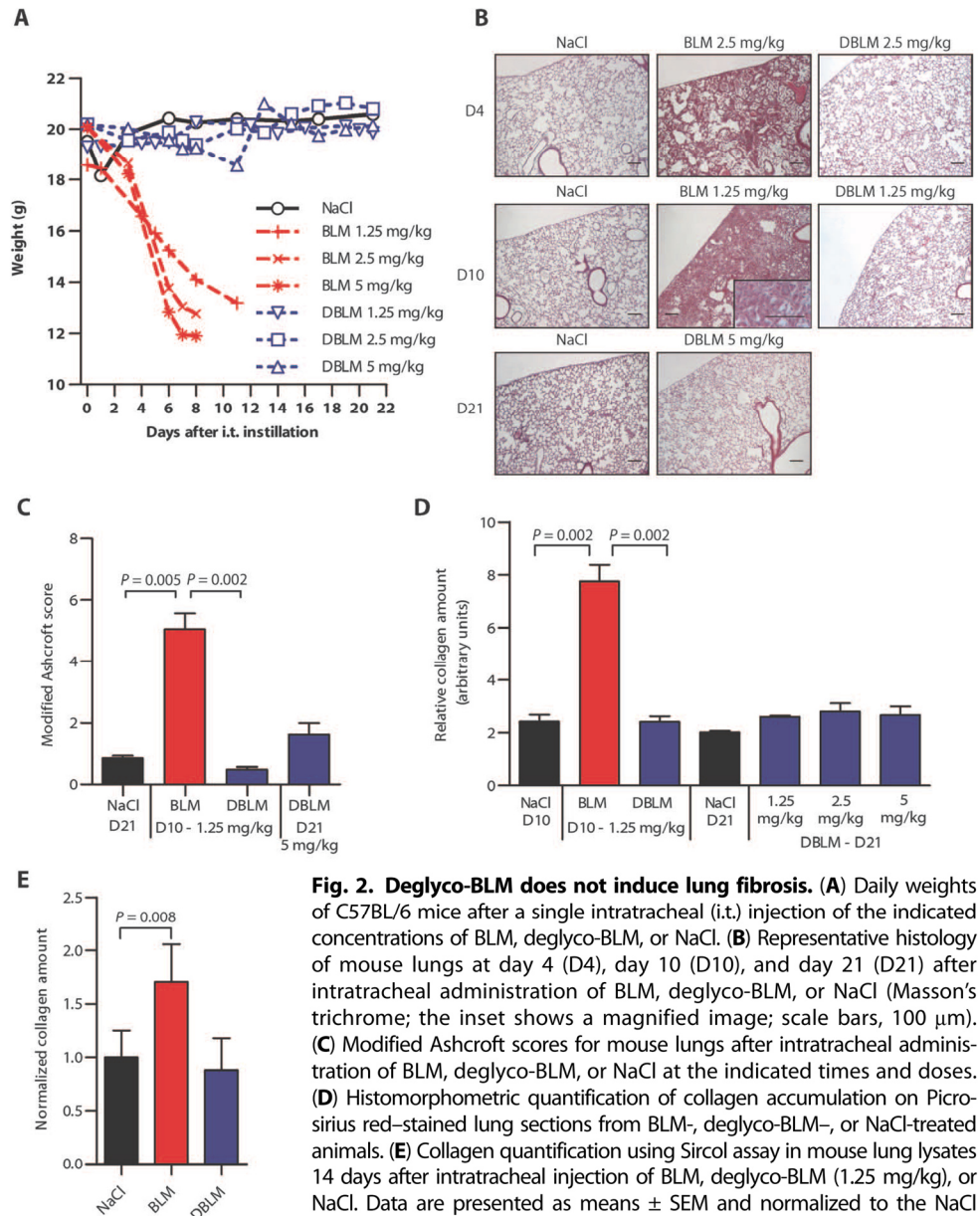


Fig. 2. Deglyco-BLM does not induce lung fibrosis. (A) Daily weights of C57BL/6 mice after a single intratracheal (i.t.) injection of the indicated concentrations of BLM, deglyco-BLM, or NaCl. (B) Representative histology of mouse lungs at day 4 (D4), day 10 (D10), and day 21 (D21) after intratracheal administration of BLM, deglyco-BLM, or NaCl (Masson’s trichrome; the inset shows a magnified image; scale bars, 100 μ m). (C) Modified Ashcroft scores for mouse lungs after intratracheal administration of BLM, deglyco-BLM, or NaCl at the indicated times and doses. (D) Histomorphometric quantification of collagen accumulation on Picrosirius red–stained lung sections from BLM-, deglyco-BLM-, or NaCl-treated animals. (E) Collagen quantification using Sircol assay in mouse lung lysates 14 days after intratracheal injection of BLM, deglyco-BLM (1.25 mg/kg), or NaCl. Data are presented as means \pm SEM and normalized to the NaCl group ($n = 6$ mice per group). P values were determined using two-tailed Mann-Whitney test.

Next, we carried out a pathological examination of lungs from mice (Fig. 2, B and C). After intratracheal administration of BLM, a marked and extensive inflammation was observed at days 4 and 10, and this was also associated with widespread collagen accumulation at day 10 (Fig. 2B). In contrast, lungs from deglyco-BLM-treated mice showed no consistent collagen accumulation at the same time points and only low-grade inflammation at day 4 (Fig. 2B). No changes were found in the lungs from NaCl-treated control mice. By day 21 after deglyco-BLM administration (at any of the three doses used), the lung histology appeared normal even at the highest dose (Fig. 2B). These histological observations correlated with fibrosis assessment by modified Ashcroft scoring (Fig. 2C).

To confirm this histological analysis, we assessed collagen accumulation by histomorphometric measurement using Picrosirius red staining (fig. S3) (10). By day 10 after intratracheal instillation, there was a significant increase in collagen concentration in the lungs of BLM-treated mice (1.25 mg/kg), compared with deglyco-BLM and control animals ($P = 0.002$ versus NaCl and $P = 0.002$ versus deglyco-BLM). At 10 and 21 days, no difference in collagen accumulation was measured between deglyco-BLM (at any of the three doses used) and control animals (Fig. 2D). Histomorphometric analysis was further confirmed by Sircol assay as shown in Fig. 2E.

Deglyco-BLM, in contrast to BLM, does not induce profibrotic events

We analyzed the expression of TGF- β 1, which is considered to be the most potent profibrotic growth factor (11, 12). TGF- β 1 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in BALF from C57BL/6 mice exposed to NaCl, BLM, or deglyco-BLM. Measurements were performed at day 4 after intratracheal instillation of BLM or deglyco-BLM (2.5 mg/kg) and 10 days after intratracheal instillation of BLM or deglyco-BLM (1.25 mg/kg). We found that TGF- β 1 content was significantly higher in BLM-treated animals than in those treated with deglyco-BLM or NaCl at both days 4 and 10 (day 4: $P = 0.002$ versus NaCl and $P = 0.002$ versus deglyco-BLM; day 10: $P = 0.004$ versus NaCl and $P = 0.026$ versus deglyco-BLM; Fig. 3A). No significant difference in the amount of TGF- β 1 was detected between deglyco-BLM-treated and NaCl control mice. As late as day 21, deglyco-BLM treatment did not significantly increase TGF- β 1 levels regardless of the dose used (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) (Fig. 3A). These data on total TGF- β 1 concentrations were confirmed by measuring the active form of TGF- β 1 by a plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) luciferase assay in the lung extracts (Fig. 3B). Similar results were obtained in nude mice re-

ceiving intraperitoneal BLM or deglyco-BLM (20 mg/kg) every other day for 8 days. The concentration of TGF- β 1 in BALF from the nude mice was significantly higher in BLM-treated mice than that in the BALF from mice treated with deglyco-BLM or NaCl ($P = 0.003$ versus NaCl; Fig. 3C).

We also measured other inflammatory cytokines and found that IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) strongly increased in the BALF from BLM compared with deglyco-BLM-treated or control animals (Fig. 3D). In contrast, the concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was found to be lower in BLM mice than in deglyco-BLM and control mice at D10 (Fig. 3D). In a more general approach, we used a cytokine array to determine the concentrations of other cytokines in lung tissues from the treated animals. We found that cytokines known to be present in the setting of lung fibrosis, such as basic fibroblast growth factor (bFGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2), and osteopontin were increased at early time points (day 4) only in BLM-treated animals but not in deglyco-BLM-treated and control mice (fig. S4).

Oxidative stress is involved in the pathogenesis of pulmonary fibrosis (13). Therefore, we determined the amount of ROS by measuring 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), an aldehyde formed during the lipid peroxidation process. Western blot analysis of lungs from either BLM- or deglyco-BLM-treated mice (five animals per group)

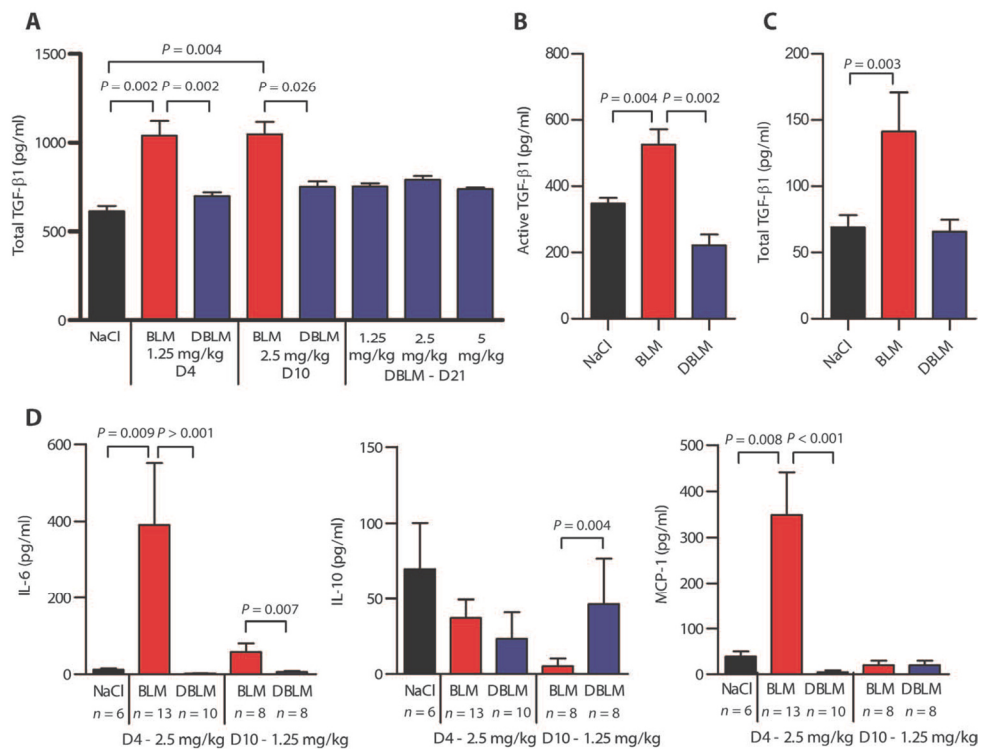


Fig. 3. Deglyco-BLM does not induce profibrotic cytokines. (A to C) TGF- β 1 quantification after injection of BLM, deglyco-BLM, or NaCl intratracheally (1.25 mg/kg) in C57BL/6 mice (A and B) or intraperitoneally (20 mg/kg) in nude mice (C) ($n = 6$ mice per group). Quantification of total TGF- β 1 in BALF by ELISA (A and C) or active TGF- β 1 measurement using PAI-1 luciferase assay in lung extracts (B). (D) IL-6, IL-10, and MCP-1 expression was analyzed by Cytometric Bead Array in BALF at days 4 and 10 after intratracheal administration of DBLM, BLM, or NaCl (five mice per group). P values were determined using two-tailed Mann-Whitney test.

demonstrated a significant increase in 4-HNE only in the lungs from BLM-treated animals ($P = 0.036$ versus NaCl; Fig. 4A). These results were confirmed by labeling the lungs with a superoxide anion marker [dihydroethidium (DHE)] (Fig. 4B). We also assessed ROS production in vitro in human (A549) and murine (MLE-12) alveolar epithelial cell lines. As shown in Fig. 4C, BLM, but not deglyco-BLM, induced ROS (superoxide anion) production. In addition, we observed that neither BLM nor deglyco-BLM was able to trigger nitrogen species production in the lung compared to the control (fig. S5A). This result was confirmed using a Griess nitrite dosage method, which also found no differences (fig. S5B). We also assessed unfolded protein response/endoplasmic reticulum (ER) stress by measuring the expression of binding immunoglobulin protein (BiP), an ER stress-inducible chaperone, in A549 cells after BLM or deglyco-BLM treatment. BLM or deglyco-BLM did not modify BiP expression compared to the ER stressor tunicamycin used as a positive control (fig. S5C).

BLM, but not deglyco-BLM, induces a caspase-1-dependent lung toxicity

Inflammation is known to play an important role in BLM-induced fibrogenesis. We investigated the involvement of caspase-1, a protein implicated in the inflammation process and pulmonary fibrosis (14, 15). We demonstrate here that BLM, but not deglyco-BLM, induces a decrease in the amount of procaspase-1 in the lung lysates of C57BL/6 mice [at day 4 after intratracheal instillation of BLM, deglyco-BLM, or NaCl (2.5 mg/kg)], suggesting cleavage (activation) of this procaspase (Fig. 5A, upper panel). The enhanced caspase-1 activity after BLM was also confirmed on lung sections with fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA) staining for caspase-1 (Fig. 5A, lower panel). As shown in Fig. 5B, among the different cells found within the lung, epithelial alveolar cells (E-cadherin-positive cells) were also positive for caspase-1 activation after BLM treatment. These double-positive staining cells were not observed after deglyco-BLM treatment (Fig. 5B). Procaspase-1 cleavage (activation) by BLM, but not by deglyco-BLM, was confirmed in epithelial alveolar cell lines A549 and MLE-12 (Fig. 5C). The activation of caspase-1 by BLM was observed from 1 to 24 hours after BLM intake by A549 cells, whereas deglyco-BLM induced no significant activation of caspase-1 compared with untreated cells (fig. S6A). In addition, we found that, compared to the control, immune cells did not exhibit increased caspase-1 activity (fig. S6B).

To demonstrate the involvement of the caspase-1 pathway in the BLM-induced fibrosis process, we treated caspase-1-deficient mice (caspase-1^{-/-}) as well as wild-type (caspase-1^{+/+}) mice with intratracheal injection of BLM, deglyco-BLM (1.25 mg/kg), or NaCl as control. BLM-injected caspase-1^{+/+} mice exhib-

ited a rapid loss of weight and had to be euthanized for ethical reasons by day 14, in contrast to caspase-1^{-/-} mice that almost completely recovered from their initial weight loss (Fig. 5D). Deglyco-BLM-injected mice (both wild-type and caspase-1-deficient mice) did not manifest any clinical sign of distress. BALF analysis showed an increase in total cell count after BLM injection in caspase-1^{+/+} mice but not in caspase-1^{-/-} mice (Fig. 5E). Lung histology demonstrated that BLM-induced fibrosis was greatly reduced in caspase-1^{-/-} mice (Fig. 5F). These results confirm a role for caspase-1 in the fibrotic process.

To further study the role of caspase-1, we investigated the potential profibrotic properties of the caspase-1 activator nigericin. The intratracheal injection of nigericin in C57BL/6 mice induced collagen accumulation in the lungs, demonstrating that caspase-1 activation can be sufficient to trigger a lung fibrotic response (Fig. 5G, left panel). Fibrosis induced by nigericin was assessed by histomorphometry, and the results of this measurement were in agreement with the lung histology (Fig. 5G, right panel). We did not observe any caspase-3 activity enhancement after nigericin compared to control in the lungs of these animals (Fig. 5H).

Deglyco-BLM does not induce caspase-1-dependent cell death

The ability of BLM to induce apoptosis has been associated with its antitumorigenic and fibrogenic effects. We used the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay to examine the ability of BLM and deglyco-BLM to induce apoptosis in lung parenchyma of C57BL/6 mice at day 4 after the intratracheal instillation of BLM, deglyco-BLM, or NaCl

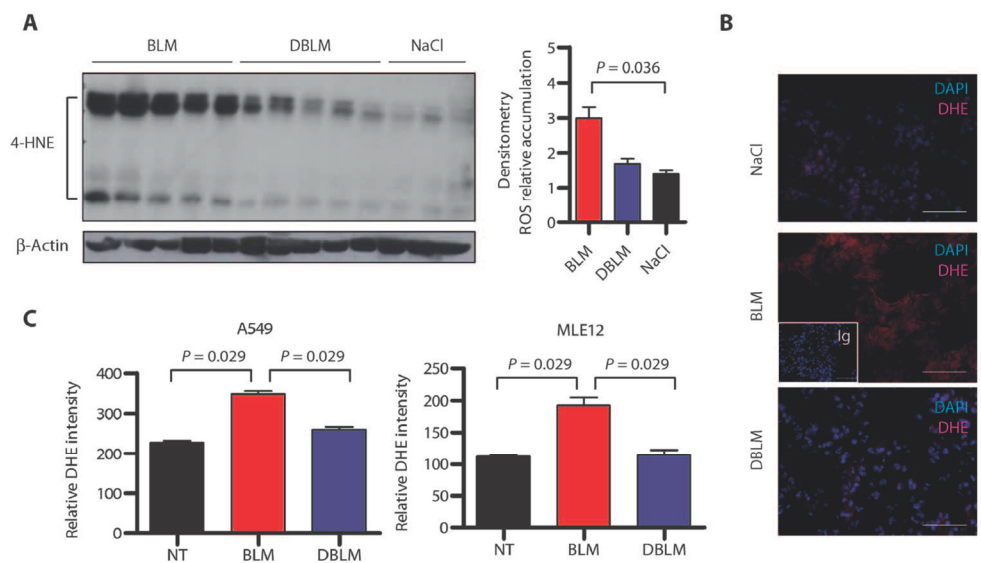


Fig. 4. Deglyco-BLM, in contrast to BLM, does not trigger ROS production. Oxidative stress was studied in lung tissues after intratracheal administration of BLM, deglyco-BLM, or NaCl (2.5 mg/kg). (A) Assessment of 4-HNE content in lung extracts from deglyco-BLM- ($n = 5$), BLM- ($n = 5$), and NaCl-treated mice ($n = 3$). Right panel: quantification by densitometry. (B) DHE staining of lung sections after intratracheal administration of BLM, deglyco-BLM (1.25 mg/kg), or NaCl in C57BL/6 mice ($n = 5$ per group). Scale bars, 50 μ m. DHE, red; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), blue (nuclei). Inset: Ig, negative control. (C) DHE assessment in A549 and MLE12 cells left untreated (NT) or treated with BLM or deglyco-BLM (200 μ M, 24 hours). Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$ per group). Representative data were from three independent experiments. P values were determined using two-tailed Mann-Whitney test.

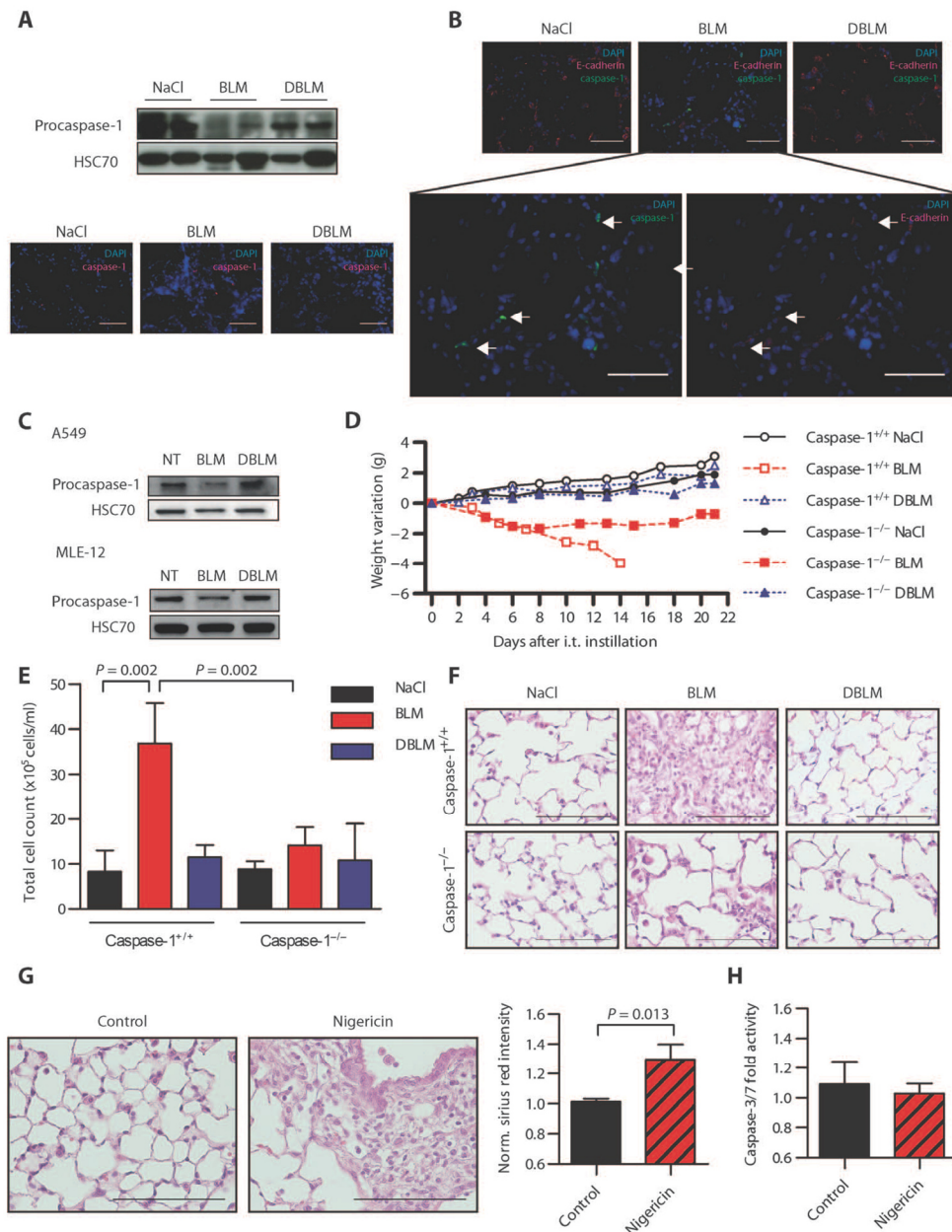


Fig. 5. Deglyco-BLM does not induce caspase-1 activation in the lung. Caspase-1 activity was analyzed in lungs of C57BL/6 animals 4 days after deglyco-BLM, BLM, or NaCl intratracheal injection (2.5 mg/kg). (A) The amounts of procaspase-1 were determined by Western blot on lung lysates (upper panel; HSC70, loading control) and FLICA staining (red) on the lung sections [lower panel; scale bars, 50 μ m; nuclear staining: DAPI (blue)]. (B) Double staining for E-cadherin (red) and FLICA caspase-1 (green) on lung sections [representative observation, $n = 5$ per group; nuclear staining: DAPI (blue); scale bars, 50 μ m; arrows indicate cells with dual staining]. (C) Procaspase-1 quantification in A549 or MLE-12 cells left untreated or treated with 100 μ M BLM or deglyco-BLM. (D to F) Caspase-1-deficient mice (caspase-1^{-/-}) as well as wild-type (caspase-1^{+/+}) mice were treated with intratracheal BLM, deglyco-BLM (1.25 mg/kg), or NaCl ($n = 6$ mice per group). (D) Kinetics of weight variation (change from baseline), (E) total cell count in BALF 14 days after the injection, and (F) representative histology of lungs 14 days after drug administration (H&E staining; scale bars, 100 μ m). (G) C57BL/6 mice were intratracheally injected with nigericin (1.25 mg/kg) or NaCl, and lung fibrosis was assessed by histological analysis of the lungs (left panel; H&E staining; scale bars, 100 μ m) and histomorphometric analysis of collagen content (right panel, means \pm SEM, $n = 6$ mice per group). (H) Caspase-3 and caspase-7 activity was assessed in lung extract from the same mice as in (G). P values were determined using two-tailed Mann-Whitney test.

(2.5 mg/kg). Whereas no staining was observed in control mice, there was similar widespread apoptosis of epithelial cells in the lungs of BLM- and deglyco-BLM-treated mice (Fig. 6A). We also observed a similar proapoptotic effect of BLM and deglyco-BLM when the compounds were given intraperitoneally to C57BL/6 and nude mice (Fig. 6A). Both BLM and deglyco-BLM (intratracheal instillation) induced a similar caspase-3 activity in the lung parenchyma of C57BL/6 mice compared with control (NaCl-treated) animals, in which no caspase-3 cleavage was detected (Fig. 6B and fig. S7). The ability of both BLM and deglyco-BLM to induce cell death was also demonstrated in the noncancerous transformed mouse alveolar epithelial cell line MLE12 (Fig. 6C). Moreover, in these cells, we observed that both deglyco-BLM and BLM were able to induce the activation of apoptotic caspases such as caspase-3/7, caspase-9, and caspase-8 (Fig. 6D).

Finally, we assessed the involvement of caspase-1-dependent cell death (pyroptosis) in BLM cytotoxicity by using a specific peptide inhibitor directed against caspase-1, YVAD. We demonstrated that inhibition of caspase-1 significantly decreased (about twofold, $P < 0.001$ versus BLM alone) cell death induced by BLM, whereas caspase-1 inhibition had no effect on cell death induced by deglyco-BLM treatment (Fig. 6E).

DISCUSSION

Lung toxicity strongly limits the use of BLM, an effective and useful chemotherapeutic agent, particularly in Hodgkin’s lymphoma. Here, we demonstrate that the antitumor activity of the BLM derivative compound deglyco-BLM is similar to that of BLM in three different tumor models, including a Hodgkin’s lymphoma model. We found that deglyco-BLM, in sharp contrast with BLM, is devoid of pulmonary toxicity. These data suggest that the D-mannosyl-L-glucose disaccharide moiety may not be essential for the antitumor activity of BLM but is critical for its toxicity.

BLM is widely used to induce experimental pulmonary fibrosis. Animals injected with BLM also typically exhibit

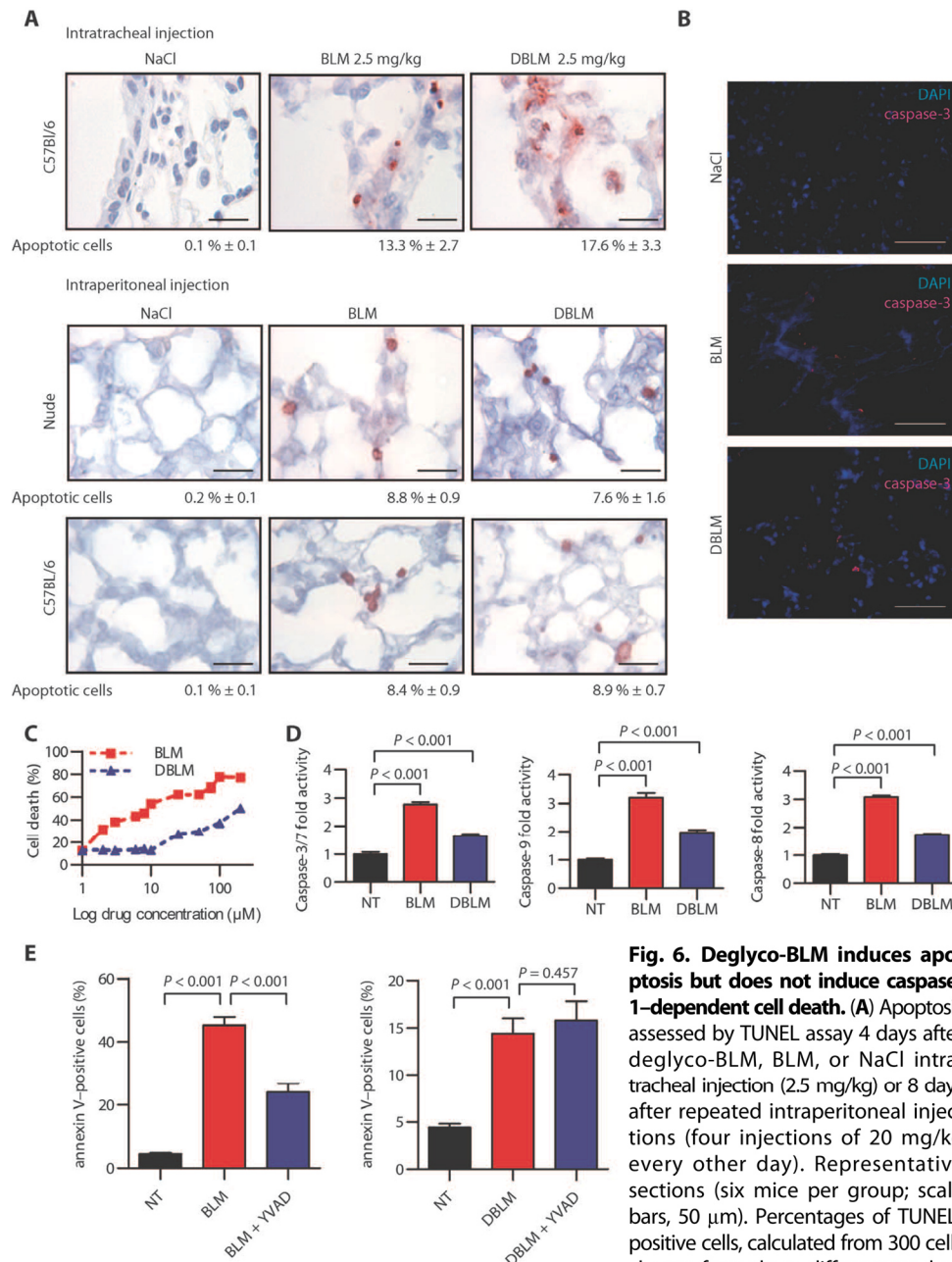


Fig. 6. Deglyco-BLM induces apoptosis but does not induce caspase-1-dependent cell death. (A) Apoptosis assessed by TUNEL assay 4 days after deglyco-BLM, BLM, or NaCl intratracheal injection (2.5 mg/kg) or 8 days after repeated intraperitoneal injections (four injections of 20 mg/kg every other day). Representative sections (six mice per group; scale bars, 50 μm). Percentages of TUNEL-positive cells, calculated from 300 cells chosen from three different random fields, are indicated. (B) Caspase-3 ac-

Epithelial cell apoptosis has been shown to be a triggering event in the initiation of lung fibrosis, and the ability of BLM to induce apoptosis has been well demonstrated in animal models (16). Here, we show that deglyco-BLM is as effective as BLM at inducing epithelial cells' death. This finding agrees with earlier work in laryngeal cancer cells in vitro, where apoptosis induced by deglyco-BLM was quantitatively similar to that induced by BLM (8). However, and in contrast to what has been reported in vitro (17), we found in our in vivo models that both compounds similarly induced caspase-3 activation. The fact that both drugs, BLM and deglyco-BLM, induced a similar caspase-3-dependent apoptosis in mice but pulmonary fibrosis only developed in mice treated with BLM suggests that epithelial cell apoptosis, which is known to be a profibrotic-triggering event, was not sufficient to induce fibrosis initiation and progression, and additional profibrotic events are probably required.

BLM induces lung injuries and subsequent strong inflammation within the first 10 days of intratracheal administration in mice. Inflammation appears essential for fibrogenesis (18, 19) and the induction of pulmonary fibrosis (14, 15), and the ultimate extent of fibrosis in animal models is often proportional to the severity of the initial acute inflammation and injury (5, 20, 21). Pyroptosis, a necrosis-like cell death mechanism, has recently been suggested to be an important triggering event in fibrosis (22). The major hallmark of pyroptosis is the activation of caspase-1 by the inflammasome complex. During pyroptosis, activated caspase-1 perforates the cytoplasmic membrane, and cytoplasmic components are released into the extracellular milieu where they can induce inflammation as observed in vivo in the lung after BLM administration. We demonstrate here that activation of caspase-1 alone (without apoptosis) is able to trigger a fibrotic process in the lung. In our model, we did not find any increase in caspase-1 activity in immune cells, but alveolar epithelial

activity in lung sections from C57BL/6 mice intratracheally injected with BLM, deglyco-BLM (1.25 mg/kg), or NaCl. Representative images; scale bars, 50 μm; FLICA caspase-3 (red); nuclear staining; DAPI (blue)] (C) Cell death induced by increasing concentrations of BLM or deglyco-BLM in MLE12 cells (means ± SEM, n = 5 per group). (D) Measurement of caspase-3/7 (left), caspase-9 (middle), or caspase-8 (left) activity in MLE-12 cells left untreated or treated with BLM or deglyco-BLM (means ± SEM, n = 9 per group). Results are representative of three independent experiments. (E) Cell death (annexin V⁺) induced by BLM or deglyco-BLM (200 μM, 24 hours) evaluated on A549 cells. When indicated, caspase-1 was inhibited using YVAD (100 μM, 1 hour). Data are presented as means ± SEM, n = 13 per group. P values were determined using two-tailed Mann-Whitney test.

clinical adverse effects such as loss of body weight. Our work reveals that administration of deglyco-BLM (intraperitoneally or intratracheally) does not alter the animals' weight and does not induce lung toxicity, in contrast to BLM, which causes severe lung inflammation.

(E-cadherin-positive) cells were found positive for active caspase-1 within the lung of BLM-treated animals. In contrast, deglyco-BLM was unable to trigger caspase-1 activation in vivo or in vitro in alveolar epithelial cells.

It has recently been reported that ROS production could be one of the multiple stresses responsible for the induction of caspase-1 activation (23, 24). We confirmed here *in vivo* that deglyco-BLM does not induce ROS production, unlike BLM. At the same time, both molecules failed to trigger nitrogen species or ER stress. Furthermore, a large body of evidence indicates that BLM-induced ROS production is at the origin of the observed lung inflammation and fibrosis in murine models (3). Together, our data suggest that BLM promotes caspase-1 activation and causes inflammation by inducing ROS production in the lung. This is in line with our observation concerning the absence of inflammation and the lack of toxicity of deglyco-BLM, which does not promote ROS production in the lung. We also found that deglyco-BLM, in contrast to BLM, did not induce TGF- β 1 expression. The lack of inflammation (21), probably attributable to the lack of ROS and caspase-1 activation by deglyco-BLM, may explain the absence of TGF- β 1 overexpression and consequent pulmonary fibrosis.

Clinical trials have evaluated the beneficial effects of the antioxidant *N*-acetylcysteine in fibrotic lung disease (25, 26). Our data support the notion that pulmonary ROS production is at the origin of the pulmonary toxicity of BLM. The fact that deglyco-BLM does not induce ROS production might be explained, at least partially, by its intracellular localization. It has been shown that, upon cellular uptake, the two drugs reveal different intracellular distribution, with a low accumulation of BLM compared with a high accumulation of deglyco-BLM in the nuclei. In contrast, the concentration of BLM is much higher in the cytoplasm. The preferential nuclear location of deglyco-BLM may diminish its interaction with mitochondria, where ROS production mostly occurs (27).

In summary, our work suggests that, in contrast to BLM, deglyco-BLM does not induce detectable pulmonary toxicity or fibrosis after intraperitoneal administration or intratracheal instillation in mice, even when used at high doses. Although deglyco-BLM induces apoptosis *in vivo*, it does not induce ROS generation or caspase-1 activation, which would lead to inflammation or TGF- β 1 overexpression. The main limitation of this study is that the mechanism through which ROS and caspase-1 induce TGF- β and fibrosis is still unknown. Also, although we demonstrate that the antitumor effectiveness of deglyco-BLM and BLM is the same in different experimental models, future studies will need to determine whether deglyco-BLM can be substituted for BLM in the treatment of malignancies in patients.

MATERIALS AND METHODS

Study design

The antitumor activity of deglyco-BLM was assessed by intraperitoneal injection in three different tumor models in mice: human monocytic leukemia (U937), murine melanoma (B16), and human Hodgkin's lymphoma (KM-H2). Tumor growth was measured daily in a blinded manner (the person measuring the tumors was ignorant of the treatment received by the animals). Pulmonary toxicity was analyzed after intratracheal administration of the drugs in C57BL/6 mice. The animals were always randomly assigned to each treatment group. For ethical reasons, the animals were sacrificed when they reached a weight of less than 14 g. No exclusion criteria of animals were applied for data processing.

Deglyco-BLM

Deglyco-BLM was obtained by hydrogen fluoride (HF) solvolysis using a classical HF line designed for the cleavage of peptides from the resin

support in solid-phase synthesis (6). Briefly, crude dried BLM (A2 and B2 isoforms; Merck Chemicals) and anisole were mixed in a Kel-F reactor at 0°C, and dry HF was added. After stirring for 1 hour, HF was removed *in vacuo*, and anhydrous ether was added to the oily residue to extract anisole. Deglyco-BLM was obtained from the ether as a white solid, and its purity (>95%) was assessed by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry.

Animal procedures

Seven-week-old female C57BL/6, nude, or NOG mice (Charles River), weighing 20 to 25 g, were housed in filter-topped cages, under specific pathogen-free conditions, in a 12-hour light/dark cycle with environmental enrichment. 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, and experiments were approved by the Comité d'Éthique de l'Expérimentation Animale (C2EA) du grand campus Dijon, no. 105.

Antitumor effect. Human monocytic leukemia U937 (20×10^6), melanoma B16 (15×10^3), or human Hodgkin's lymphoma KM-H2 cells (20×10^6), all diluted in 0.9% NaCl, were subcutaneously administered (100 μ l) in nude, C57BL/6, or NOG mice, respectively. All cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and were free of mycoplasma contamination. When tumor size reached 5×5 mm, the animals received intraperitoneal injection of 0.9% NaCl (vehicle), BLM (Merck Chemicals), or deglyco-BLM (5, 10, 15, or 20 mg/kg) every other day until day 8 (U937 or B16) or day 10 (KM-H2).

Lung toxicity. C57BL/6 mice (wild type or caspase-1-deficient) received intratracheal instillations (22-gauge cannula) of 50 μ l of BLM, deglyco-BLM (1.25, 2.5, or 5 mg/kg in 50 μ l of 0.9% NaCl), or nigericin (1.25 mg/kg; Sigma-Aldrich). Control mice received 0.9% NaCl. BALF and lungs were harvested as described (28).

Fibrosis assessment

Pulmonary fibrosis was scored from 0 (normal lung) to 8 (completely fibrotic lung) using a modified Ashcroft score (29). Transverse sections of lungs were paraffin-embedded and stained with Masson's trichrome stain and Picrosirius red. Collagen was quantified on paraffin sections stained with Picrosirius red (12, 28). Collagen was also quantified in lung lysates using Sircol assay (Biocolor Ltd.) according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as collagen amount normalized to the NaCl condition.

Oxidative stress analysis

Protein extraction was carried out by lysis of whole lungs of animals treated with NaCl, BLM, or deglyco-BLM. Equal quantities (50 μ g) of protein were loaded in each lane on SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and lipid peroxidation was visualized with 4-HNE monoclonal antibody (HNEJ-2, Genta).

Superoxide was detected in lung sections and *in vitro* in A549 and MLE12 (ATCC) cells using DHE staining. Sections (10 min at room temperature) or cells (15 min at 37°C) were incubated with 10 μ M DHE (Life Technologies). After washing, DHE-stained sections were analyzed by microscopy (Axio Imager.M2, Zeiss) or with a LSR II flow cytometer (BD Biosciences).

Cell death and caspase activity assessment

Cell death was observed by TUNEL staining of lung sections with the ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit according to

the manufacturer's protocol (Chemicon) or in vitro with the Annexin V Detection Kit (BD Biosciences). Annexin V–fluorescein isothiocyanate/7-aminoactinomycin D double staining was determined by flow cytometry (LSR II) and analyzed with FlowJo software. Caspase-1 inhibition was determined using the peptide inhibitor YVAD (Bachem AG).

Caspase-1 activity was detected with FLICA (Caspase-1 assay kit, Eurobio) following the supplier's instructions and analyzed by flow cytometry or by microscopy. Activity of caspase-3/7, caspase-8, and caspase-9 was assessed with a commercial kit (Promega), and signal was read with an EnVision luminometer (PerkinElmer).

Cytokine quantification

Total mouse TGF- β 1 was determined by ELISA (Quantikine Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- β 1 Immunoassay, R&D Systems). Active TGF- β 1 was quantified with a PAI-1 luciferase assay. Briefly, MLEC [mink lung epithelial cells; gift from M. Kolb (30)] stably transfected with a plasmid bearing the firefly luciferase reporter gene under the control of the PAI-1 promoter were cultured in the presence of lung lysates. Luciferase activity was revealed with a luciferase assay system (Promega). The expression of IL-6, IL-10, MCP-1, interferon- γ , TNF, and IL-12p70 was assessed using the Cytometric Array (CBA Mouse Inflammation Kit, BD Biosciences).

Western blot

Proteins were run through SDS-PAGE. After transfer, polyvinylidene difluoride membranes were incubated with caspase-1 (AHZ0082, Life Technologies), HSC70 (clone B-6, Clinisciences), or β -actin (clone AC-15, Sigma-Aldrich) antibodies and secondary IgG antibody linked to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Statistical analyses

Comparisons were performed with the Mann-Whitney test (two-tailed, 95% confidence intervals) in GraphPad Prism (GraphPad Software). When specified, data were normalized to the NaCl condition of the corresponding experiment. Original data are provided in table S1.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/8/326/326ra20/DC1

- Fig. S1. Deglyco-BLM has the same antitumoral profile as BLM but lacks toxic side effects.
 Fig. S2. BLM, but not deglyco-BLM, induces lung toxicity.
 Fig. S3. BLM, but not deglyco-BLM, induces collagen accumulation in the lung.
 Fig. S4. Deglyco-BLM does not induce inflammation and fibrosis-related cytokines.
 Fig. S5. Deglyco-BLM and BLM do not induce nitrogen species or ER stress in A549 cells.
 Fig. S6. BLM induces caspase-1 activation in alveolar epithelial cells but not in immune cells.
 Fig. S7. Deglyco-BLM and BLM induce similar caspase-3 cleavage.
 Table S1. Original data (provided as a separate Excel file).

REFERENCES AND NOTES

1. P. Camus, P. Bonniaud, A. Fanton, C. Camus, N. Baudaun, P. Foucher, Drug-induced and iatrogenic infiltrative lung disease. *Clin. Chest Med.* **25**, 479–519 (2004).
2. P. Camus, The drug-induced respiratory disease website, www.pneumotox.com (accessed 21 September 2015).
3. A. Moeller, K. Ask, D. Warburton, J. Gaudie, M. Kolb, The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 362–382 (2008).

4. J. Chen, J. Stubbe, Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 102–112 (2005).
5. B. B. Moore, C. M. Hogaboam, Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **294**, L152–L160 (2008).
6. A. Kenani, G. Lamblin, J.-P. Hélichart, A convenient method for the cleavage of the α -mannosyl-L-glucose disaccharide from bleomycin-A₂. *Carbohydr. Res.* **177**, 81–89 (1988).
7. O. Tounekti, A. Kenani, N. Foray, S. Orłowski, L. M. Mir, The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br. J. Cancer* **84**, 1272–1279 (2001).
8. S. Brahim, S. Aroui, K. Abid, A. Kenani, Involvement of C-jun NH₂-terminal kinase and apoptosis induced factor in apoptosis induced by deglycosylated bleomycin in laryngeal carcinoma cells. *Cell Biol. Int.* **33**, 964–970 (2009).
9. S. Brahim, A. Bettaieb, A. Kenani, Deglycosylated bleomycin triggers apoptosis in laryngeal carcinoma cells in a caspase and reactive oxygen species independent manner. *J. Oral Pathol. Med.* **37**, 352–357 (2008).
10. P. Bonniaud, P. J. Margetts, M. Kolb, J. A. Schroeder, A. M. Kapoun, D. Damm, A. Murphy, S. Chakravarty, S. Dugar, L. Higgins, A. A. Protter, J. Gaudie, Progressive transforming growth factor β 1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 889–898 (2005).
11. G. C. Blobbe, W. P. Schiemann, H. F. Lodish, Role of transforming growth factor β in human disease. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1350–1358 (2000).
12. P. J. Sime, Z. Xing, F. L. Graham, K. G. Csaky, J. Gaudie, Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest.* **100**, 768–776 (1997).
13. J. Cortijo, M. Cerdá-Nicolás, A. Serrano, G. Bioque, J. M. Estrela, F. Santangelo, A. Esteras, A. Lombart-Bosch, E. J. Morcillo, Attenuation by oral N-acetylcysteine of bleomycin-induced lung injury in rats. *Eur. Respir. J.* **17**, 1228–1235 (2001).
14. P. Gasse, C. Mary, I. Guenon, N. Noulin, S. Charron, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, S. Akira, V. F. J. Quesniaux, V. Lagente, B. Ryffel, I. Couillin, IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3786–3799 (2007).
15. P. Gasse, N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Pétrilli, J. Tschoep, V. Lagente, V. F. J. Quesniaux, B. Ryffel, I. Couillin, Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 903–913 (2009).
16. P. W. Noble, R. J. Homer, Idiopathic pulmonary fibrosis: New insights into pathogenesis. *Clin. Chest Med.* **25**, 749–758 (2004).
17. S. Brahim, K. Abid, A. Kenani, Role of carbohydrate moiety of bleomycin-A₂ in caspase-3 activation and internucleosomal chromatin fragmentation in apoptosis of laryngeal carcinoma cells. *Cell Biol. Int.* **32**, 171–177 (2008).
18. L. J. Dixon, M. Berk, S. Thapaliya, B. G. Papouchado, A. E. Feldstein, Caspase-1-mediated regulation of fibrogenesis in diet-induced steatohepatitis. *Lab. Invest.* **92**, 713–723 (2012).
19. C. M. Artlett, S. Sassi-Gaha, J. L. Rieger, A. C. Boesteanu, C. A. Feghali-Bostwick, P. D. Katsikis, The inflammasome activating caspase 1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **63**, 3563–3574 (2011).
20. P. F. Piguet, M. A. Collart, G. E. Grau, A. P. Sappino, P. Vassalli, Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* **344**, 245–247 (1990).
21. M. Kolb, P. J. Margetts, D. C. Anthony, F. Pitossi, J. Gaudie, Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **107**, 1529–1536 (2001).
22. A. Wree, A. Eguchi, M. D. McGeough, C. A. Pena, C. D. Johnson, A. Canbay, H. M. Hoffman, A. E. Feldstein, NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* **59**, 898–910 (2013).
23. V. A. K. Rathinam, S. K. Vanaja, K. A. Fitzgerald, Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* **13**, 333–342 (2012).
24. M. E. Heid, P. A. Keyel, C. Kamga, S. Shiva, S. C. Watkins, R. D. Salter, Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J. Immunol.* **191**, 5230–5238 (2013).
25. M. Demedts, J. Behr, R. Buhl, U. Costabel, R. Dekhuijzen, H. M. Jansen, W. MacNee, M. Thomeer, B. Wallaert, F. Laurent, A. G. Nicholson, E. K. Verbeken, J. Verschakelen, C. D. R. Flower, F. Capron, S. Petruzzelli, P. De Vuyst, J. M. M. van den Bosch, E. Rodriguez-Becerra, G. Corvasce, I. Lankhorst, M. Sardina, M. Montanari; IFIGENIA Study Group, High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2229–2242 (2005).
26. F. J. Martinez, J. A. de Andrade, K. J. Anstrom, T. E. King Jr., G. Raghu; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network (IPFnet), Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2093–2101 (2014).
27. A. Kénani, C. Bailly, R. Houssin, J. P. Hélichart, Comparative subcellular distribution of the copper complexes of bleomycin-A₂ and deglyco-bleomycin-A₂. *Anticancer Drugs* **5**, 199–201 (1994).
28. N. Decollogne, M. Kolb, P. J. Margetts, F. Menetrier, Y. Artur, C. Garrido, J. Gaudie, P. Camus, P. Bonniaud, TGF- β 1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J. Immunol.* **179**, 6043–6051 (2007).

29. R.-H. Hubner, W. Gitter, N. E. El Mokhtari, M. Mathiak, M. Both, H. Bolte, S. Freitag-Wolf, B. Bewig, Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* **44**, 507–517 (2008).
30. M. Abe, J. G. Harpel, C. N. Metz, I. Nunes, D. J. Loskutoff, D. B. Rifkin, An assay for transforming growth factor- β using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Anal. Biochem.* **216**, 276–284 (1994).

Acknowledgments: We thank V. Saint-Giorgio and A. Bouchot for their invaluable help and P. Bastable for correcting the manuscript. We thank M. Kolb for giving us MLEC cells and L. Apetoh and F. Ghiringhelli for providing us the caspase-1-deficient mice. **Funding:** This work has received funding from the European Union, 7th Framework Programme, HEALTH-F2-2007-202224 European IPF Network, the Fonds Européen de Développement Économique et Régional, Agence Nationale de la Recherche (11-BSV-011-01 meso-IPF, ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx), La Ligue Régionale Grand Est Contre le Cancer, Le conseil Régional de Bourgogne, l'Institut National du Cancer (INCa), and the Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire." G.W., O.B., and P.S.B. are supported by Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire" and Société de Pneumologie de Langue Française. O.B. is supported by La Ligue National Contre le Cancer. The C.G. team has

the "label d'excellence" from La Ligue National Contre le Cancer and L'Association pour la "Recherche sur le Cancer" and belongs to the LabEx LipSTIC and GR-Ex. **Authors contributions:** O.B., G.W., P.S.B., and N.D. designed and performed all experiments and analyzed the data. C.R. and F.G. helped in setting up the in vivo models and performed in vivo experiments. G.B. and P.C. analyzed lung fibrosis data. J.-F.H., A.K., and A.B. provided the deglycosylated bleomycin. C.G. and P.B. designed the study, supervised the overall project, analyzed the data, and wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Submitted 30 October 2015

Accepted 8 January 2016

Published 17 February 2016

10.1126/scitranslmed.aad7785

Citation: O. Burgy, G. Wettstein, P. S. Bellaye, N. Decologne, C. Racoeur, F. Goirand, G. Beltramo, J.-F. Hernandez, A. Kenani, P. Camus, A. Bettaieb, C. Garrido, P. Bonniaud, Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Sci. Transl. Med.* **8**, 326ra20 (2016).

La toxicité des agents de chimiothérapie est souvent une limite à leur utilisation en cancérologie. Dans ce travail, nous démontrons que la déglyco-bléomycine possède une activité anti-tumorale semblable à la bléomycine dans plusieurs modèles de tumeurs mais n'induit pas de toxicité pulmonaire chez la souris.

La mort cellulaire des cellules épithéliales est considérée comme un élément déclencheur majeur du processus de fibrose. Plusieurs études ont décrit une augmentation de la mort des cellules épithéliales alvéolaires, dans le contexte de la FPI ou dans la toxicité de la bléomycine. Après injection intratrachéale, la déglyco-bléomycine et la bléomycine induisent le même pourcentage de mort cellulaire. La différence de toxicité induite par les deux molécules suggère que l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires n'est pas suffisante pour induire la fibrogenèse et que d'autres facteurs pro-fibrosants sont probablement requis.

La pyroptose a récemment été suggérée comme un mécanisme déclenchant important de la fibrose (126). Durant la pyroptose, le contenu cellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire pouvant entraîner une inflammation comme observé *in vivo* dans les poumons après injection de bléomycine. De plus, nous montrons que l'activation de la caspase-1 seule (sans apoptose associée) est capable d'induire une réaction fibrotique.

Les ROS ont été décrits comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3 induisant l'activation de la caspase-1. Plusieurs études ont montré que la génération de ROS est à l'origine de l'inflammation pulmonaire induite après bléomycine dans les modèles murins. Après déglyco-bléomycine, aucune production de ROS n'a été observée dans nos modèles murins. L'incapacité de la déglyco-bléomycine à favoriser la production de ROS peut s'expliquer par sa localisation subcellulaire. Lors de l'import dans la cellule, la bléomycine s'accumule dans deux compartiments cellulaires : le noyau, et la mitochondrie où les ROS sont produit. Une étude a montré que la déglyco-bléomycine s'accumule principalement dans le noyau et très peu dans la mitochondrie comparé à la bléomycine (419).

Ce travail apporte une preuve de concept montrant que la déglyco-bléomycine possède la même activité anti-tumorale que la bléomycine mais est dépourvue de toxicité pulmonaire. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si la déglyco-bléomycine pourrait être une alternative à l'utilisation de la bléomycine chez l'homme.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La fibrose pulmonaire est une maladie complexe caractérisée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire dans le parenchyme pulmonaire. Les causes et les éléments déclencheurs à l'origine de la fibrose pulmonaire sont le plus souvent inconnus même si certains médicaments et notamment des chimiothérapies peuvent induire des fibroses. De nombreuses études montrent la place de l'inflammation dans le processus de fibrose. Sa réelle contribution dans la forme idiopathique de la fibrose pulmonaire est discutée sur la base notamment de certains essais cliniques négatifs. Cependant, que ça soit dans ses formes idiopathiques ou dans les cas de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, les principaux acteurs de la fibrogenèse sont connus. L'importance de lésions pulmonaires et des altérations des cellules structurales pulmonaires composant l'épithélium alvéolaire ou le mésothélium pleural a été démontrée dans la littérature. La prolifération des myofibroblastes et leur caractère agressif, caractérisés par la synthèse de matrice extracellulaire dans les conditions fibrotiques, font de ces cellules un autre acteur majeur du processus de fibrose. L'origine de ces cellules est encore largement débattue et plusieurs types cellulaires semblent pouvoir acquérir un phénotype de myofibroblaste via un processus d'activation où le TGF- β 1 joue un rôle central. Les cellules mésothéliales pleurales, encore très peu étudiées, peuvent subir une transformation dans des conditions pro-fibrosantes leur permettant de participer à la population de myofibroblastes.

Les différents projets menés au cours de ce travail de thèse nous ont permis d'aborder deux axes de recherche avec 1) le rôle de la plèvre et des cellules pleurales et 2) l'implication de l'axe caspase-1/IL-1 β dans le processus de fibrose pulmonaire. La première partie de ce chapitre sera centrée sur le potentiel thérapeutique de l'inhibition d' α B-crystallin, avant d'aborder l'intérêt du modèle de fibrose pleuro-pulmonaire induit par injection intraveineuse de bléomycine. Le rôle de la caspase-1 dans la fibrogenèse pulmonaire sera abordé, avec une attention particulière sur son implication au niveau des cellules mésothéliales pleurales. Enfin, nous terminerons ce chapitre par une discussion des impacts que notre étude de la déglyco-bléomycine peut avoir sur la prise en charge des patients en cancérologie.

I. α B-crystallin : régulateur de la voie des Smad

Le TGF- β 1 est considéré comme l'élément pro-fibrosant majeur au cours de la fibrose pulmonaire par son action d'activation des fibroblastes et de transformation des cellules structurales pulmonaires via l'EMT. Les actions du TGF- β 1 passent dans la cellule par différentes voies de signalisation dites classiques (voie des Smad) ou non classiques (voie des

MAPK, PI3K et JNK) (194). Nous avons montré dans un précédent travail que des souris déficientes pour l'expression d' α B-crystallin étaient protégées de la fibrose pulmonaire induite par différents stimuli pro-fibrosants (211). En analysant la voie du TGF- β 1 sur les cellules épithéliales alvéolaires et fibroblastes pulmonaires, nous avons observé un rôle clé d' α B-crystallin sur la localisation subcellulaire de Smad4. Avec l'étude sur α B-crystallin réalisée au cours de ce travail de thèse (article 1), nous confirmons le rôle d' α B-crystallin comme un régulateur clé de la voie des Smad et donc de la signalisation du TGF- β 1.

La localisation de Smad4 est un élément clé de la voie des Smad et est à ce titre finement régulée. Nous avons montré qu' α B-crystallin est capable de contribuer à la localisation nucléaire de Smad4 en le protégeant de l'ubiquitination par la E3 ubiquitine ligase TIF-1 γ . TIF-1 γ est décrit pour ubiquitiner Smad4, favorisant son export nucléaire. TIF-1 γ a donc un rôle de régulateur négatif de la voie des Smad. De façon intéressante, l'expression de TIF-1 γ est augmentée dans les souris déficientes pour α B-crystallin. Nous avons débuté dans l'équipe un nouveau projet pour rechercher le rôle de TIF-1 γ dans la FPI. De récents travaux de l'équipe, encore non publiés, ont montré que TIF-1 γ est surexprimé dans les poumons de patients atteints de FPI. De façon intéressante, une partie de ce marquage TIF-1 γ semble localisé au niveau des cellules pleurales. De plus, le rôle de TIF-1 γ dépasserait la seule action sur Smad4. En effet, TIF-1 γ est aussi connu pour entraîner l'ubiquitination du récepteur au TGF- β 1, entraînant sa dégradation via le protéasome, dans les cellules hématopoïétiques. Nous avons confirmé ces données au niveau de l'épithélium pulmonaire.

L'équipe a déjà montré le rôle des cellules mésothéliales dans la fibrose pleurale et également la fibrose pleuro-pulmonaire. En effet, elle a 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, en acquérant un phénotype myofibroblastique, migrent au sein du parenchyme pour initier la fibrose pulmonaire. L'inhibition d'HSP27 est capable de limiter ce phénomène en inhibant l'EMT. Dans l'article 1 de cette thèse, 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 est inhibée chez les souris α B-crystallin^{-/-} alors que chez les souris sauvages un « envahissement » du parenchyme pulmonaire sous-jacent par les cellules mésothéliales est observé. Cependant les mécanismes que nous avons mis en évidence lors de ces deux études (sur HSP27 puis sur α B-crystallin) 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 des cellules mésothéliales.

Nous pensons que l'inhibition des deux HSP simultanément, pourrait apporter un effet bénéfique synergique sur la fibrogenèse. La recherche de l'inhibition conjointe d'HSP27 et d' α B-crystallin dans nos différents modèles de fibrose chez le rongeur constitue donc la prochaine étape de ce projet.

II. Intérêt de la mise au point d'un nouveau modèle de fibrose pleuro-pulmonaire

En clinique, le diagnostic de la FPI est largement basé sur des évidences radiologiques qui font appel à des techniques d'imagerie non invasives pour les patients (420). Les patients atteints de FPI montrent une image souvent caractéristique de lésions fibreuses organisées en structures dites de « rayons de miel » et principalement localisées dans les régions sous-pleurales des poumons. Ce dernier point est une caractéristique clé de la maladie. En cancérologie chez les patients développant une toxicité pulmonaire de la bléomycine, la fibrose est également localisée vers les régions du poumons proches de la plèvre. Dans notre équipe, nous pensons que la plèvre et les cellules mésothéliales peuvent jouer un rôle important dans l'initiation de la fibrogenèse observée dans la fibrose pulmonaire idiopathique ou induite par la bléomycine.

La FPI est une maladie faisant intervenir différents processus et acteurs cellulaires et cytokiniques. L'étude du processus fibrosant nécessite l'utilisation de modèles animaux, souvent chez le rongeur, pour prendre en compte la nature multifactorielle de la maladie. Dans la littérature, la plupart des études menées sur modèles animaux utilisent le modèle de fibrose induite par la bléomycine administrée par voie intra-trachéale (311). Ce modèle entraîne une fibrose pulmonaire qui se développe de façon hétérogène dans le parenchyme pulmonaire. De par la voie d'administration, l'épithélium alvéolaire est massivement ciblé produisant une fibrose de distribution aléatoire dans le poumon et ne récapitulant pas l'origine sous-pleurale des lésions observée dans la fibrose pulmonaire chez l'homme. Notre équipe a mis au point des modèles de fibrose pleuro-pulmonaire qui ont pour avantage de prendre en compte le rôle des cellules mésothéliales pleurales. Cependant, ces modèles présentent des inconvénients,

notamment que la réaction fibrosante progresse significativement mais seulement de façon limitée dans le parenchyme pulmonaire.

Comme nous l'avons vu en introduction, de nombreuses stratégies thérapeutiques, nées de preuves de concept obtenues par l'utilisation de modèles animaux, ne font pas preuve de leur efficacité chez l'homme. L'intérêt de développer et caractériser les modèles animaux est aussi d'obtenir de « meilleurs » modèles d'études, plus proches de la pathologie étudiée, pour tester de potentielles nouvelles options thérapeutiques de façon plus robuste.

Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle d'induction de fibrose pulmonaire par injections intraveineuses répétées de bléomycine. Ce modèle permet d'induire des fibroses pulmonaires d'origine majoritairement sous-pleurale avec une progression importante dans le parenchyme comparé aux modèles utilisés dans l'article 1, ce qui est plus pertinent pour s'approcher de la modélisation de la physiopathologie de la FPI. Ce travail nous a permis de décrire le rôle de la plèvre et des cellules mésothéliales dans la fibrogenèse induite par injections intraveineuses répétées de bléomycine, ce qui n'a jamais été fait au-delà de la simple constatation de l'atteinte sous-pleurale observée histologiquement. Cependant, la caractérisation de ce modèle n'est pas complète et certains points clé de la FPI ne sont pas reproduits ou connus. La fibrose induite dans notre modèle a été étudiée au plus tard trois semaines après le début des injections de bléomycine du fait de l'apparition de signes cliniques de détresse chez les animaux. L'analyse de la progression de la fibrogenèse à des temps plus tardifs serait indispensable pour mieux caractériser ce modèle.

III. Rôle de l'axe caspase-1/IL-1 β dans la fibrose pulmonaire

L'inflammation est un processus clé dans l'initiation des phénomènes de la fibrose mais reste largement discutée entre les spécialistes dans le cadre de la FPI. Les stratégies anti-inflammatoires et/ou immunosuppressives sont capables d'interférer avec la fibrose induite expérimentalement chez le rongeur, mais leur efficacité n'a pas été démontrée dans des essais cliniques chez des patients atteints de FPI. Cependant, dans les modèles animaux, les études sont souvent réalisées dans des phases précoces de la réaction fibrosante. Au contraire, les patients atteints de FPI sont souvent diagnostiqués lorsque la fibrose est déjà installée et est en train de progresser. Cette différence peut expliquer le manque de reproductibilité entre les résultats des modèles animaux et les données des essais cliniques. Néanmoins, il existe de

réelles évidences en faveur d'une altération des mécanismes de l'inflammation et de l'immunité chez les patients atteints de FPI. Le nombre de cellules immunitaires dans les LBA de patients atteints de FPI est supérieur à celui observé dans des échantillons de sujets sains, même fumeurs où l'existence d'une phase d'inflammation est largement connue (55). Cette augmentation des cellules de l'immunité semble être corrélée à la sévérité et la progression de la maladie (52, 54).

Comme nous l'avons vu, la voie caspase-1/IL-1 β est un axe central de l'inflammation et l'IL-1 β est considérée comme une cytokine clé du processus inflammatoire. L'implication de cette voie est connue dans la fibrose pulmonaire dans la toxicité pulmonaire de la bléomycine chez le rongeur (11). Dans la FPI, un polymorphisme du gène codant l'IL-1ra, entraînant une perte de fonction du récepteur antagoniste, a été corrélé au risque de développer la maladie (156). Un point de contrôle essentiel de l'action de l'IL-1 β est son activation. Les protéines impliquées en amont de l'activation de l'IL-1 β , comme NLRP3, ASC ou caspase-1, semblent indispensables à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rongeur. Bien que la majorité des études concernant l'axe caspase-1/IL-1 β s'intéresse particulièrement aux cellules immunitaires, où il a été premièrement décrit. Cependant plusieurs études ont montré l'implication de l'axe caspase-1/IL-1 β au niveau de cellules structurales dans différents contextes avec la synthèse d'IL-1 β par des AEC II primaires issues de souris injectées avec de la bléomycine, la pyroptose des hépatocytes dans un modèle de fibrose hépatique ou encore le rôle essentiel de NLRP3 dans l'EMT de cellules de cancer du côlon (12, 126, 152).

Notre étude confirme l'importance de la voie caspase-1/IL-1 β dans la fibrogénèse induite par la bléomycine. Dans notre étude sur la déglyco-bléomycine (article 3), nous avons observé un rôle clé du phénomène de pyroptose dans la cytotoxicité de la bléomycine *in vitro*. L'ensemble des données de cette étude laisse penser que l'induction de la pyroptose dans les cellules épithéliales alvéolaires est à la base de la toxicité pulmonaire de la bléomycine. Avec notre étude sur la plèvre (article 2), nous apportons également des évidences d'activation de la voie caspase-1/IL-1 β au niveau des cellules mésothéliales pleurales. Dans ces cellules, deux phénomènes sont observés. La bléomycine induit la libération d'IL-1 β sous forme active par les cellules mésothéliales pleurales, pouvant contribuer à l'augmentation d'un état inflammatoire et favoriser la fibrogénèse. De plus, nos travaux laissent penser que l'activation de la caspase-1 dans les cellules mésothéliales pleurales est aussi impliquée dans le processus de transformation de ces cellules. L'activation de la caspase-1 par la nigéricine est capable d'induire des changements ressemblant à ceux observés lors de l'EMT. Ces changements

interviennent rapidement et des effets sont déjà visibles à 2h sur les cellules Met5A. Ceci suggère que ce rôle est indépendant de la maturation de l'IL-1 β , car nous les avons observés dans un système en présence d'IL-1ra, bloquant l'action de la cytokine inflammatoire (Figure 48).

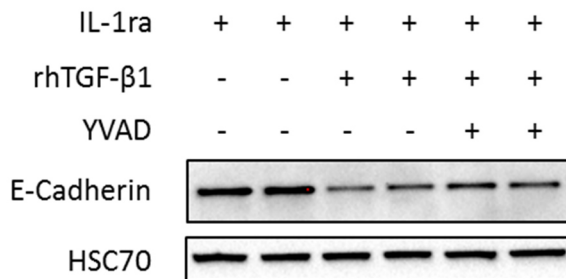


Figure 48. L'inhibition de la caspase-1 interfère avec la transformation induite par le TGF- β 1. Des cellules Met5A ont été cultivées en présence d'IL-1ra (toutes les conditions) et de TGF- β 1 recombinant, avec ou sans YVAD (inhibiteur de caspase-1). HSC70 : contrôle de charge. Résultat représentatif d'une seule expérience.

De récentes études ont montré un rôle de NLRP3 dans des phénomènes de transformation cellulaire. Les caspases sont connues pour avoir un rôle dans les processus de différenciation, polarisation ou transformation des cellules. A ce moment, le rôle exacte de la caspase-1 dans un mécanisme de transformation cellulaire n'est pas clair et nécessite d'être recherché. Les études montrant un rôle de la caspase-1 dans la fibrose pulmonaire s'appuient uniquement sur le modèle à la bléomycine, ce qui est pertinent vis-à-vis de l'implication forte de la caspase-1 dans l'inflammation via la maturation de l'IL-1 β . Cependant, il serait intéressant de tester l'implication de la caspase-1 dans un modèle de fibrose pulmonaire sans inflammation comme le modèle AdTGF- β 1. Ceci pourrait confirmer, ou non, notre hypothèse que la caspase-1 a un rôle direct dans un processus de transformation de type EMT.

IV. Implication de la forme déglycosylée de la bléomycine

Une des principales limitations de l'utilisation des chimiothérapies est leur toxicité. La bléomycine est un agent anti-cancéreux utilisé dans le traitement de cancer comme le lymphome de Hodgkin, ou certaines tumeurs des cellules germinales. Ces cancers touchent principalement de jeunes patients et la toxicité pulmonaire de la bléomycine est un véritable frein à l'utilisation de cette chimiothérapie très efficace.

La bléomycine déglycosylée (déglyco-bléomycine) est une molécule dérivée de la bléomycine sur laquelle le disaccharide D-mannosyl-L-glucose, localisé dans la partie glycosylée, a été retiré (417). En dehors de ceci, la déglyco-bléomycine et la bléomycine ont la même structure. La déglyco-bléomycine est une molécule de 1047 Da. Bien que le rôle de la

partie sucrée de la molécule de BLM ne soit pas connu, il a été montré *in vitro*, sur des cellules de cancer laryngé, que la déglyco-bléomycine avait une affinité moindre pour l'ADN et était par conséquent moins efficace dans le clivage de celui-ci (297). Dans ce même modèle cellulaire, il a été montré que la déglycosilation de la bléomycine n'altérait pas sa capacité à induire la mort cellulaire par apoptose *in vitro* indépendamment de la mise en jeu des caspases, mais par contre, inhibait la production de ROS normalement induite par la forme complète de la bléomycine (418).

La formation de ROS est un élément clé dans l'initiation de la fibrogenèse observée dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. L'analyse de la toxicité pulmonaire de la déglyco-bléomycine semblait donc pertinente. Dans l'article 3 de cette thèse, nous avons montré que la déglyco-bléomycine possède une activité anti-tumorale comparable à celle de la bléomycine dans plusieurs modèles de croissance tumorale, y compris dans un modèle de lymphome de Hodgkin pertinent avec l'utilisation de la bléomycine en clinique. En parallèle, nous avons montré que la déglyco-bléomycine n'induit pas de toxicité pulmonaire dans nos modèles chez le rongeur. Notre travail suggère que l'absence de toxicité de la déglyco-bléomycine peut s'expliquer par l'absence d'activation de la caspase-1. Nous pensons que la production de ROS, éléments connus pour activer la voie caspase-1/IL-1 β , est l'élément clé expliquant la différence de toxicité pulmonaire entre la bléomycine et sa forme déglycosylée.

Les premières études *in vitro* concernant la déglyco-bléomycine ont montré que cette forme s'accumule dans des compartiments cellulaires différents comparé à la bléomycine. La déglyco-bléomycine se concentre principalement dans le noyau alors que la bléomycine peut s'accumuler aussi au niveau des mitochondries. Les mitochondries semblent être un facteur déterminant dans la toxicité de la bléomycine. Elles sont le site de production de ROS dans la cellule. De façon intéressante, une étude a montré que des cellules A549 délétées d'ADN mitochondrial semblent résistantes à la cytotoxicité de la bléomycine (296).

Récemment, deux études ont montré que le disaccharide de la bléomycine semble important et favorise l'accumulation cellulaire de la molécule (421, 422). Cependant, ces études utilisent exclusivement des systèmes *in vitro* de cellules cancéreuses en culture. D'autres recherches sont nécessaires avant de pouvoir présenter la déglyco-bléomycine comme une alternative à l'utilisation de la bléomycine. Il sera nécessaire de confirmer notre étude sur d'autres modèles de croissance tumorale. Nous voulons aussi d'étudier l'action anti-tumorale

de la déglyco-bléomycine dans un système dépourvu de la caspase-1 afin de comprendre en détails les mécanismes impliqués dans son activité anti-tumorale.

V. Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse nous ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la fibrogenèse pulmonaire, dans le cadre de la toxicité pulmonaire de la bléomycine ou dans le cadre de la FPI. 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 désordres fibreux. Nos travaux confortent que les cellules mésothéliales pleurales sont des acteurs importants de la fibrogenèse dans différents modèles animaux de fibrose pulmonaire. Nous avons confirmé que cibler α B-crystallin pourrait déboucher sur une option thérapeutique dans les maladies fibrosantes. De plus, nos travaux ont mis en avant l'importance de la voie caspase-1/IL-1 β dans la fibrogenèse. Nous confirmons que son inhibition pourrait avoir un rôle dans le développement de futures thérapies. Enfin, dans un dernier travail, nous avons mis en évidence l'absence de toxicité pulmonaire de la déglyco-bléomycine. Cette étude apporte une première preuve de concept pour l'utilisation de cette molécule comme une alternative à la bléomycine.

REFERENCES

1. Raghu G, Chen SY, Hou Q, Yeh WS, and Collard HR. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18-64 years old. *The European respiratory journal*. 2016;48(1):179-86.
2. King TE, Jr., Pardo A, and Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011;378(9807):1949-61.
3. Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, and Morales MA. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological research*. 2015;97(122-30).
4. Bonniaud P, Georges M, Favrolt N, and Camus P. [Drug-induced interstitial lung diseases]. *La Revue du praticien*. 2014;64(7):951-6.
5. De A, Guryev I, LaRiviere A, Kato R, Wee CP, Mascarenhas L, Keens TG, and Venkatramani R. Pulmonary function abnormalities in childhood cancer survivors treated with bleomycin. *Pediatric blood & cancer*. 2014;61(9):1679-84.
6. Rimmer MJ, Dixon AK, Flower CD, and Sikora K. Bleomycin lung: computed tomographic observations. *The British journal of radiology*. 1985;58(695):1041-5.
7. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):524-9.
8. 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(9):1205-6.
9. 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(9):1206-7; discussion 7-8.
10. Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, and Marsh CB. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(2):287-301.
11. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulain N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(12):3786-99.
12. Aumiller V, Balsara N, Wilhelm J, Gunther A, and Konigshoff M. WNT/beta-catenin signaling induces IL-1beta expression by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(1):96-104.
13. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, and Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry*. 2013;82(323-55).
14. Wettstein G, Bellaye PS, Micheau O, and Bonniaud P. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(10):1680-6.
15. Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, and Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters*. 2013;332(2):275-85.
16. Bellaye PS, Burgy O, Causse S, Garrido C, and Bonniaud P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? *Pharmacology & therapeutics*. 2014;143(2):119-32.
17. Meltzer EB, and Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008;3(8).
18. Ley B, Collard HR, and King TE, Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(4):431-40.

19. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, and McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *The European respiratory journal*. 2015;46(3):795-806.
20. Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, Brown KK, Kaner RJ, King TE, Jr., Lasky JA, Loyd JE, Noth I, Olman MA, et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(7):636-43.
21. Kolb MR, and Richeldi L. Viruses and acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: rest in peace? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(12):1583-4.
22. Wootton SC, Kim DS, Kondoh Y, Chen E, Lee JS, Song JW, Huh JW, Taniguchi H, Chiu C, Boushey H, et al. Viral infection in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(12):1698-702.
23. Raghu G, and Selman M. Nintedanib and pirfenidone. New antifibrotic treatments indicated for idiopathic pulmonary fibrosis offer hopes and raises questions. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;191(3):252-4.
24. Fernandez IE, and Eickelberg O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2012;9(3):111-6.
25. Corvol H, Flamein F, Epaud R, Clement A, and Guillot L. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(8-9):1643-51.
26. Bellaye PS, and Kolb M. Why do patients get idiopathic pulmonary fibrosis? Current concepts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *BMC medicine*. 2015;13(176).
27. Mungunsukh O, Griffin AJ, Lee YH, and Day RM. Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;298(5):L696-703.
28. Leach HG, Chrobak I, Han R, and Trojanowska M. Endothelial cells recruit macrophages and contribute to a fibrotic milieu in bleomycin lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(6):1093-101.
29. Drakopanagiotakis F, Xifteri A, Polychronopoulos V, and Bouros D. Apoptosis in lung injury and fibrosis. *The European respiratory journal*. 2008;32(6):1631-8.
30. Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, and Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *Journal of clinical pathology*. 2001;54(2):132-8.
31. Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, and Hara N. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997;16(1):91-101.
32. Kuwano K, Kunitake R, Maeyama T, Hagimoto N, Kawasaki M, Matsuba T, Yoshimi M, Inoshima I, Yoshida K, and Hara N. Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280(2):L316-25.
33. Budinger GR, Mutlu GM, Eisenbart J, Fuller AC, Bellmeyer AA, Baker CM, Wilson M, Ridge K, Barrett TA, Lee VY, et al. Proapoptotic Bid is required for pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(12):4604-9.

34. Buckley S, Shi W, Xu W, Frey MR, Moats R, Pardo A, Selman M, and Warburton D. Increased alveolar soluble annexin V promotes lung inflammation and fibrosis. *The European respiratory journal*. 2015;46(5):1417-29.
35. Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kaneko Y, and Hara N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997;17(3):272-8.
36. Wang L, Scabilloni JF, Antonini JM, Rojanasakul Y, Castranova V, and Mercer RR. Induction of secondary apoptosis, inflammation, and lung fibrosis after intratracheal instillation of apoptotic cells in rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(4):L695-L702.
37. Im J, Kim K, Hergert P, and Nho RS. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of decoy receptor 3. *The Journal of pathology*. 2016.
38. Larson-Casey JL, Deshane JS, Ryan AJ, Thannickal VJ, and Carter AB. Macrophage Akt1 Kinase-Mediated Mitophagy Modulates Apoptosis Resistance and Pulmonary Fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):582-96.
39. Barron L, and Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(5):G723-8.
40. Obayashi Y, Yamadori I, Fujita J, Yoshinouchi T, Ueda N, and Takahara J. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 1997;112(5):1338-43.
41. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, and Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):890-8.
42. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, and Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cellular and molecular biology*. 1991;37(8):823-9.
43. Hutchison N, Fligny C, and Duffield JS. Resident mesenchymal cells and fibrosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(7):962-71.
44. Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, and Hartl D. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2016.
45. Ayaub EA, Kolb PS, Mohammed-Ali Z, Tat V, Murphy J, Bellaye PS, Shimbori C, Boivin FJ, Lai R, Lynn EG, et al. GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of pathology*. 2016.
46. Byrne AJ, Maher TM, and Lloyd CM. Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? *Trends in molecular medicine*. 2016;22(4):303-16.
47. Birjandi SZ, Palchevskiy V, Xue YY, Nunez S, Kern R, Weigt SS, Lynch JP, 3rd, Chatila TA, and Belperio JA. CD4+CD25hiFoxp3+ Cells Exacerbate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *The American journal of pathology*. 2016.
48. Helene M, Lake-Bullock V, Zhu J, Hao H, Cohen DA, and Kaplan AM. T cell independence of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of leukocyte biology*. 1999;65(2):187-95.
49. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research N, Raghu G, Anstrom KJ, King TE, Jr., Lasky JA, and Martinez FJ. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2012;366(21):1968-77.

50. Domagala-Kulawik J, Skirecki T, Maskey-Warzechowska M, Grubek-Jaworska H, and Chazan R. Bronchoalveolar lavage total cell count in interstitial lung diseases--does it matter? *Inflammation*. 2012;35(3):803-9.
51. Boomars KA, Schweizer RC, Zanen P, van den Bosch JM, Lammers JW, and Koenderman L. Eosinophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage from idiopathic pulmonary fibrosis is dependent on cytokine priming of eosinophils. *The European respiratory journal*. 1998;11(5):1009-14.
52. Daniil Z, Kitsanta P, Kapotsis G, Mathioudaki M, Kollintza A, Karatza M, Milic-Emili J, Roussos C, and Papiris SA. CD8+ T lymphocytes in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*. 2005;6(81).
53. Marchal-Somme J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, and Soler P. Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of immunology*. 2006;176(10):5735-9.
54. Balestro E, Calabrese F, Turato G, Lunardi F, Bazzan E, Marulli G, Biondini D, Rossi E, Sanduzzi A, Rea F, et al. Immune Inflammation and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PloS one*. 2016;11(5):e0154516.
55. Schupp JC, Binder H, Jager B, Cillis G, Zissel G, Muller-Quernheim J, and Prasse A. Macrophage activation in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one*. 2015;10(1):e0116775.
56. Feghali-Bostwick CA, Tsai CG, Valentine VG, Kantrow S, Stoner MW, Pilewski JM, Gadgil A, George MP, Gibson KF, Choi AM, et al. Cellular and humoral autoreactivity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of immunology*. 2007;179(4):2592-9.
57. Kahloon RA, Xue J, Bhargava A, Csizmadia E, Otterbein L, Kass DJ, Bon J, Soejima M, Levesque MC, Lindell KO, et al. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(7):768-75.
58. Francois A, Gombault A, Villeret B, Alsaleh G, Fanny M, Gasse P, Adam SM, Crestani B, Sibilia J, Schneider P, et al. B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis. *Journal of autoimmunity*. 2015;56(1-11).
59. Thannickal VJ, and Horowitz JC. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):350-6.
60. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
61. Vandivier RW, Henson PM, and Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*. 2006;129(6):1673-82.
62. Morimoto K, Janssen WJ, and Terada M. Defective efferocytosis by alveolar macrophages in IPF patients. *Respiratory medicine*. 2012;106(12):1800-3.
63. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, and Gauldie J. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(12):1529-36.
64. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, and Kolb M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of immunology*. 2005;175(8):5390-5.
65. Takizawa H, Satoh M, Okazaki H, Matsuzaki G, Suzuki N, Ishii A, Suko M, Okudaira H, Morita Y, and Ito K. Increased IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with sarcoidosis: correlation with the clinical parameters. *Clinical and experimental immunology*. 1997;107(1):175-81.

66. Le TT, Karmouty-Quintana H, Melicoff E, Le TT, Weng T, Chen NY, Pedroza M, Zhou Y, Davies J, Philip K, et al. Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis. *Journal of immunology*. 2014;193(7):3755-68.
67. Sullivan DE, Ferris M, Nguyen H, Abboud E, and Brody AR. TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(8B):1866-76.
68. Liu JY, Brass DM, Hoyle GW, and Brody AR. TNF-alpha receptor knockout mice are protected from the fibroproliferative effects of inhaled asbestos fibers. *The American journal of pathology*. 1998;153(6):1839-47.
69. Redente EF, Keith RC, Janssen W, Henson PM, Ortiz LA, Downey GP, Bratton DL, and Riches DW. Tumor necrosis factor-alpha accelerates the resolution of established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;50(4):825-37.
70. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095-147.
71. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, and Schmidt JA. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(14):5227-31.
72. Vince JE, and Silke J. The intersection of cell death and inflammasome activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(11-12):2349-67.
73. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992;356(6372):768-74.
74. Fantuzzi G, and Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *Journal of clinical immunology*. 1999;19(1):1-11.
75. Man SM, and Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(1):7-21.
76. Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F, Boireau W, Simon B, Ryffel B, Connat JL, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nature medicine*. 2013;19(1):57-64.
77. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, et al. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nature immunology*. 2014;15(8):727-37.
78. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;179(10):903-13.
79. Martinon F, Burns K, and Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 2002;10(2):417-26.
80. Bae JY, and Park HH. Crystal structure of NALP3 protein pyrin domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(45):39528-36.
81. Lamkanfi M, and Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 2012;28(137-61).

82. Schattgen SA, and Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunological reviews*. 2011;243(1):109-18.
83. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology*. 2006;7(6):576-82.
84. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, and Tschopp J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 2008;452(7183):103-7.
85. Wilson JE, Petrucelli AS, Chen L, Koblansky AA, Truax AD, Oyama Y, Rogers AB, Brickey WJ, Wang Y, Schneider M, et al. Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. *Nature medicine*. 2015;21(8):906-13.
86. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, Gong YN, Peng X, Xi JJ, Chen S, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*. 2014;513(7517):237-41.
87. Kim ML, Chae JJ, Park YH, De Nardo D, Stirzaker RA, Ko HJ, Tye H, Cengia L, DiRago L, Metcalf D, et al. Aberrant actin depolymerization triggers the pyrin inflammasome and autoinflammatory disease that is dependent on IL-18, not IL-1beta. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(6):927-38.
88. Gombault A, Baron L, and Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Frontiers in immunology*. 2012;3(414).
89. Riteau N, Baron L, Villeret B, Guillou N, Savigny F, Ryffel B, Rassendren F, Le Bert M, Gombault A, and Couillin I. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell death & disease*. 2012;3(e403).
90. Jabaut J, Ather JL, Taracanova A, Poynter ME, and Ckless K. Mitochondria-targeted drugs enhance Nlrp3 inflammasome-dependent IL-1beta secretion in association with alterations in cellular redox and energy status. *Free radical biology & medicine*. 2013;60(233-45).
91. Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, and Salter RD. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *Journal of immunology*. 2013;191(10):5230-8.
92. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, and Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221-5.
93. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012;36(3):401-14.
94. Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, and Nunez G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142-53.
95. Schmid-Burgk JL, Chauhan D, Schmidt T, Ebert TS, Reinhardt J, Endl E, and Hornung V. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(1):103-9.
96. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, and Nunez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 2016;530(7590):354-7.
97. Van Hauwermeiren F, and Lamkanfi M. The NEK-sus of the NLRP3 inflammasome. *Nature immunology*. 2016;17(3):223-4.

98. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, and Gabel CA. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(1):125-32.
99. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, and Nunez G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity*. 2007;26(4):433-43.
100. Chen Z, Jin N, Narasaraju T, Chen J, McFarland LR, Scott M, and Liu L. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;319(3):774-80.
101. Pelegrin P, and Surprenant A. The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic signalling*. 2009;5(2):129-37.
102. Broz P, and Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(7):407-20.
103. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;479(7371):117-21.
104. Ruhl S, and Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *European journal of immunology*. 2015;45(10):2927-36.
105. Zhang L, Chen S, Ruan J, Wu J, Tong AB, Yin Q, Li Y, David L, Lu A, Wang WL, et al. Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science*. 2015;350(6259):404-9.
106. Lu A, Li Y, Yin Q, Ruan J, Yu X, Egelman E, and Wu H. Plasticity in PYD assembly revealed by cryo-EM structure of the PYD filament of AIM2. *Cell discovery*. 2015;1(
107. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schroder GF, Fitzgerald KA, Wu H, and Egelman EH. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 2014;156(6):1193-206.
108. Tzeng TJ, Schattgen S, Monks B, Wang D, Cerny A, Latz E, Fitzgerald K, and Golenbock DT. A Fluorescent Reporter Mouse for Inflammasome Assembly Demonstrates an Important Role for Cell-Bound and Free ASC Specks during In Vivo Infection. *Cell reports*. 2016.
109. Dick MS, Sborgi L, Ruhl S, Hiller S, and Broz P. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nature communications*. 2016;7(11929).
110. Baroja-Mazo A, Martin-Sanchez F, Gomez AI, Martinez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, Barbera-Cremades M, Yague J, Ruiz-Ortiz E, Anton J, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature immunology*. 2014;15(8):738-48.
111. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.
112. Eder C. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology*. 2009;214(7):543-53.
113. Ellson CD, Dunmore R, Hogaboam CM, Sleeman MA, and Murray LA. Danger-associated molecular patterns and danger signals in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;51(2):163-8.
114. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, and Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal*. 1990;9(5):1503-10.
115. Lopez-Castejon G, and Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine & growth factor reviews*. 2011;22(4):189-95.

116. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, and Dubyak GR. P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *Journal of immunology*. 2009;182(8):5052-62.
117. Welner RS, Amabile G, Bararia D, Czibere A, Yang H, Zhang H, Pontes LL, Ye M, Levantini E, Di Ruscio A, et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia by blocking cytokine alterations found in normal stem and progenitor cells. *Cancer cell*. 2015;27(5):671-81.
118. Dinarello CA, and Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *The New England journal of medicine*. 1993;328(2):106-13.
119. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White MR, Dinarello CA, and Apte RN. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *Journal of immunology*. 2011;187(9):4835-43.
120. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, Dinarello CA, and Paul WE. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(17):7119-24.
121. Mi S, Li Z, Yang HZ, Liu H, Wang JP, Ma YG, Wang XX, Liu HZ, Sun W, and Hu ZW. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. *Journal of immunology*. 2011;187(6):3003-14.
122. Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, Flavell RA, Yuan J, Sansonetti PJ, and Zychlinsky A. Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(49):32895-900.
123. Jin Y, Li H, Xie G, Chen S, Wu S, and Fang X. Sevoflurane combined with ATP activates caspase-1 and triggers caspase-1-dependent pyroptosis in murine J774 macrophages. *Inflammation*. 2013;36(2):330-6.
124. Reisetter AC, Stebounova LV, Baltrusaitis J, Powers L, Gupta A, Grassian VH, and Monick MM. Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(24):21844-52.
125. Chen H, Lu Y, Cao Z, Ma Q, Pi H, Fang Y, Yu Z, Hu H, and Zhou Z. Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells. *Toxicology letters*. 2016;246(7-16).
126. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, and Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*. 2014;59(3):898-910.
127. Yang WL, Sharma A, Wang Z, Li Z, Fan J, and Wang P. Cold-inducible RNA-binding protein causes endothelial dysfunction via activation of Nlrp3 inflammasome. *Scientific reports*. 2016;6(26571).
128. Bergsbaken T, Fink SL, and Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(2):99-109.
129. Chow SH, Deo P, and Naderer T. Macrophage cell death in microbial infections. *Cellular microbiology*. 2016;18(4):466-74.
130. Jorgensen I, and Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological reviews*. 2015;265(1):130-42.
131. Fink SL, and Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular microbiology*. 2006;8(11):1812-25.
132. Labbe K, and Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell death and differentiation*. 2008;15(9):1339-49.

133. Geng Y, Ma Q, Liu YN, Peng N, Yuan FF, Li XG, Li M, Wu YS, Li BL, Song WB, et al. Heatstroke induces liver injury via IL-1beta and HMGB1-induced pyroptosis. *Journal of hepatology*. 2015;63(3):622-33.
134. de Gassart A, and Martinon F. Pyroptosis: Caspase-11 Unlocks the Gates of Death. *Immunity*. 2015;43(5):835-7.
135. Draganov D, Gopalakrishna-Pillai S, Chen YR, Zuckerman N, Moeller S, Wang C, Ann D, and Lee PP. Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Scientific reports*. 2015;5(16222).
136. Yang D, He Y, Munoz-Planillo R, Liu Q, and Nunez G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity*. 2015;43(5):923-32.
137. de Vasconcelos NM, Van Opdenbosch N, and Lamkanfi M. Inflammasomes as polyvalent cell death platforms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(11-12):2335-47.
138. Lage SL, Amarante-Mendes GP, and Bortoluci KR. Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. *Methods*. 2013;61(2):110-6.
139. Abe J, and Morrell C. Pyroptosis as a Regulated Form of Necrosis: PI+/Annexin V-/High Caspase 1/Low Caspase 9 Activity in Cells = Pyroptosis? *Circulation research*. 2016;118(10):1457-60.
140. Man SM, and Kanneganti TD. Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis. *Cell research*. 2015;25(11):1183-4.
141. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, and Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science*. 2016;352(6281):aaf2154.
142. Saeki N, Usui T, Aoyagi K, Kim DH, Sato M, Mabuchi T, Yanagihara K, Ogawa K, Sakamoto H, Yoshida T, et al. Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA-D) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes, chromosomes & cancer*. 2009;48(3):261-71.
143. Saeki N, Kim DH, Usui T, Aoyagi K, Tatsuta T, Aoki K, Yanagihara K, Tamura M, Mizushima H, Sakamoto H, et al. GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF-beta-dependent apoptotic signalling. *Oncogene*. 2007;26(45):6488-98.
144. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang DC, and Shao F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. 2016;535(7610):111-6.
145. He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, and Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell research*. 2015;25(12):1285-98.
146. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, and Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015;526(7575):660-5.
147. Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N, Ciferri C, Dixit VM, and Dueber EC. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):7858-63.
148. Cerqueira DM, Pereira MS, Silva AL, Cunha LD, and Zamboni DS. Caspase-1 but Not Caspase-11 Is Required for NLRC4-Mediated Pyroptosis and Restriction of Infection by Flagellated Legionella Species in Mouse Macrophages and In Vivo. *Journal of immunology*. 2015;195(5):2303-11.

149. Brough D, and Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 5):772-81.
150. Zanoni I, Tan Y, Di Gioia M, Broggi A, Ruan J, Shi J, Donado CA, Shao F, Wu H, Springstead JR, et al. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science*. 2016;352(6290):1232-6.
151. Wang W, Wang X, Chun J, Vilaysane A, Clark S, French G, Bracey NA, Trpkov K, Bonni S, Duff HJ, et al. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *Journal of immunology*. 2013;190(3):1239-49.
152. Wang H, Wang Y, Du Q, Lu P, Fan H, Lu J, and Hu R. Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Experimental cell research*. 2016;342(2):184-92.
153. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR, Jr., Fedak PW, Beck PL, Muruve DA, and Duff HJ. Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(28):19571-84.
154. Artlett CM. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):157-67.
155. Hosseinian N, Cho Y, Lockey RF, and Kolliputi N. The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases. *Therapeutic advances in respiratory disease*. 2015;9(4):188-97.
156. Barlo NP, van Moorsel CH, Korthagen NM, Heron M, Rijkers GT, Ruven HJ, van den Bosch JM, and Grutters JC. Genetic variability in the IL1RN gene and the balance between interleukin (IL)-1 receptor agonist and IL-1beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental immunology*. 2011;166(3):346-51.
157. Korthagen NM, van Moorsel CH, Kazemier KM, Ruven HJ, and Grutters JC. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study. *Immunogenetics*. 2012;64(5):371-7.
158. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, and Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine*. 1993;5(1):57-61.
159. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, et al. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(6):774-83.
160. Doz E, Noulain N, Boichot E, Guenon I, Fick L, Le Bert M, Lagente V, Ryffel B, Schnyder B, Quesniaux VF, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *Journal of immunology*. 2008;180(2):1169-78.
161. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, and Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(45):19449-54.
162. Wu D, Pan P, Su X, Zhang L, Qin Q, Tan H, Huang L, and Li Y. Interferon Regulatory Factor-1 Mediates Alveolar Macrophage Pyroptosis During LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Shock*. 2016.
163. Naji A, Muzembo BA, Yagyu K, Baba N, Deschaseaux F, Sensebe L, and Suganuma N. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells. *Scientific reports*. 2016;6(26162).

164. Mikels AJ, and Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*. 2006;25(57):7461-8.
165. Komiya Y, and Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
166. Baarsma HA, Konigshoff M, and Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;138(1):66-83.
167. Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D, et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(50):20224-9.
168. Song P, Zheng JX, Xu J, Liu JZ, Wu LY, and Liu C. beta-catenin induces A549 alveolar epithelial cell mesenchymal transition during pulmonary fibrosis. *Molecular medicine reports*. 2015;11(4):2703-10.
169. Wang C, Zhu H, Sun Z, Xiang Z, Ge Y, Ni C, Luo Z, Qian W, and Han X. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury. *American journal of physiology Cell physiology*. 2014;307(3):C234-44.
170. Wang X, Dai W, Wang Y, Gu Q, Yang D, and Zhang M. Blocking the Wnt/beta-Catenin Pathway by Lentivirus-Mediated Short Hairpin RNA Targeting beta-Catenin Gene Suppresses Silica-Induced Lung Fibrosis in Mice. *International journal of environmental research and public health*. 2015;12(9):10739-54.
171. Lam AP, Herazo-Maya JD, Sennello JA, Flozak AS, Russell S, Mutlu GM, Budinger GR, DasGupta R, Varga J, Kaminski N, et al. Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(2):185-95.
172. Konigshoff M, and Eickelberg O. WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(1):21-31.
173. Oda K, Yatera K, Izumi H, Ishimoto H, Yamada S, Nakao H, Hanaka T, Ogoshi T, Noguchi S, and Mukae H. Profibrotic role of WNT10A via TGF-beta signaling in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*. 2016;17(39).
174. Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, and Kolb M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 4):661-4.
175. Kelly M, Kolb M, Bonniaud P, and Gauldie J. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Current pharmaceutical design*. 2003;9(1):39-49.
176. Clark DA, and Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(3):293-8.
177. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, and Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*. 1997;124(13):2659-70.
178. Ask K, Bonniaud P, Maass K, Eickelberg O, Margetts PJ, Warburton D, Groffen J, Gauldie J, and Kolb M. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(3):484-95.
179. Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, and Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(18):10618-24.

180. Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazziere R, Nunes I, and Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney international*. 1997;51(5):1376-82.
181. Biernacka A, Dobaczewski M, and Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth factors*. 2011;29(5):196-202.
182. Kreuter M, Wijzenbeek MS, Vasakova M, Spagnolo P, Kolb M, Costabel U, Weycker D, Kirchgaessler KU, and Maher TM. Unfavourable effects of medically indicated oral anticoagulants on survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2016;47(6):1776-84.
183. Fortunel NO, Hatzfeld A, and Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96(6):2022-36.
184. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, and Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *The Journal of cell biology*. 1990;110(4):1361-7.
185. Goodwin A, and Jenkins G. Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochemical Society transactions*. 2009;37(Pt 4):849-54.
186. Annes JP, Chen Y, Munger JS, and Rifkin DB. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of cell biology*. 2004;165(5):723-34.
187. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999;96(3):319-28.
188. Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, Sheppard D, Broaddus VC, and Nishimura SL. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *The Journal of cell biology*. 2002;157(3):493-507.
189. Border WA, and Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England journal of medicine*. 1994;331(19):1286-92.
190. Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, Xu YD, and Gold LI. 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*. 2001;56(12):907-15.
191. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, Murphy A, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, et al. Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(8):889-98.
192. Hata A, and Chen YG. TGF-beta Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016.
193. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, and Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-34.
194. Shi Y, and Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700.
195. Schiller M, Javelaud D, and Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of dermatological science*. 2004;35(2):83-92.
196. Roberts AB. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 1999;1(15):1265-73.

197. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, and Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. 1998;95(6):779-91.
198. Moustakas A. Smad signalling network. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 17):3355-6.
199. Wurthner JU, Frank DB, Felici A, Green HM, Cao Z, Schneider MD, McNally JG, Lechleider RJ, and Roberts AB. Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(22):19495-502.
200. Wrana JL. The secret life of Smad4. *Cell*. 2009;136(1):13-4.
201. Thillainadesan G, Chitilian JM, Isovich M, Ablack JN, Mymryk JS, Tini M, and Torchia J. TGF-beta-dependent active demethylation and expression of the p15^{ink4b} tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. *Molecular cell*. 2012;46(5):636-49.
202. Yan X, Liu Z, and Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2009;41(4):263-72.
203. Datta PK, and Moses HL. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(9):3157-67.
204. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997;89(7):1165-73.
205. Quere R, Saint-Paul L, Carmignac V, Martin RZ, Chretien ML, Largeot A, Hammann A, Pais de Barros JP, Bastie JN, and Delva L. Tiflgamma regulates the TGF-beta1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(29):10592-7.
206. Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chung AC, Qin W, Chen HY, and Lan HY. Disruption of Smad4 impairs TGF-beta/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney international*. 2012;81(3):266-79.
207. Nicolas FJ, De Bosscher K, Schmierer B, and Hill CS. Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 18):4113-25.
208. Pierreux CE, Nicolas FJ, and Hill CS. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(23):9041-54.
209. Izzi L, and Attisano L. Ubiquitin-dependent regulation of TGFbeta signaling in cancer. *Neoplasia*. 2006;8(8):677-88.
210. Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*. 2009;136(1):123-35.
211. Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, Besnard V, Joannes A, Colas J, Causse S, Marchal-Somme J, Fabre A, Crestani B, et al. The small heat-shock protein alphaB-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. *The Journal of pathology*. 2014;232(4):458-72.
212. Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, and Miyazono K. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(5):1431-43.

213. Lin X, Liang M, and Feng XH. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(47):36818-22.
214. Darby IA, Zakuan N, Billet F, and Desmouliere A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(6):1145-57.
215. Darby I, Skalli O, and Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1990;63(1):21-9.
216. Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, and Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *The American journal of pathology*. 1994;145(1):114-25.
217. Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, and Brown KK. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(6):654-8.
218. Harada T, Watanabe K, Nabeshima K, Hamasaki M, and Iwasaki H. Prognostic significance of fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia and non-specific interstitial pneumonia. *Respirology*. 2013;18(2):278-83.
219. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, and Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007;170(6):1807-16.
220. Strieter RM, and Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*. 2009;136(5):1364-70.
221. Fernandez IE, and Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2012;380(9842):680-8.
222. Kisseleva T, and Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental biology and medicine*. 2008;233(2):109-22.
223. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002;122(6 Suppl):286S-9S.
224. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, and Heller RA. 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. *The American journal of pathology*. 2003;162(2):533-46.
225. Alhamad EH, Shakoor Z, Al-Kassimi FA, Almogren A, Gad ElRab MO, Maharaj S, and Kolb M. Rapid detection of circulating fibrocytes by flowcytometry in idiopathic pulmonary fibrosis. *Annals of thoracic medicine*. 2015;10(4):279-83.
226. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, and Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular medicine*. 1994;1(1):71-81.
227. Maharaj S, Shimbori C, and Kolb M. Fibrocytes in pulmonary fibrosis: a brief synopsis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2013;22(130):552-7.
228. Borie R, Quesnel C, Phin S, Debray MP, Marchal-Somme J, Tiev K, Bonay M, Fabre A, Soler P, Dehoux M, et al. Detection of alveolar fibrocytes in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *PloS one*. 2013;8(1):e53736.
229. Strieter RM, Keeley EC, Burdick MD, and Mehrad B. The role of circulating mesenchymal progenitor cells, fibrocytes, in promoting pulmonary fibrosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2009;120(49-59).

230. Moore BB, Murray L, Das A, Wilke CA, Herrygers AB, and Toews GB. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(2):175-81.
231. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, and Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(3):438-46.
232. Epperly MW, Guo H, Gretton JE, and Greenberger JS. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;29(2):213-24.
233. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, and Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *Journal of immunology*. 2001;166(12):7556-62.
234. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, and Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(10):2129-40.
235. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, Margetts PJ, Farkas L, Dobranowski J, Boylan C, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;179(7):588-94.
236. Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D, and Driscoll B. Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286(4):L658-67.
237. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, and Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*. 2005;166(5):1321-32.
238. Kalluri R, and Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1776-84.
239. Kalluri R, and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
240. Zeisberg M, and Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1429-37.
241. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, and Bottinger EP. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(12):6686-91.
242. Schneider DJ, Wu M, Le TT, Cho SH, Brenner MB, Blackburn MR, and Agarwal SK. Cadherin-11 contributes to pulmonary fibrosis: potential role in TGF-beta production and epithelial to mesenchymal transition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(2):503-12.
243. Wu Z, Yang L, Cai L, Zhang M, Cheng X, Yang X, and Xu J. Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an alpha-smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respiratory research*. 2007;8(1).
244. Jayachandran A, Konigshoff M, Yu H, Rupniewska E, Hecker M, Klepetko W, Seeger W, and Eickelberg O. SNAI transcription factors mediate epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis. *Thorax*. 2009;64(12):1053-61.

245. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, and 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(35):13180-5.
246. Bartis D, Mise N, Mahida RY, Eickelberg O, and Thickett DR. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*. 2014;69(8):760-5.
247. Rock JR, Barkauskas CE, Crouse MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, and 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(52):E1475-83.
248. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, and Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(4).
249. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, and Hasegawa Y. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43(2):161-72.
250. Yalcin NG, Choong CK, and Eizenberg N. Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thoracic surgery clinics*. 2013;23(1):1-10, v.
251. English JC, and Leslie KO. Pathology of the pleura. *Clinics in chest medicine*. 2006;27(2):157-80.
252. Jantz MA, and Antony VB. Pathophysiology of the pleura. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2008;75(2):121-33.
253. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(1):9-16.
254. Mutsaers SE, Whitaker D, and Papadimitriou JM. Stimulation of mesothelial cell proliferation by exudate macrophages enhances serosal wound healing in a murine model. *The American journal of pathology*. 2002;160(2):681-92.
255. Simsir A, Fetsch P, Mehta D, Zakowski M, and Abati A. E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: the good, the bad, the worthless. *Diagnostic cytopathology*. 1999;20(3):125-30.
256. Ko EC, Jhala NC, Shultz JJ, and Chhieng DC. Use of a panel of markers in the differential diagnosis of adenocarcinoma and reactive mesothelial cells in fluid cytology. *American journal of clinical pathology*. 2001;116(5):709-15.
257. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, Hensel E, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, et al. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2012;39(1):133-40.
258. Chang K, and Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(1):136-40.
259. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990;60(3):509-20.
260. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, Ye T, Thannickal VJ, and Antony VB. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2014;28(3):1122-31.
261. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, Gauldie J, Camus P, and Bonniaud P. TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *Journal of immunology.* 2007;179(9):6043-51.
 262. Acencio MM, Vargas FS, Marchi E, Carnevale GG, Teixeira LR, Antonangelo L, and Broaddus VC. Pleural mesothelial cells mediate inflammatory and profibrotic responses in talc-induced pleurodesis. *Lung.* 2007;185(6):343-8.
 263. Hillegass JM, Miller JM, MacPherson MB, Westbom CM, Sayan M, Thompson JK, Macura SL, Perkins TN, Beuschel SL, Alexeeva V, et al. Asbestos and erionite prime and activate the NLRP3 inflammasome that stimulates autocrine cytokine release in human mesothelial cells. *Particle and fibre toxicology.* 2013;10(39).
 264. Souza CA, Muller NL, Flint J, Wright JL, and Churg A. Idiopathic pulmonary fibrosis: spectrum of high-resolution CT findings. *AJR American journal of roentgenology.* 2005;185(6):1531-9.
 265. Huggins JT, and Sahn SA. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology.* 2004;9(4):441-7.
 266. Jantz MA, and Antony VB. Pleural fibrosis. *Clinics in chest medicine.* 2006;27(2):181-91.
 267. Pfitzenmeyer P, Foucher P, Dennewald G, Chevalon B, Debieuvre D, Bensa P, Piard F, and Camus P. Pleuropulmonary changes induced by ergoline drugs. *The European respiratory journal.* 1996;9(5):1013-9.
 268. Hamada K, Nagai S, Kitaichi M, Jin G, Shigematsu M, Nagao T, Sato A, and Mishima M. Cyclophosphamide-induced late-onset lung disease. *Internal medicine (Tokyo, Japan).* 2003;42(1):82-7.
 269. Balbir-Gurman A, Yigla M, Nahir AM, and Braun-Moscovici Y. Rheumatoid pleural effusion. *Seminars in arthritis and rheumatism.* 2006;35(6):368-78.
 270. Jagirdar J, Lee TC, Reibman J, Gold LI, Aston C, Begin R, and Rom WN. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environmental health perspectives.* 1997;105 Suppl 5(1197-203).
 271. Harvey W, and Amlot PL. Collagen production by human mesothelial cells in vitro. *The Journal of pathology.* 1983;139(3):337-47.
 272. Ma C, Tarnuzzer RW, and Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 1999;7(6):477-85.
 273. Falk P, Ma C, Chegini N, and Holmdahl L. Differential regulation of mesothelial cell fibrinolysis by transforming growth factor beta 1. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 2000;60(6):439-47.
 274. Light RW, Cheng DS, Lee YC, Rogers J, Davidson J, and Lane KB. A single intrapleural injection of transforming growth factor-beta(2) produces an excellent pleurodesis in rabbits. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2000;162(1):98-104.
 275. Lee YC, Lane KB, Parker RE, Ayo DS, Rogers JT, Diters RW, Thompson PJ, and Light RW. Transforming growth factor beta(2) (TGF beta(2)) produces effective pleurodesis in sheep with no systemic complications. *Thorax.* 2000;55(12):1058-62.

276. Decolonne N, Wettstein G, Kolb M, Margetts P, Garrido C, Camus P, and Bonniaud P. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *The European respiratory journal*. 2010;35(1):176-85.
277. Chen LJ, Ye H, Zhang Q, Li FZ, Song LJ, Yang J, Mu Q, Rao SS, Cai PC, Xiang F, et al. Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;283(2):75-82.
278. Nasreen N, Mohammed KA, Mubarak KK, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, and Antony VB. Pleural mesothelial cell transformation into myofibroblasts and haptotactic migration in response to TGF-beta1 in vitro. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297(1):L115-24.
279. Umezawa H, Suhara Y, Takita T, and Maeda K. Purification of bleomycins. *The Journal of antibiotics*. 1966;19(5):210-5.
280. Chen J, and Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(2):102-12.
281. Lehmann T, and Topchiy E. Contributions of NMR to the understanding of the coordination chemistry and DNA interactions of metallo-bleomycins. *Molecules*. 2013;18(8):9253-77.
282. Hay J, Shahzeidi S, and Laurent G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Archives of toxicology*. 1991;65(2):81-94.
283. Bromme D, Rossi AB, Smeekens SP, Anderson DC, and Payan DG. Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry*. 1996;35(21):6706-14.
284. Sebti SM, DeLeon JC, and Lazo JS. Purification, characterization, and amino acid composition of rabbit pulmonary bleomycin hydrolase. *Biochemistry*. 1987;26(14):4213-9.
285. Lazo JS, and Humphreys CJ. Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(10):3064-8.
286. Pron G, Belehradek J, Jr., and Mir LM. Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;194(1):333-7.
287. Pron G, Mahrour N, Orłowski S, Tounekti O, Poddevin B, Belehradek J, Jr., and Mir LM. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(1):45-56.
288. Aouida M, Tounekti O, Leduc A, Belhadj O, Mir L, and Ramotar D. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with enhanced resistance to the anticancer drug bleomycin. *Current genetics*. 2004;45(5):265-72.
289. Aouida M, Leduc A, Wang H, and Ramotar D. Characterization of a transport and detoxification pathway for the antitumour drug bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*. 2004;384(Pt 1):47-58.
290. Aouida M, Page N, Leduc A, Peter M, and Ramotar D. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin. *Cancer research*. 2004;64(3):1102-9.
291. Burger RM, Peisach J, and Horwitz SB. Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *The Journal of biological chemistry*. 1981;256(22):11636-44.
292. Ekimoto H, Takahashi K, Matsuda A, Takita T, and Umezawa H. Lipid peroxidation by bleomycin-iron complexes in vitro. *The Journal of antibiotics*. 1985;38(8):1077-82.

293. Rana TM, and Meares CF. Transfer of oxygen from an artificial protease to peptide carbon during proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(23):10578-82.
294. Hecht SM. RNA degradation by bleomycin, a naturally occurring bioconjugate. *Bioconjugate chemistry*. 1994;5(6):513-26.
295. Kuo MT. Preferential damage of active chromatin by bleomycin. *Cancer research*. 1981;41(6):2439-43.
296. Brar SS, Meyer JN, Bortner CD, Van Houten B, and Martin WJ, 2nd. Mitochondrial DNA-depleted A549 cells are resistant to bleomycin. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;303(5):L413-24.
297. Tounekti O, Kenani A, Foray N, Orłowski S, and Mir LM. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *British journal of cancer*. 2001;84(9):1272-9.
298. Bayer RA, Gaynor ER, and Fisher RI. Bleomycin in non-Hodgkin's lymphoma. *Seminars in oncology*. 1992;19(2 Suppl 5):46-52; discussion -3.
299. Einhorn LH. Curing metastatic testicular cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(7):4592-5.
300. Lehane DE, Hurd E, and Lane M. The effects of bleomycin on immunocompetence in man. *Cancer research*. 1975;35(10):2724-8.
301. Camus PH, Foucher P, Bonniaud PH, and Ask K. Drug-induced infiltrative lung disease. *The European respiratory journal Supplement*. 2001;32(93s-100s).
302. Adamson IY. Drug-induced pulmonary fibrosis. *Environmental health perspectives*. 1984;55(25-36).
303. Martin WG, Ristow KM, Habermann TM, Colgan JP, Witzig TE, and Ansell SM. Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(30):7614-20.
304. Balikian JP, Jochelson MS, Bauer KA, Skarkin AT, Garnick MB, Canellos GP, and Smith EH. Pulmonary complications of chemotherapy regimens containing bleomycin. *AJR American journal of roentgenology*. 1982;139(3):455-61.
305. Azambuja E, Fleck JF, Batista RG, and Menna Barreto SS. Bleomycin lung toxicity: who are the patients with increased risk? *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2005;18(5):363-6.
306. Hirsch A, Vander Els N, Straus DJ, Gomez EG, Leung D, Portlock CS, and Yahalom J. Effect of ABVD chemotherapy with and without mantle or mediastinal irradiation on pulmonary function and symptoms in early-stage Hodgkin's disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(4):1297-305.
307. Gerson R, Tellez Bernal E, Lazaro Leon M, Sanchez Forgach E, Garcia Irigoyen C, Gutierrez Godinez F, and Garcia Gonzalez H. Low toxicity with continuous infusion of high-dose bleomycin in poor prognostic testicular cancer. *American journal of clinical oncology*. 1993;16(4):323-6.
308. Azoulay E, Herigault S, Levame M, Brochard L, Schlemmer B, Harf A, and Delclaux C. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. *Critical care medicine*. 2003;31(5):1442-8.
309. Bendstrup E, Hyldgaard C, Agerbaek M, Andersen CU, and Hilberg O. No effect of pirfenidone treatment in fulminant bleomycin-induced pneumonitis. *Respiratory medicine case reports*. 2014;12(47-9).
310. Moore BB, and Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294(2):L152-60.

311. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, and Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(3):362-82.
312. Chua F, Gauldie J, and Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;33(1):9-13.
313. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, and Lawson WE. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;299(4):L442-52.
314. Harrison JH, Jr., and Lazo JS. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1987;243(3):1185-94.
315. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, and 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(4):768-76.
316. Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, and 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(2):425-36.
317. Kelley J, Shull S, Walsh JJ, Cutroneo KR, and Absher M. Auto-induction of transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1993;8(4):417-24.
318. Behr J, Degenkolb B, Krombach F, and Vogelmeier C. Intracellular glutathione and bronchoalveolar cells in fibrosing alveolitis: effects of N-acetylcysteine. *The European respiratory journal*. 2002;19(5):906-11.
319. Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, and Thannickal VJ. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(7):854-6.
320. Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, and Vogelmeier C. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(6):1897-901.
321. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2005;353(21):2229-42.
322. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research N, Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE, Jr., and Raghu G. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2014;370(22):2093-101.
323. Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Casini A, Ceni E, Saccomanno S, Marzioni M, Trozzi L, Sterpetti P, et al. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *Journal of hepatology*. 2002;37(5):584-91.
324. Hewitson TD, Kelynack KJ, Tait MG, Martic M, Jones CL, Margolin SB, and Becker GJ. Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis. *Journal of nephrology*. 2001;14(6):453-60.
325. Kakugawa T, Mukae H, Hayashi T, Ishii H, Abe K, Fujii T, Oku H, Miyazaki M, Kadota J, and Kohno S. Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2004;24(1):57-65.

326. Oku H, Nakazato H, Horikawa T, Tsuruta Y, and Suzuki R. Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha, enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *European journal of pharmacology*. 2002;446(1-3):167-76.
327. Takeda Y, Tsujino K, Kijima T, and Kumanogoh A. Efficacy and safety of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis. *Patient preference and adherence*. 2014;8(361-70).
328. Choi K, Lee K, Ryu SW, Im M, Kook KH, and Choi C. 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(1010-20).
329. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE, Jr., Lancaster L, Sahn SA, Szwarcberg J, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*. 2011;377(9779):1760-9.
330. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, Gorina E, Hopkins PM, Kardatzke D, Lancaster L, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2014;370(22):2083-92.
331. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, and Kolb M. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2015;45(5):1434-45.
332. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, and Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014;349(2):209-20.
333. Richeldi L, Costabel U, Selman M, Kim DS, Hansell DM, Nicholson AG, Brown KK, Flaherty KR, Noble PW, Raghu G, et al. Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(12):1079-87.
334. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2014;370(22):2071-82.
335. Richeldi L, Cottin V, du Bois RM, Selman M, Kimura T, Bailes Z, Schlenker-Herceg R, Stowasser S, and Brown KK. Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: Combined evidence from the TOMORROW and INPULSIS((R)) trials. *Respiratory medicine*. 2016;113(74-9).
336. Woodcock HV, and Maher TM. The treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *F1000prime reports*. 2014;6(16).
337. Mercer PF, Woodcock HV, Eley JD, Plate M, Sulikowski MG, Durrenberger PF, Franklin L, Nanthakumar CB, Man Y, Genovese F, et al. Exploration of a potent PI3 kinase/mTOR inhibitor as a novel anti-fibrotic agent in IPF. *Thorax*. 2016;71(8):701-11.
338. Horan GS, Wood S, Ona V, Li DJ, Lukashev ME, Weinreb PH, Simon KJ, Hahm K, Allaire NE, Rinaldi NJ, et al. Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(1):56-65.
339. Ritossa FM. Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Experimental cell research*. 1964;35(601-7).
340. Ritossa FM, and Vonborstel RC. Chromosome Puffs in *Drosophila* Induced by Ribonuclease. *Science*. 1964;145(3631):513-4.

341. Tamura Y, Torigoe T, Kutomi G, Hirata K, and Sato N. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Current molecular medicine*. 2012;12(9):1198-206.
342. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, and Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell stress & chaperones*. 2009;14(1):105-11.
343. Akerfelt M, Morimoto RI, and Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(8):545-55.
344. Ostling P, Bjork JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, and Sistonen L. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(10):7077-86.
345. Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D, and Mivechi NF. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;86(2):376-93.
346. Conde R, Belak ZR, Nair M, O'Carroll RF, and Ovsenek N. Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2009;87(6):845-51.
347. Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, and Calderwood SK. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. *Methods*. 2007;43(3):168-75.
348. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, and Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *International immunology*. 2000;12(11):1539-46.
349. Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, and Kakar SS. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2014;7(14).
350. Murshid A, Borges TJ, and Calderwood SK. Emerging roles for scavenger receptor SREC-I in immunity. *Cytokine*. 2015;75(2):256-60.
351. Thuringer D, Jego G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, Hebrard S, Bouchot A, Hazoume A, Joly AL, et al. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(10):4169-83.
352. Hartl FU, Bracher A, and Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324-32.
353. Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, and Garrido C. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *TheScientificWorldJournal*. 2010;10(1543-52).
354. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, and Hendrickson WA. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. 1996;272(5268):1606-14.
355. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, and Zylicz M. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(7):2874-8.
356. Andreasson C, Fiaux J, Rampelt H, Mayer MP, and Bukau B. Hsp110 is a nucleotide-activated exchange factor for Hsp70. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(14):8877-84.
357. Mayer MP, and Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(6):670-84.

358. Tsaytler PA, Krijgsveld J, Goerdayal SS, Rudiger S, and Egmond MR. Novel Hsp90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell stress & chaperones*. 2009;14(6):629-38.
359. Pearl LH, and Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual review of biochemistry*. 2006;75(271-94).
360. Chen S, and Smith DF. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(52):35194-200.
361. Taipale M, Jarosz DF, and Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(7):515-28.
362. Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, and Farr GW. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;23(115-45).
363. Arrigo AP, Suhan JP, and Welch WJ. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Molecular and cellular biology*. 1988;8(12):5059-71.
364. Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, and Vicart P. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS letters*. 2007;581(19):3665-74.
365. Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, and Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal*. 1997;16(2):221-9.
366. Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, and Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS letters*. 1992;313(3):307-13.
367. Kostenko S, Johannessen M, and Moens U. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cellular signalling*. 2009;21(5):712-8.
368. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, and Garrido C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(16):5790-802.
369. Parcellier A, Schmitt E, Brunet M, Hammann A, Solary E, and Garrido C. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(3-4):404-13.
370. Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, and Solary E. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer research*. 1998;58(23):5495-9.
371. Hino M, Kurogi K, Okubo MA, Murata-Hori M, and Hosoya H. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;271(1):164-9.
372. Katoh M, Koninkx J, and Schumacher U. Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer letters*. 2000;161(1):113-20.
373. Li GP, Wang H, Lai YK, Chen SC, Lin MC, Lu G, Zhang JF, He XG, Qian CN, and Kung HF. Proteomic profiling between CNE-2 and its strongly metastatic subclone S-18 and functional characterization of HSP27 in metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Proteomics*. 2011;11(14):2911-20.

374. Arrigo AP. sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathologie-biologie*. 2000;48(3):280-8.
375. Choi DH, Ha JS, Lee WH, Song JK, Kim GY, Park JH, Cha HJ, Lee BJ, and Park JW. Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells. *FEBS letters*. 2007;581(8):1649-56.
376. Zhuang H, Jiang W, Cheng W, Qian K, Dong W, Cao L, Huang Q, Li S, Dou F, Chiu JF, et al. Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2010;68(1):27-38.
377. Bhat SP, and 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(1):319-25.
378. Markov DI, Pivovarova AV, Chernik IS, Gusev NB, and Levitsky DI. Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation. *FEBS letters*. 2008;582(10):1407-12.
379. MacIntyre DA, Tyson EK, Read M, Smith R, Yeo G, Kwek K, and Chan EC. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology*. 2008;149(1):245-52.
380. Brady JP, Garland DL, Green DE, Tamm ER, Giblin FJ, and Wawrousek EF. AlphaB-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(12):2924-34.
381. Kamradt MC, Chen F, and Cryns VL. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(19):16059-63.
382. Kamradt MC, Lu M, Werner ME, Kwan T, Chen F, Strohecker A, Oshita S, Wilkinson JC, Yu C, Oliver PG, et al. The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(12):11059-66.
383. Kamradt MC, Chen F, Sam S, and Cryns VL. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(41):38731-6.
384. Mao YW, Xiang H, Wang J, Korsmeyer S, Reddan J, and Li DW. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(46):43435-45.
385. Morrison LE, Hoover HE, Thuerauf DJ, and Glembotski CC. Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circulation research*. 2003;92(2):203-11.
386. Mao YW, Liu JP, Xiang H, and Li DW. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2004;11(5):512-26.
387. Liu S, Li J, Tao Y, and Xiao X. Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;354(1):109-14.
388. Verschuure P, Croes Y, van den IPR, Quinlan RA, de Jong WW, and Boelens WC. Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(2):117-28.

389. Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell death and differentiation*. 2002;9(5):483-5.
390. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO journal*. 1998;17(24):7151-60.
391. Boelens WC, Croes Y, and de Jong WW. Interaction between alphaB-crystallin and the human 20S proteasomal subunit C8/alpha7. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1544(1-2):311-9.
392. den Engelsman J, Keijsers V, de Jong WW, and Boelens WC. The small heat-shock protein alpha B-crystallin promotes FBX4-dependent ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(7):4699-704.
393. Tanaka K, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, and Mizushima T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(6):920-31.
394. Namba T, Tanaka K, Hoshino T, Azuma A, and Mizushima T. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *PloS one*. 2011;6(11):e27296.
395. Yun CH, Yoon SY, Nguyen TT, Cho HY, Kim TH, Kim ST, Kim BC, Hong YS, Kim SJ, and Lee HJ. Geldanamycin inhibits TGF-beta signaling through induction of Hsp70. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;495(1):8-13.
396. Zhou Y, Mao H, Li S, Cao S, Li Z, Zhuang S, Fan J, Dong X, Borkan SC, Wang Y, et al. HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(4):598-609.
397. Cai WF, Zhang XW, Yan HM, Ma YG, Wang XX, Yan J, Xin BM, Lv XX, Wang QQ, Wang ZY, et al. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovascular research*. 2010;88(1):140-9.
398. Noh H, Kim HJ, Yu MR, Kim WY, Kim J, Ryu JH, Kwon SH, Jeon JS, Han DC, and Ziyadeh F. Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor-beta type II receptor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2012;92(11):1583-96.
399. 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. *Journal of proteome research*. 2011;10(5):2185-205.
400. Kakugawa T, Yokota S, Ishimatsu Y, Hayashi T, Nakashima S, Hara S, Sakamoto N, Kubota H, Mine M, Matsuoka Y, et al. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell stress & chaperones*. 2013;18(5):581-90.
401. Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, Ishii H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Fujii T, Koji T, and Kohno S. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch*. 2010;456(3):309-15.
402. Amenomori M, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Hayashi T, Hara A, Hara S, Fujita H, Ishimoto H, Ishimatsu Y, et al. HSP47 in lung fibroblasts is a predictor of survival in fibrotic nonspecific interstitial pneumonia. *Respiratory medicine*. 2010;104(6):895-901.
403. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, and Noguchi T. Antisense oligonucleotide inhibition of heat shock protein (HSP) 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiratory research*. 2007;8(37).

404. Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life sciences*. 2008;82(3-4):210-7.
405. Vargha R, Bender TO, Riesenhuber A, Endemann M, Kratochwill K, and Aufricht C. Effects of epithelial-to-mesenchymal transition on acute stress response in human peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(11):3494-500.
406. Vidyasagar A, Reese S, Acun Z, Hullett D, and Djamali A. HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *American journal of physiology*. 2008;295(3):F707-16.
407. Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, Marchal-Somme J, Hazoume A, Gauldie J, Gunther A, 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;27(4):1549-60.
408. Cherneva R, Petrov D, Georgiev O, Slavova Y, Toncheva D, Stamenova M, and Trifonova N. Expression profile of the small heat-shock protein alpha-B-crystallin in operated-on non-small-cell lung cancer patients: clinical implication. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2010;37(1):44-50.
409. Cherneva RV, Georgiev OB, Petrova DS, Trifonova NL, Stamenova M, Ivanova V, and Vlasov VI. The role of small heat-shock protein alphaB-crystalline (HspB5) in COPD pathogenesis. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2012;7(6):33-40.
410. Lang A, Schrum LW, Schoonhoven R, Tuvia S, Solis-Herruzo JA, Tsukamoto H, Brenner DA, and Rippe RA. Expression of small heat shock protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2000;279(6):G1333-42.
411. van de Bovenkamp M, Groothuis GM, Meijer DK, and Olinga P. Liver slices as a model to study fibrogenesis and test the effects of anti-fibrotic drugs on fibrogenic cells in human liver. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008;22(3):771-8.
412. Yu AL, Fuchshofer R, Birke M, Priglinger SG, Eibl KH, Kampik A, Bloemendal H, and Welge-Lussen U. Hypoxia/reoxygenation and TGF-beta increase alphaB-crystallin expression in human optic nerve head astrocytes. *Experimental eye research*. 2007;84(4):694-706.
413. Welge-Lussen U, May CA, Eichhorn M, Bloemendal H, and Lutjen-Drecoll E. AlphaB-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor-beta. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40(10):2235-41.
414. Huang XY, Ke AW, Shi GM, Zhang X, Zhang C, Shi YH, Wang XY, Ding ZB, Xiao YS, Yan J, et al. alphaB-crystallin complexes with 14-3-3zeta to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013.
415. Adamson IY, Bakowska J, and Bowden DH. Mesothelial cell proliferation: a nonspecific response to lung injury associated with fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1994;10(3):253-8.
416. Lua I, Li Y, Pappoe LS, and Asahina K. Myofibroblastic Conversion and Regeneration of Mesothelial Cells in Peritoneal and Liver Fibrosis. *The American journal of pathology*. 2015;185(12):3258-73.

417. Kenani A, Lamblin G, and Henichart JP. A convenient method for the cleavage of the D-mannosyl-L-gulose disaccharide from bleomycin-A2. *Carbohydrate research*. 1988;177(81-9).
418. Brahim S, Bettaieb A, and Kenani A. Deglycosylated bleomycin triggers apoptosis in laryngeal carcinoma cells in a caspase and reactive oxygen species independent manner. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2008;37(6):352-7.
419. Kenani A, Bailly C, Houssin R, and Henichart JP. Comparative subcellular distribution of the copper complexes of bleomycin-A2 and deglycobleomycin-A2. *Anti-cancer drugs*. 1994;5(2):199-201.
420. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, 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(6):788-824.
421. Schroeder BR, Ghare MI, Bhattacharya C, Paul R, Yu Z, Zaleski PA, Bozeman TC, Rishel MJ, and Hecht SM. The disaccharide moiety of bleomycin facilitates uptake by cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(39):13641-56.
422. Yu Z, Schmaltz RM, Bozeman TC, Paul R, Rishel MJ, Tsosie KS, and Hecht SM. Selective tumor cell targeting by the disaccharide moiety of bleomycin. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(8):2883-6.

ANNEXES

Article 1. Données supplémentaires publiées en ligne.

Anti-fibrotic role of α B-crystallin inhibition in pleural and subpleural fibrosis

Running title: α B-crystallin deficiency hampers pleural fibrosis

Pierre-Simon Bellaye^{*1, 2}, Olivier Burgy ^{*1, 2}, Julien Colas ^{1, 2}, Aurélie Fabre ⁴, Joëlle Marchal-Somme ³, Bruno Crestani ^{3, 5, 6}, Martin Kolb⁷, Philippe Camus^{1, 2, 8}, Carmen Garrido^{1, 2}, Philippe Bonniaud ^{1, 2, 8}.

* Equal contribution to the work

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 St Vincent's University Hospital, Elm Park, Dublin, Ireland, ⁵ Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, 75000 Paris, France, ⁶ Faculté de médecine Bichat, Paris APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, 75000 Paris, France, ⁷ Center for Gene Therapeutics, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, ⁸ Service de Pneumologie, CHU Dijon 21079, Dijon, France.

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.bonnaud@chu-dijon.fr

Word count: 3155

Online supplemental 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 (6), 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 AG, Villeurbanne, France), and with anti-calretinin antibody (Cell marque, Rocklin, CA, USA). Positive cells were revealed using the Vectastain ABC-alkaline phosphatase kit system (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Mouse IgG1 was used to test the specificity of immunostaining.

Recombinant adenovirus

The construction of adenoviral vectors has been described previously (26, 27). 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 (26)

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 (28). 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). To induce pleural/subpleural fibrosis, adenovectors and bleomycin/carbon particles administrations were performed by intrapleural injection of 100 μ l of sterile NaCl 0.9% containing a total of $5 \cdot 10^8$ plaque forming units (PFU) of AdTGF- β 1, AdDL, or AdLacZ as described by Decologne et al. (7, 8). 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. Pleural lavage fluid (PLF) was collected as previously described (29) and stored at -20°C after cell count.

β -galactosidase staining

β -galactosidase staining was performed as previously described (7). Cytochemical staining for β -galactosidase was performed on samples obtained from animals after intrapleural injection of AdLacZ/AdTGF- β 1 or AdLacZ/AdDL. After 1 h in fixative (2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde), fresh tissue samples were stained for 6 h in a solution containing potassium ferrous cyanide, potassium ferric cyanide, magnesium chloride, Triton X-100 and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were stored in 70% ethanol and then paraffin-processed and embedded. Five-micrometer sections were counterstained with nuclear fast red.

Collagen quantification (sircol and histomorphometry)

Histomorphometric assay - The amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was quantified by staining with Picrosirius 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, Evry, France) as previously described (8). Briefly, collagen intensity in the pleura was measured within a rectangle (constant length of 100 μ m, width depending on pleura thickness). Collagen content was expressed as percentage of emission multiplied by the surface of each rectangle. Collagen within the subpleural areas was measured using circles (diameter 65 μ m) randomly placed at a constant distance from the pleural surface. Collagen amounts in the parenchyma 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.

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, LGC Standards, Molsheim, France) 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 (Life Technologies SAS, Saint Aubin, 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 Met5A 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'-CGTGGTTTTCTCACCCCTATGG-3' and 5'-CTGGGTTTCTCCTCCTGTTGTC-3'; and TGF- β 1, 5'-CTGCTGTGGCTACTGGTGC3' and 5'-CTTCACCAGCTCCATGTCGAT-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

Met5A lung mesothelial 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, Paris, France). Goat anti-rabbit and conjugated with Alexa Fluor 594 (Molecular Probe, InVitrogen, Cergy Pontoise, France) was 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 (Enzo life science) and α -SMA (Abcam). 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.

Supplemental Figure S1 : α B-crystallin is expressed in the pleura of fibrotic lungs.

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 (n=5, 200x).

Supplemental Figure S2 : WT and KO mice express adenoviruses encoding TGF- β 1 to the same extent

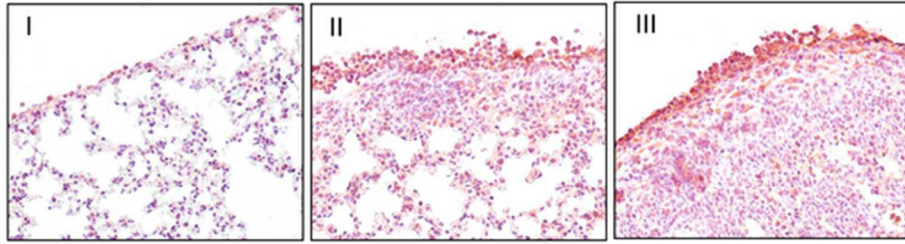
Total mouse TGF- β 1 was measured by ELISA on PLF from WT and KO mice 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL . Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, AdTGF- β 1: n=6/group and AdDL: n=3/group.

Supplemental Figure S3 : α B-crystallin siRNA validation

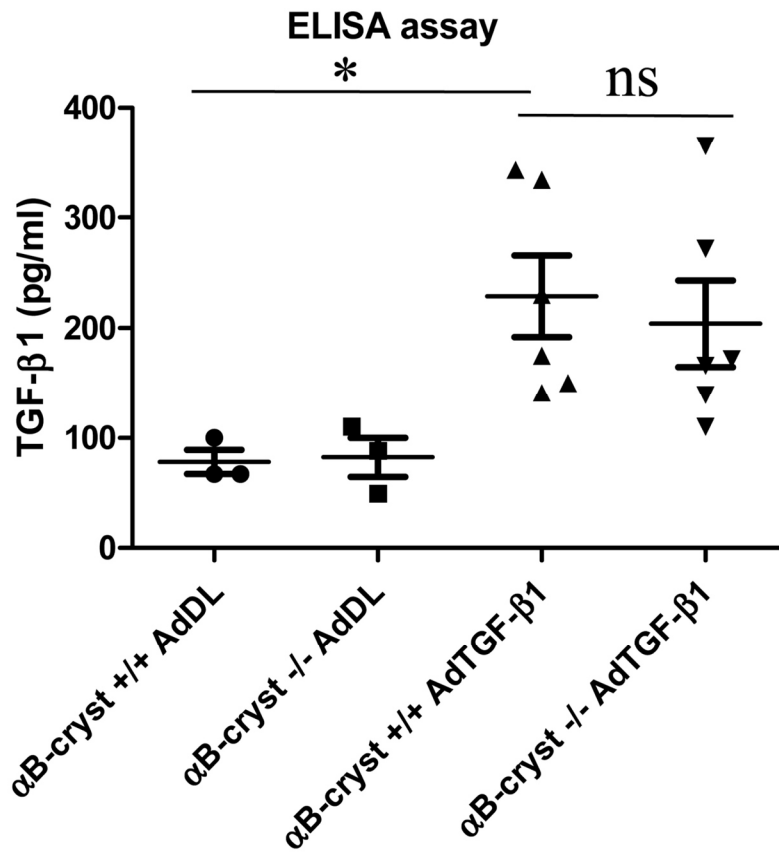
α B-crystallin expression was assessed by western blot in Met5A cells left untreated or transfected with interferin only, scramble or α B-crystallin specific siRNA and treated with bleomycin (100uM).

Supplemental Figure S4 : The lack of α B-crystallin impairs nuclear localization of Smad4 in primary mesothelial cells

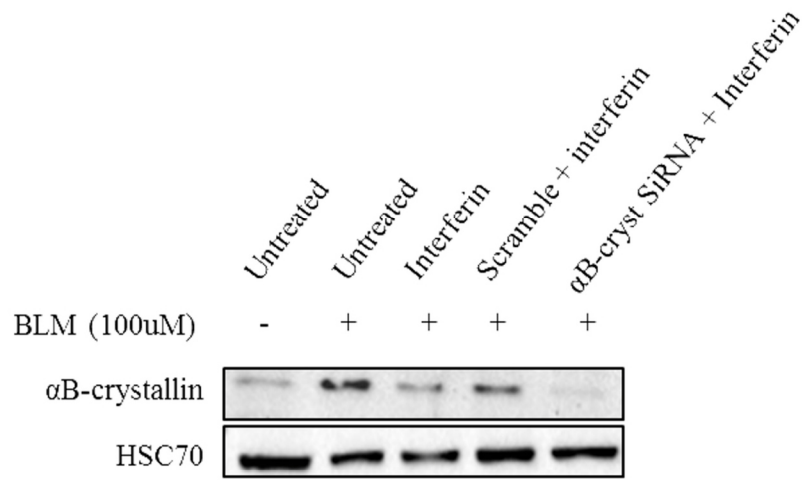
Immunofluorescence for Smad4 (red) in primary pleural mesothelial cells from WT or α B-crystallin deficient mice treated with rTGF- β 1. Nuclei staining: DAPI, blue. Representative images are shown (x630, n=3).



Supplemental Figure S1 : α B-crystallin is expressed in the pleura of fibrotic lungs.
 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 (n=5, 200x).
26x8mm (600 x 600 DPI)

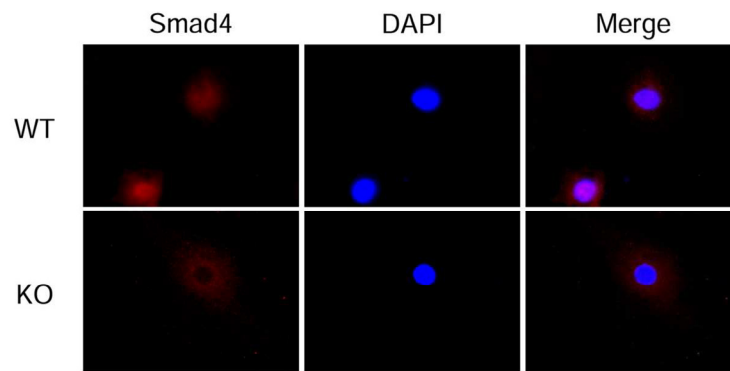


Supplemental Figure S2 : WT and KO mice express adenoviruses encoding TGF- β 1 to the same extent
 Total mouse TGF- β 1 was measured by ELISA on PLF from WT and KO mice 10 days after intrapleural administration of AdTGF- β 1 or AdDL . Mean \pm SEM, * p \leq 0.05, AdTGF- β 1: n =6/group and AdDL: n =3/group.
 86x89mm (600 x 600 DPI)



Supplemental Figure S3 : α B-crystallin SiRNA validation

α B-crystallin expression was assessed by western blot in Met5A cells left untreated or transfected with interferin only, scramble or α B-crystallin specific siRNA and treated with bleomycin (100uM).
45x24mm (600 x 600 DPI)



Supplemental Figure S4 : The lack of α B-crystallin impairs nuclear localization of Smad4 in primary mesothelial cells
 Immunofluorescence for Smad4 (red) in primary pleural mesothelial cells from WT or α B-crystallin deficient mice treated with rTGF- β 1. Nuclei staining: DAPI, blue. Representative images are shown (x630, n=3).
 69x28mm (600 x 600 DPI)

Article 2. Données supplémentaires soumises pour publication en ligne.

Pleural inhibition of the caspase-1/IL-1 β pathway diminishes profibrotic lung toxicity of bleomycin

Authors: Olivier Burgy, Pierre-Simon Bellaye, Sebastien Causse, Guillaume Beltramo, Guillaume Wettstein, Pierre-Marie Boutanquoi, Françoise Goirand, Carmen Garrido, Philippe Bonniaud.

Online supplemental material

List of online supplemental material

- Supplemental figure legends.
- Figure S1. Scheme of the different models used in this work.
- Figure S2. In depth subpleural collagen quantification.
- Figure S3. Intravenous BLM injections trigger collagen accumulation mainly in the subpleural areas by D14 with overexpression of HSP47.
- Figure S4. BLM promotes an inflammation profile of the BALF but not in the blood.
- Figure S5. BLM triggers the accumulation of NLRP3 protein in Met5A cells.
- Figure S6. Intravenous BLM induces TGF- β 1 overproduction in mouse lung at D21.

Supplemental figure legends

Figure S1. Scheme of the different models used in this work. A) Model of pulmonary fibrosis induced by repetitive intravenous injection of bleomycin. B) Model of pleural blockade of IL-1 β along with fibrosis induction. C) Model of specific pleural cell labelling by pleural delivery of AdLacZ. Red arrows indicate time points for intravenous bleomycin injection, grey arrows for pleural IL-1ra delivery, blue arrows for intrapleural AdLacZ injection and black arrows time-point at which the animals are sacrificed.

Figure S2. In depth subpleural collagen quantification. A) Representative image of picosirius red-stained section from BLM-injected mouse lung targeting the pleura acquired under polarized light (scale bar: 100 μ m). Using a special homemade ImageJ macro, intensity of picosirius red signal was measured according to the distance to the pleura. Data were plotted

to form a curve with the mean intensity of all pixels for a given distance to the pleura (lower panel). B) Representative image of picrosirius red-stained section from NaCl- or BLM-injected mouse lung targeting the pleura acquired under polarized light. C) Histomorphometric analysis of picrosirius red-stained lung sections from mice receiving either NaCl or BLM intravenously at D3, D14 and D21. Measurements were performed on the subpleural areas (500 μ m). Mean \pm SEM, n=4 for NaCl groups, n=6 for BLM groups. **p \leq 0.01.

Figure S3. Intravenous BLM injections trigger collagen accumulation mainly in the subpleural areas by D14 with overexpression of HSP47. A, B) Histomorphometric analysis of picrosirius red-stained lung sections from mice receiving either NaCl or BLM intravenously at D3, D14 and D21. Measurement were performed on A) pleural and B) subpleural areas as previously described (5). Mean \pm SEM, n=4 for NaCl groups, n=6 for BLM groups. **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001. C) Histological analysis of lung parenchyma from mice receiving NaCl or BLM intravenously. Representative images at D21 after beginning of injections are shown. n=4 for NaCl and n=6 for BLM. H&E staining. Scale bars: 100 μ m. D) Histomorphometric quantification of collagen accumulation on picrosirius red-stained lung sections from BLM- or NaCl-treated mice. n=4 for NaCl groups, n=6 for BLM groups. E) Collagen quantification by Sircol assay on whole lung lysates from BLM- or NaCl-injected mice (n = 5/group). F) Western blot analysis of collagen and HSP47 expression: n=2 mice/group. β -actin: loading control. F) HSP47 immunostaining on lung sections from mice receiving NaCl or BLM at D3 and D14. Representative images are shown and positive cells are indicated (arrow) (n=4 NaCl, n=6 BLM. Scale bars: 100 μ m). Data expressed as mean \pm SEM. *p \leq 0.05, **p \leq 0.01.

Figure S4. BLM promotes an inflammation profile of the BALF but not in the blood. A) Cell recruitment in BALF was assessed by total cell count at D3, D14 and D21. Results are expressed as mean \pm SEM. B) Inflammation was estimated by differential count in BALF after May-Grünwald Giemsa staining. Results are expressed as percentages of total cells. n=4 for NaCl groups, n=6 for BLM groups. C) Differential cell count in blood after May-Grünwald Giemsa staining. Data are expressed as absolute density (mean \pm SEM. n=5/group). D) Representative images from the proteome profiler (left panel). Spots for IL-1 β , TNF- α and IL-6 as well as positive control are indicated. Relative levels of proinflammatory cytokines were analyzed by densitometry and expressed as % of intensity normalized to the positive control (right panel).

Figure S5. BLM triggers the accumulation of NLRP3 protein in Met5A cells. Staining of NLRP3 (green) in Met5A in the presence of BLM or control. Nuclear staining: DAPI (blue). Spots are indicated (arrow), scale bars: 20 μ m.

Figure S6. Intravenous BLM induces TGF- β 1 overproduction in mouse lung at D21. A) TGF- β 1 accumulation in the PLF of NaCl- or BLM-injected mice at D21 was measured by ELISA. NaCl-normalized results are expressed as mean \pm SEM. n=5/group. B) Representative FISH images of TGF- β 1 mRNA expression in lung sections at D21 from mice receiving NaCl or BLM (n=5/group). TGF- β 1 mRNA: red, DAPI: blue, dotted lines represent the pleura, scale bars: 50 μ m. Pleura (dotted line) and TGF- β 1 mRNA expression spots (arrows) are indicated.

Figure S1

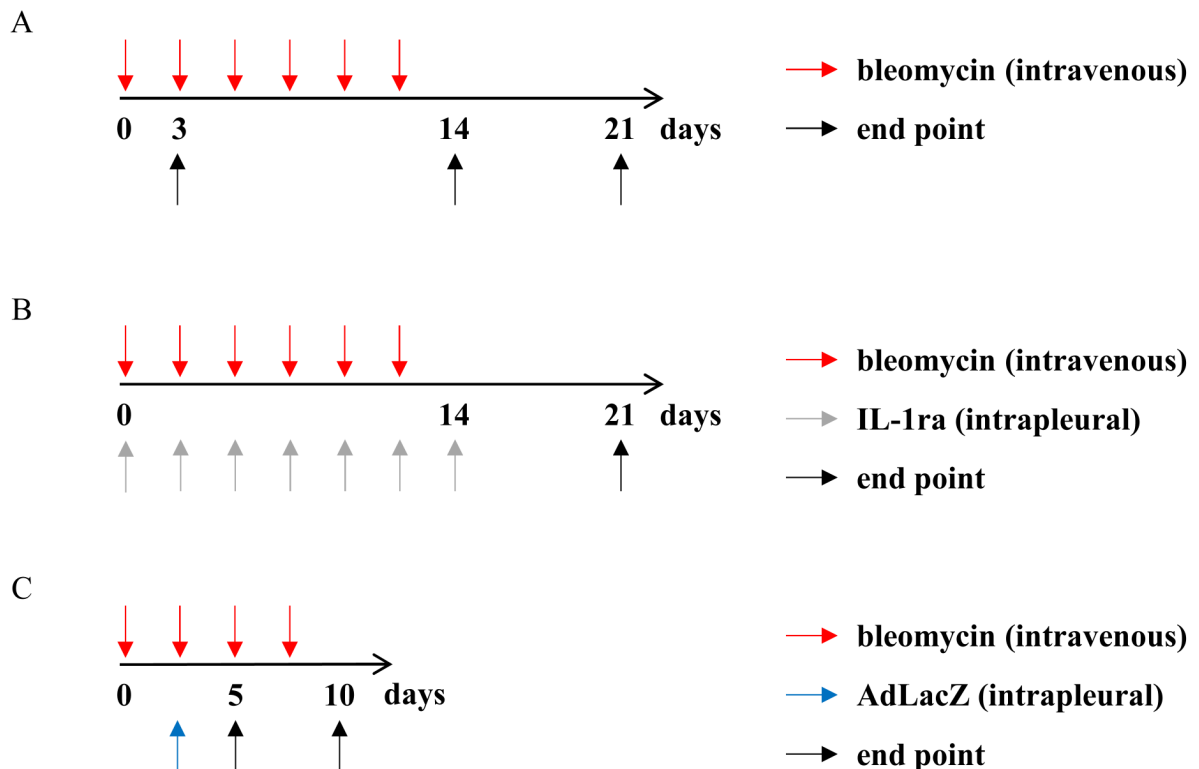


Figure S2

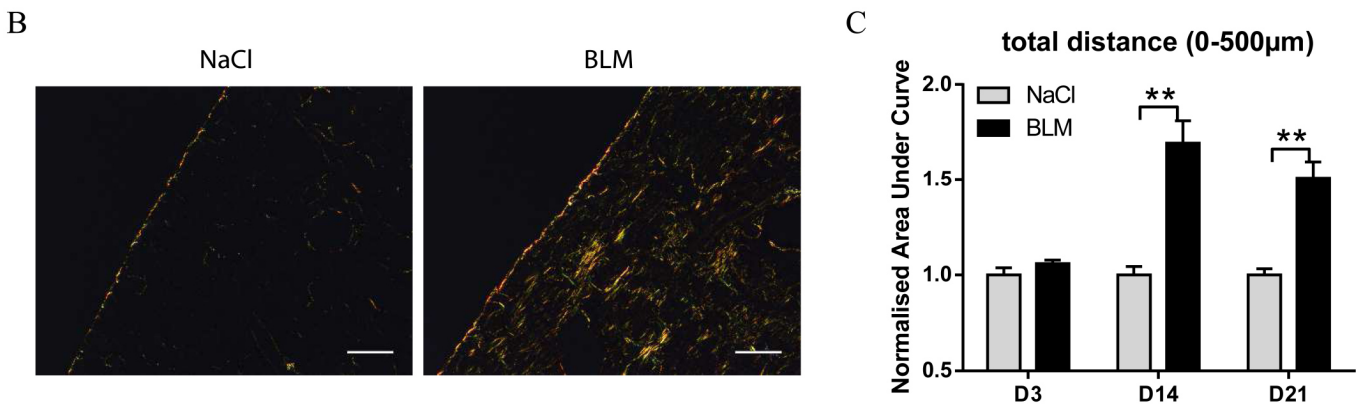
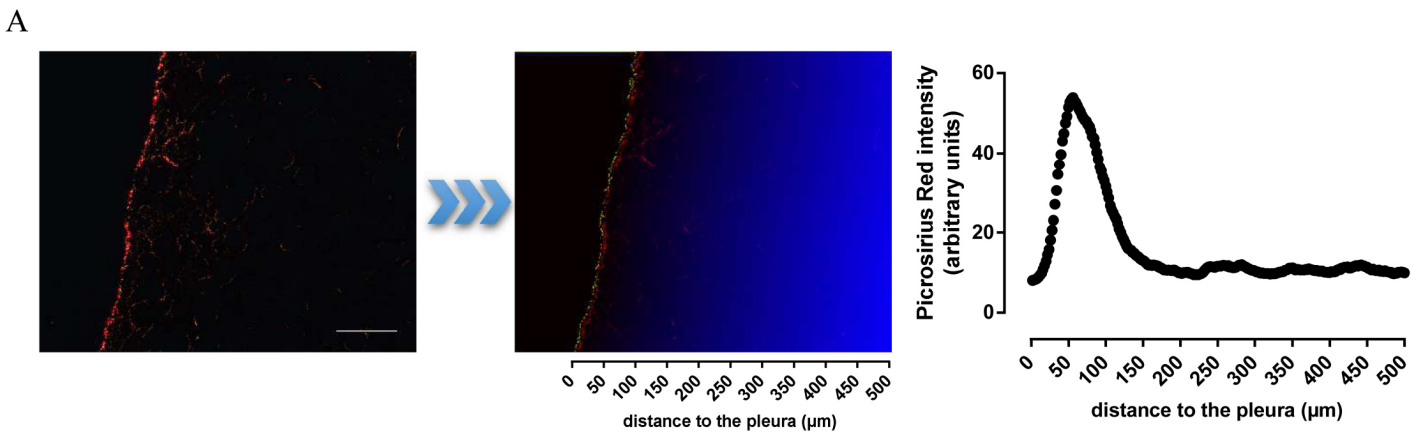


Figure S3

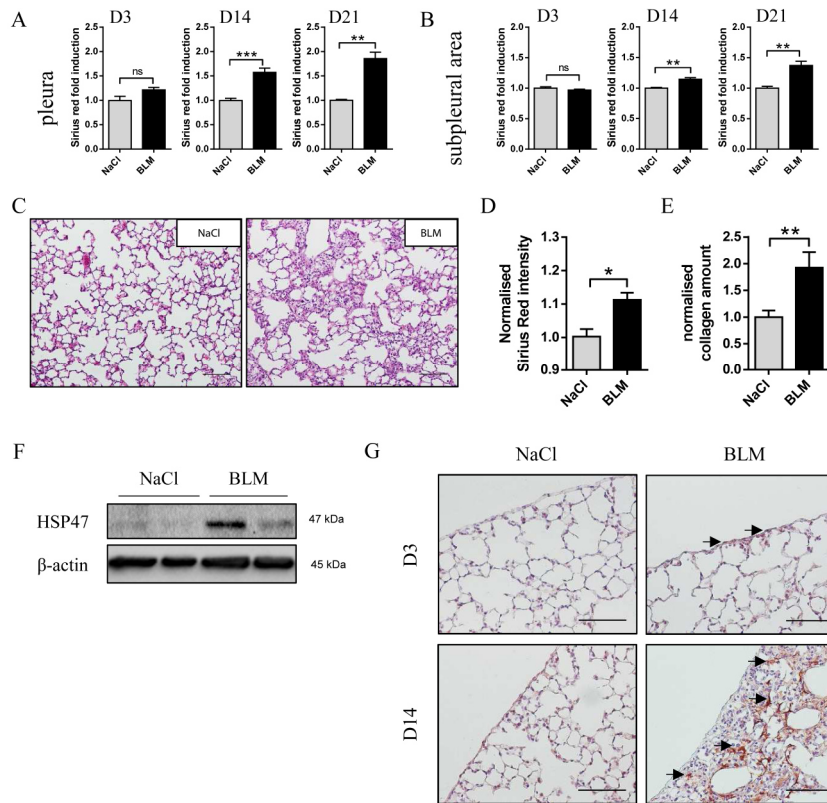


Figure S4

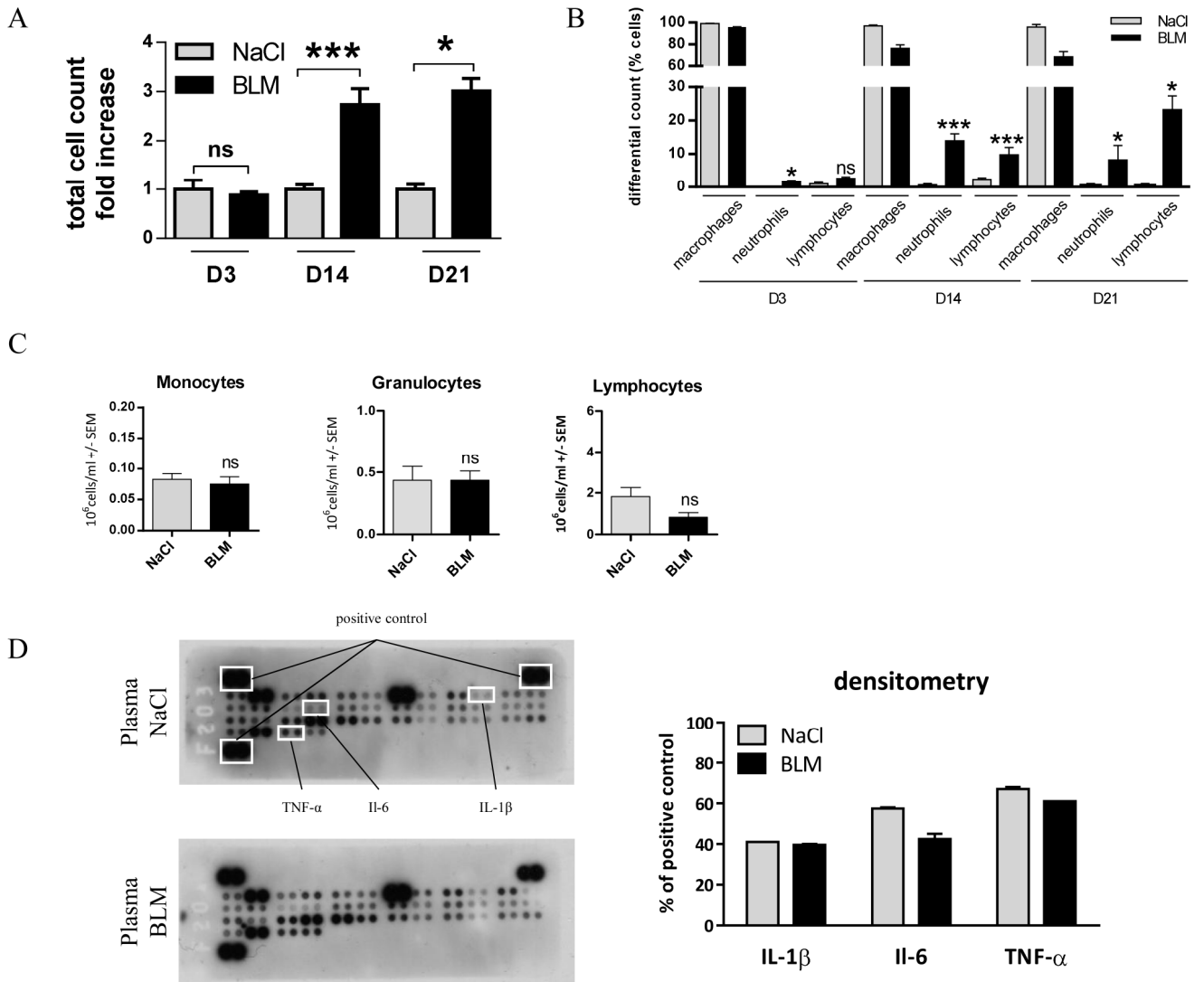


Figure S5

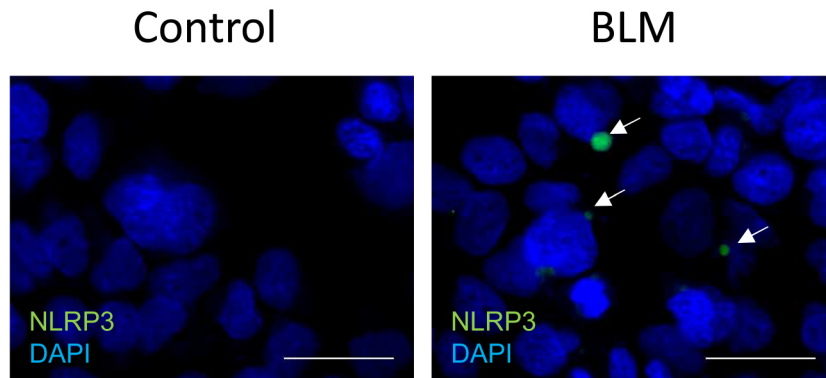
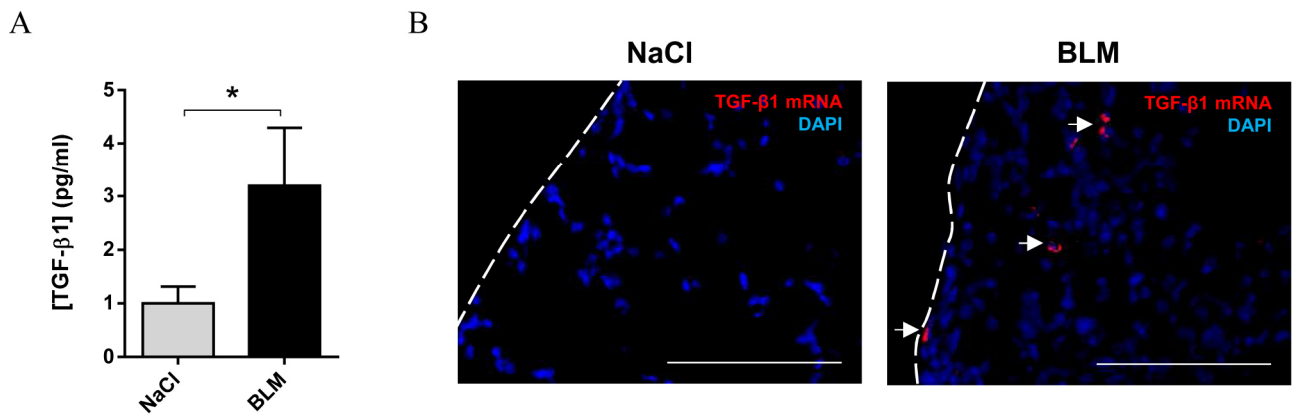


Figure S6



Article 3. Données supplémentaires publiées en ligne.

Figure #S1

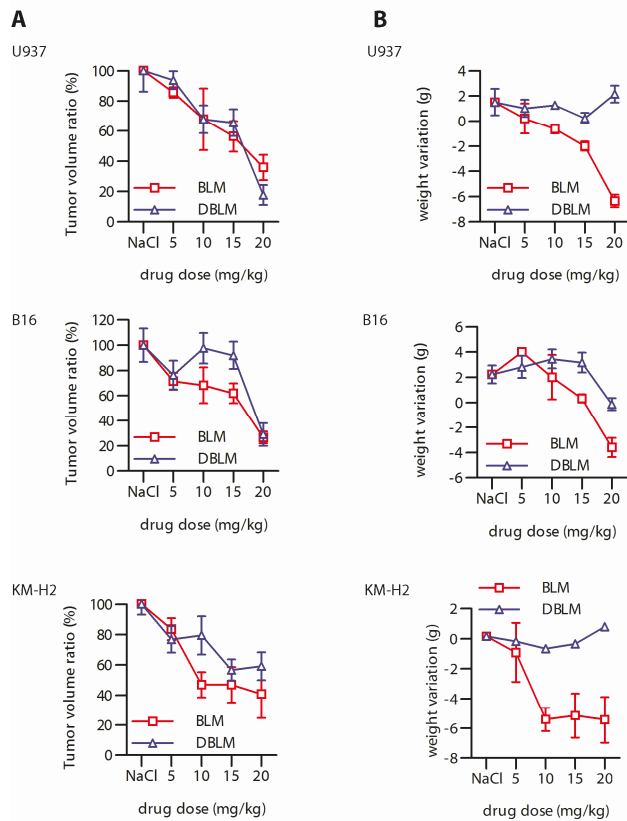


Figure S1. *Deglyco-BLM has the same antitumoral profile compared to BLM, but lacks toxic side effects.*

U937, B16 or KM-H2 cells were subcutaneously injected into Nude, C57BL/6 or NOG mice, respectively. After tumor establishment, mice received i.p. injections of NaCl, BLM or deglyco-BLM (DBLM) every other day for 8 (U937, B16) or 10 (KM-H2) days. A) Dose-dependent effect of BLM and DBLM (5, 10, 15 and 20 mg/kg) after 8 or 10 days. Data presented as the ratio of tumor size decrease in the BLM- and DBLM- normalized to the NaCl-treated animals. B) Weight change of mice treated with BLM or DBLM at the indicated doses compared to NaCl treated mice.

Figure #S2

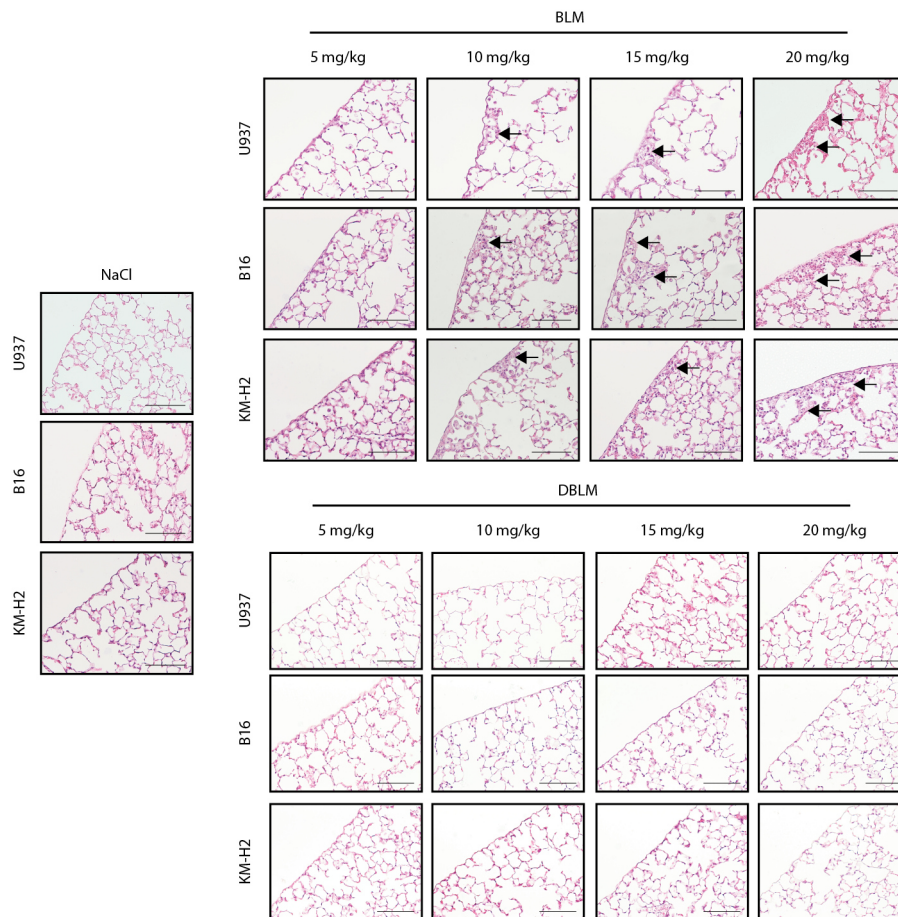


Figure S2. *BLM, but not deglyco-BLM, induces lung toxicity.*

U937, B16 or KM-H2 cells were subcutaneously injected into Nude, C57BL/6 or NOG mice, respectively. After tumor establishment, mice received i.p. injections of NaCl, BLM or DBLM every other day. Representative histology after 8 (U937, B16) or 10 (KM-H2) days at indicated doses (H&E staining, Scale bars = 100 μ m. Arrows highlight the injured areas). n=6 mice/group.

Figure #S3

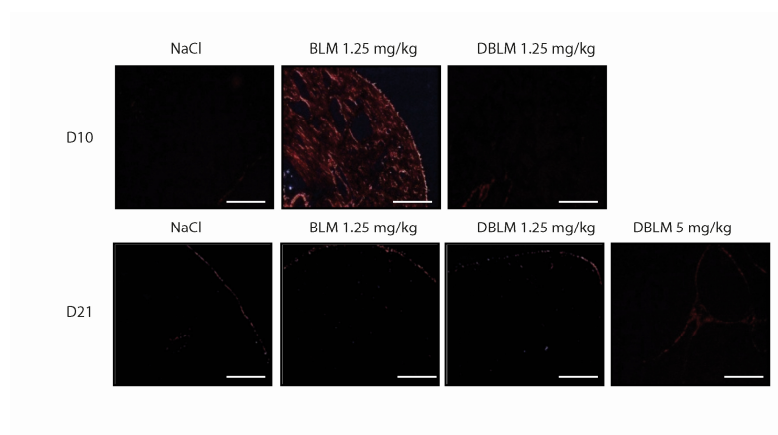


Figure S3. *BLM, but not deglyco-BLM, induces collagen accumulation in the lung.*

Collagen accumulation in C57BL/6 mouse lung sections, 10 and 21 days after i.t. administration of BLM or DBLM or NaCl (Picosirius red staining, Scale bars = 100 μ m, n=9 mice in BLM or DBLM groups, n=6 mice in NaCl group).

Figure #S4

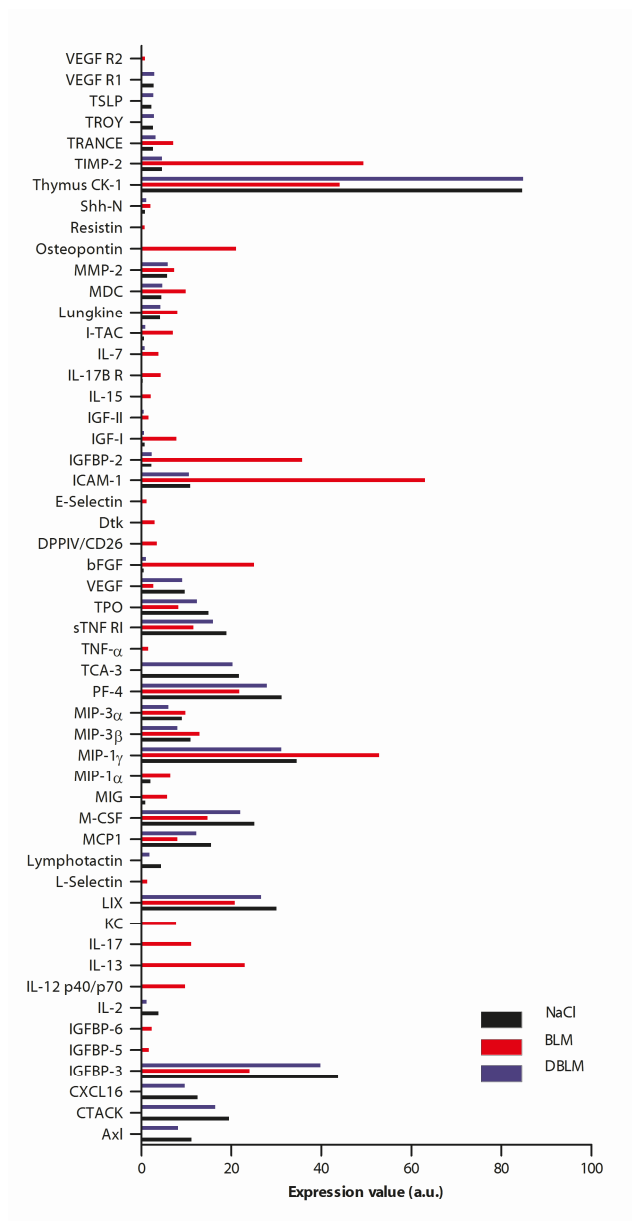


Figure S4. *Deglyco-BLM does not induce inflammation and/or fibrosis related cytokines.*

Cytokines levels have been determined from mice lungs treated with NaCl, BLM or DBLM (5 mice per group) at day 4. Expression value is expressed in arbitrary unit (a.u.).

Figure #S5

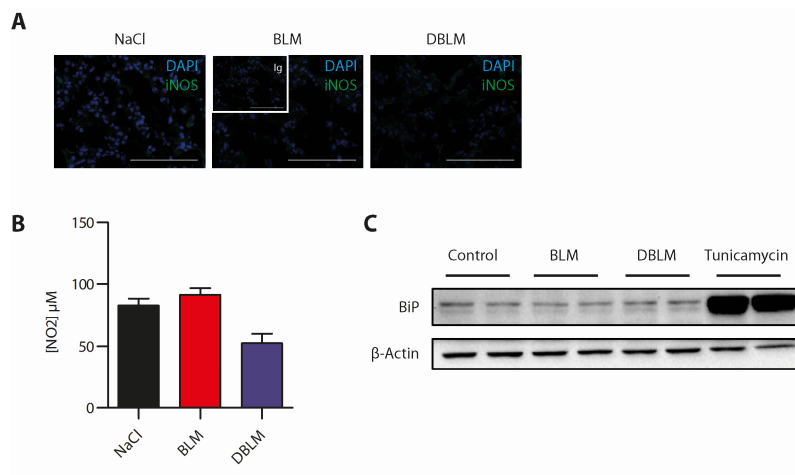


Figure S5. *Deglyco-BLM as BLM does not induce nitrogen species or ER stress in A549 cells.*

A) NO amount was determined on lung sections from mice i.t. injected with either BLM, DBLM (2.5mg/kg) or NaCl (n=5/group) using iNOS immunostaining (green). Nuclei are stained with DAPI (blue). Insert Ig, negative IgG control. Scale bars = 50μm. B) Nitrites dosage on lung lysates from the mice described above. C) Western blot analysis for the ER stress marker BIP in cells treated 24h with either NaCl (control), BLM, DBLM (100uM 24h) or Tunicamycin (ER stressor, positive control).

Figure #S6

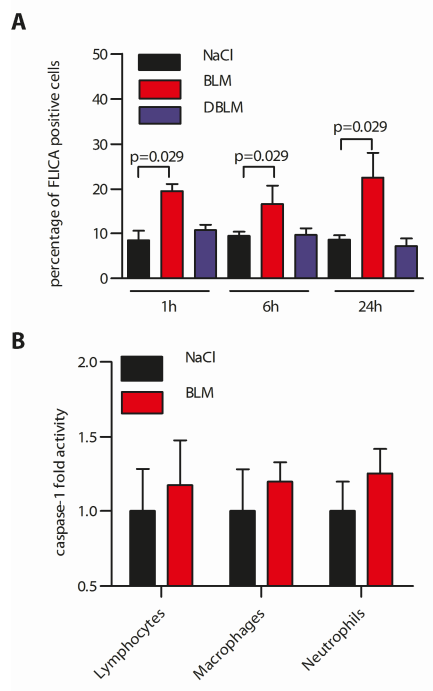


Figure S6. *BLM induces caspase-1 activation in alveolar epithelial cells not in immune cells.*

A) FLICA-measured caspase-1 activity in A549 cells either left untreated or treated with BLM or DBLM (200 μ M). Representative data (3 independent experiments). B) Lungs from C57BL/6J mice intra-tracheally injected with NaCl or BLM (5mg/kg) were collected at D3 and homogenate were stained with caspase-1 specific FLICA probe as well as for lymphocytes (CD3), macrophages (F4/80) and neutrophils (Ly6G) markers. Staining was followed by flow cytometry. Data are presented as mean of fluorescence \pm SEM of caspase-1 activation normalized to the control.

Figure #S7

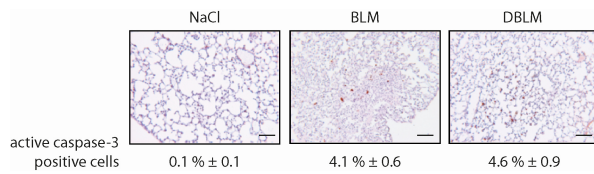


Figure S7. *Deglyco-BLM and BLM induce similar caspase-3 cleavage.*

Cleaved caspase-3 was determined in the parenchyma of the lungs in nude mice after NaCl, BLM or DBLM i.p. administration every other day during 8 days. Representative images are shown. 5 mice/group. Scale bars = 100 μ m.

Curriculum Vitae

Field of research

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

Education

- since 2012 : **PhD Thesis**, Cell and Molecular Biology. Burgundy university, Dijon, France
2011 - 2012 : **MRes**, Cell and Molecular Biology, with Honors. Burgundy university, Dijon, France
2010 - 2011 : **MSc** Biochemistry, with Honors. Burgundy university, Dijon, France
2009 - 2010 : **Vocational Bachelor's Degree**, Cell and Tissue Culture and Molecular Biology. Institute of Technology, Dijon, France
2007 - 2009 : **Undergraduate vocational diploma**. Institute of Technology, Dijon, France

Work experience

- since Sept 2012 : PhD thesis - **UMR INSERM U866 – « Lipids, Nutrition, Cancer »**, Dijon, France
PhD advisor: Philippe Bonniaud, MD, PhD.
Study of the bleomycin's lung toxicity :
 - Involvement of caspase-1/IL-1 β axis on the pleura and mesothelial cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis
 - Role of the stress protein α B-crystallin in the TGF- β 1 signaling and in the migration of pleural cells in pleuro-pulmonary fibrosis models
 - Demonstration of antitumor activity of deglycosylated bleomycin *in vivo*
- Jan - June 2012 : MRes - **UMR INSERM U866 – « Lipids, Nutrition, Cancer »**, Dijon, France
Development and characterization of a pulmonary fibrosis model based on systemic injection of bleomycin
- Jan - Feb 2011 : MSc training period - **UMR INSERM U866 – « Lipids, Nutrition, Cancer »**, Dijon, France
Role of HSP27 in pulmonary fibrosis and in epithelial-to-mesenchymal transition

Technical skills

- In vivo** Intravenous, Intra-pleural, Intra-tracheal, Intra-peritoneal and underskin injection on mice. Induction of lung fibrosis (bleomycin, adenovirus-mediated). Adenovirus-mediated labeling of pleural cells. Induction of tumor models (Hodgkin lymphoma KM-H2, melanoma B16F10, leukemia U937). Collection of fluids (blood, BALF, pleural lavage). Dissection and organ recovery.
- In vitro** Cell culture (murine primary mesothelial cells, murine lung fibroblasts, murine type II lung epithelial cells and established cell lines), transfections (plasmids, siRNA, antisense oligonucleotids), induction of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Western blot, quantitative PCR, Immunofluorescence, Co-immunoprecipitation, Immunohistochemistry (paraffin or frozen section, Immunohistochemistry, ELISA, PAI-1 luciferase assay, Flow cytometry (6 colors).

Other skills

- Language : French: mother tongue, English: fluent, German: basic knowledge
- Certificate for animal experimentation (FELASA C level equivalent). 2014, Dijon, France
- Lecture on Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) and its role on fibrosis and cancer (Nov 2014). Master “Molecular and Cellular Signaling”, Faculty of Medicine, Dijon, France
- Softwares : office, flow cytometry software (Cellquest, Diva, FlowJo)

Publications

- **Burgy O**, Bellaye PS, Causse S, Beltramo G, Wettstein G, Boutanquoi PM, Goirand F, Garrido C, Bonniaud P. Pleural inhibition of the caspase-1/IL-1 β pathway diminishes profibrotic lung toxicity of bleomycin. Respiratory Research. Accepted. (IF : 3.75)
- **Burgy O***, Wettstein G*, Bellaye PS, Decolonne N, Racoeur C, Goirand F, Beltramo G, Hernandez JF, Kenani A, Camus P, Bettaieb A, Garrido C, Bonniaud P. Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. Science Translational Medicine. 2016 Feb 17;8(326):326ra20. (IF : 16.3)
- **Burgy O***, Bellaye PS* , Colas J, Fabre A, Marchal-Somme J, Crestani B, Kolb M, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. Anti-fibrotic role of α B-crystallin inhibition in pleural and subpleural fibrosis. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2015 Feb;52(2):244-52. (IF : 4.1)
- Bellaye PS, **Burgy O**, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil? Pharmacology & Therapeutics. 2014 Aug;143(2):119-32. (IF : 11)
- Bellaye PS, Wettstein G, **Burgy O**, Causse S, Joannes A, 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 a key player for Smad4’s nuclear localisation: impact on pulmonary fibrosis. Journal of Pathology. 2014 Mar;232(4):458-72. (IF : 7.4)

Scientific communications

Oral presentations :

- Annual Retreat of the International Graduate Programme Molecular Biology and Medicine of the Lung. University of Giessen. July, 20-22th 2016. Giessen, Germany
- ERS (European Respiratory Society) Annual Congress. Sept, 6 – 10th 2014. Munich, Germany
- J2R (French Respiratory research days). Oct, 10-11th 2014. Bordeaux, France
- Congress of French Pneumological Society. 31 Jan - 2 Feb 2014. Marseille, France

Posters :

- 19th ICLAF (International Colloquium on Lung and Airways Fibrosis). Sept, 24-28th 2016. Dublin, Ireland
- LSC (Lung Science Conference). March, 10 – 13th 2016. Estoril, Portugal
- MPLC (Munich Pittsburgh Lung Conference. Oct, 2-3rd 2015. Munich, Germany
- French colloquium for Translational Research in Oncology. June, 25-26th 2015. Dijon, France
- J2R (French Respiratory Research days). Oct, 10-11th 2014. Bordeaux, France
- 18th ICLAF (International Colloquium on Lung and Airways Fibrosis). Sept, 20-24th 2014. Mont Tremblant, Quebec, Canada
- LSC (Lung Science Conference). March, 21 – 23th 2014. Estoril, Portugal
- Congress of French Pneumological Society. 31 Jan – 2 Feb 2014. Marseille, France
- J2R (French Respiratory research days). Oct, 11th 2013. Montpellier, France

- BALR (British Association for Lung Research) Summer Meeting. July, 10-12th 2013. Nottingham, England
- J2R (French Respiratory research days). Oct, 19th 2012. Lille, France
- 17th ICLAF (International Colloquium on Lung and Airways Fibrosis). 29 Sept – 3rd Oct 2012. Modena, Italy

Price and distinction :

- Poster price of Respiratory research days. Lung cancer- inflammation session. (J2R - Oct 2012). 500€
- ERS Travel bursary from Lung Science Conference organizer (LSC - March 2014). 600€
- 2 mobility grants for international communications from the University of Burgundy. Session of Nov 2013 (BALR Summer Meeting - July 2013) and Oct 2014 (ICALF - Sept 2014). 500€ and 880€

Other :

- ERS (European Respiratory Society) Annual Congress. Sept, 3 – 7th 2014. London, United Kingdom. Chairman of thematic poster sessions “Novel insights into alveolar and bronchial epithelial cell injury and repair” and “Common mechanisms in lung development and fibrosis”.
- Student supervision : 1 PhD student, 2 master students.
- Since Jan 2016 : Member of the European Respiratory Society.
- Since Dec 2013 : Member of the INSERM UMR866 Laboratory council (student delegate).
- Since 2013 : Organization of student presentations at the INSERM UMR866.

Autres publications issues des travaux de thèse

- Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, Besnard V, Joannes A, Colas J, Causse S, Marchal-Somme J, Fabre A, Crestani B, Kolb M, Gauldie J, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. The small heat-shock protein α B-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. J Pathol. 2014 Mar ; 232(4):458-72.
- Bellaye PS, Burgy O, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? Pharmacol Ther. 2014 Aug ; 143(2):119-32. (revue)
- Bellaye PS, Burgy O, Colas J, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Small Heat Shock Proteins and Fibrosis. The Big Book on Small Heat Shock Proteins (Part III) 2015. Volume 8 of the series Heat Shock Proteins pp 315-334. (chapitre de livre)

The small heat-shock protein α B-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis

Pierre-Simon Bellaye,^{1,2} Guillaume Wettstein,^{1,2} Olivier Burgy,^{1,2} Valérie Besnard,³ Audrey Joannes,³ Julien Colas,^{1,2} Sébastien Causse,^{1,2} Joëlle Marchal-Somme,³ Aurélie Fabre,⁴ Bruno Crestani,^{3,5,6} Martin Kolb,⁷ Jack Gaudie,⁷ Philippe Camus,^{1,2,8} Carmen Garrido^{1,2,#} and Philippe Bonniaud^{1,2,8,*#}

¹ INSERM U866 Équipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Dijon, France

² Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon, France

³ INSERM U700, Paris, France

⁴ St Vincent's University Hospital, Dublin, Ireland

⁵ Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶ Faculté de Médecine Bichat, Paris APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, Paris, France

⁷ Center for Gene Therapeutics, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

⁸ Service de Pneumologie, CHU, Dijon, France

*Correspondence to: P Bonniaud, Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, CHU le Bocage 21079 Dijon, France. E-mail: philippe.bonnaud@chu-dijon.fr

#These authors contributed equally to this study.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease characterized by the proliferation of myofibroblasts and the accumulation of extracellular matrix (ECM) in the lungs. TGF- β 1 is the major profibrotic 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 chaperone and is known to play 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-dependent 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 adenoviral-mediated over-expression of IL-1 β or TGF- β 1. We show *in vitro* in primary epithelial cells and fibroblasts that α B-crystallin increases the nuclear localization of Smad4, thereby enhancing the TGF- β 1–Smad pathway and the consequent activation of TGF- β 1 downstream genes. α B-crystallin over-expression 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, TIF1 γ can freely interact with Smad4. Consequently, Smad4 mono-ubiquitination and nuclear export are favoured and thus TGF- β 1–Smad4 pro-fibrotic activity is inhibited. This study 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.

Copyright © 2013 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: fibrogenesis; inflammation; TGF- β 1; heat-shock proteins

Received 15 July 2013; Revised 25 November 2013; Accepted 29 November 2013

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Diseases such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), that involve chronic fibrotic changes in the lung structure, are clinically challenging. 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 3 years and with no effective therapy [1]. IPF development is classically viewed as 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, as they induce a strong accumulation of extracellular matrix (ECM), they are the main cause of tissue remodelling that occurs during repair. The anti-cancer drug bleomycin is known to induce lung fibrosis in humans as a side-effect and is widely used to induce experimental pulmonary fibrosis in animals [2,3].

TGF- β 1 is a key cytokine involved in fibrosis in many different organ systems. TGF- β 1 causes myofibroblast proliferation and differentiation, thus



Associate editor: N. Frossard

Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil?

Pierre-Simon Bellaye^{a,b}, Olivier Burgy^{a,b}, Sebastien Causse^{a,b}, Carmen Garrido^{a,b}, Philippe Bonniaud^{a,b,c,*}^a INSERM U866 équipe labellisée Ligue contre le cancer, 21000 Dijon, France^b Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France^c Service de Pneumologie, CHU Dijon, 21079 Dijon, France

ARTICLE INFO

Available online 26 February 2014

Keywords:
 Fibrogenesis
 HSP
 TGF- β 1 signaling
 EMT

ABSTRACT

Heat shock proteins (HSPs) are key regulators of cell homeostasis, and their cytoprotective role has been largely investigated in the last few decades. However, an increasing amount of evidence highlights their deleterious effects on several human pathologies, including cancer, in which they promote tumor cell survival, proliferation and drug resistance. Therefore, HSPs have recently been suggested as therapeutic targets for improving human disease outcomes. Fibrotic diseases and cancer share several properties; both pathologies are characterized by genetic alterations, uncontrolled cell proliferation, altered cell interactions and communication and tissue invasion. The discovery of new HSP inhibitors that have been shown to be efficacious against certain types of cancers has given rise to a new field of research that investigates the activity of these compounds in other incurable human diseases such as fibrotic disorders. The aim of this review is to discuss new findings regarding the involvement of HSPs in the pathogenesis of organ fibrosis and to note recent discoveries that indicate that HSPs could be important therapeutic targets to improve the current dismal outcome of fibrotic diseases.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	119
2. The fibrotic processes	120
3. Heat Shock Protein 90 inhibitors: anti-fibrotic drugs?	121
4. Heat Shock Protein 70 and fibrosis: intracellular versus extracellular function	122
5. Heat Shock Protein 110: a role in cardiac fibrosis?	124
6. Heat Shock Protein 47: A therapeutic target to prevent collagen accumulation	124
7. Small heat shock proteins (sHSP)	126
8. Concluding remarks	129
Conflict of interest statement	129
Acknowledgment	129
References	129

Abbreviations: 17-AAG, 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin; AP-1, Activator protein 1; Apaf-1, Apoptotic protease-activating factor 1; CHIP, Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein; CsA, Cyclosporine A; ECM, Extracellular matrix; EMT, Epithelial-to-mesenchymal transition; ER, Endoplasmic reticulum; ERK, Extracellular signal-regulated kinase; GGA, Geranylgeranylacetone; GP96, Glycosylated protein 96; GR, Glucocorticoid receptor; GRP, Glucose-regulated protein; HSC, Hepatic stellate cell; HSE, Heat shock element; HSF, Heat shock factor; HSP, Heat shock protein; IL-1 β , Interleukin 1 beta; IPF, Idiopathic pulmonary fibrosis; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MK2, MAPKAP kinase2; PDB, Peptide-binding domain; 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; TIF1 γ , Transcriptional intermediary factor 1 γ ; TRAIL, Tumor necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand; TRAP1, Tumor necrosis-factor receptor-associated protein 1; UUU, Unilateral Ureteral Obstruction.

* Corresponding author at: Service de pneumologie et soins intensifs respiratoires, CHU le bocage, 21079 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 29 32 63.

E-mail address: philippe.bonnaud@chu-dijon.fr (P. Bonniaud).

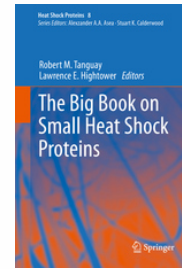
1. Introduction

Cells are constantly exposed to damage caused by many environmental factors (heat shock, oxidative stress, UV), exposure to pharmacologic toxic agents (heavy metals, alcohol, chemotherapy) or certain pathological conditions. Protective mechanisms are established in cells to maintain their function. The “heat shock response” was first highlighted in 1964 in *Drosophila* by Ritossa (Ritossa, 1964; Tissieres et al., 1974) and is characterized by the expression of a particular protein superfamily, the heat shock proteins (HSPs). HSPs are highly conserved cellular proteins present in many species such as yeast, bacteria, plants, animals and humans.

Chapter 13

Small Heat Shock Proteins and Fibrosis

Pierre-Simon Bellaye, Olivier Burgy, Julien Colas,
Sebastien Causse, Carmen Garrido, and Philippe Bonniaud



Abstract Small heat shock proteins (sHSP) are involved in many essential cellular mechanisms both in physiologic and pathologic conditions. HSP27 (HSPB1), α B-crystallin (HSPB5) and HSP20 (HSPB6), the most studied members, are stress-inducible chaperones with an anti-aggregation function. They have been shown to inhibit apoptosis by interacting with proteins involved in programmed cell death such as cytochrome c or caspases, to have anti-oxidant properties and/or to modulate protein homeostasis by participating in the proteasomal degradation of specific proteins under stress conditions. Heat shock proteins accumulate in cancer cells and this overexpression is needed for the cancer cells' survival. Accordingly, the inhibition of heat shock proteins such as HSP27 is an emerging strategy in cancer therapy (already is in phase II clinical trials). Fibrogenesis and cancer share several properties as both pathologies are characterized by genetic alterations, uncontrolled cell proliferation, altered cell interaction and communication and tissue invasion.

The current review will discuss the involvement of HSP27, α B-crystallin and HSP20 in the process of fibrogenesis and in established organ fibrosis. We will dissect the impact of their function inducing the recruitment of inflammatory cells, the

P.-S. Bellaye • O. Burgy • J. Colas • S. Causse
INSERM U866 équipe labellisée Ligue contre le cancer, 21000 Dijon, France
Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France

C. Garrido (✉)
INSERM U866 équipe labellisée Ligue contre le cancer, 21000 Dijon, France
Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France
Anticancer centre Georges François Leclerc, Dijon, France
Faculty of Medicine and Pharmacy, INSERM UMR866,
7, boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France
e-mail: cgarrido@u-bourgogne.fr

P. Bonniaud
INSERM U866 équipe labellisée Ligue contre le cancer, 21000 Dijon, France
Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21033, France
Service de Pneumologie, CHU Dijon, 21079 Dijon, France

© Springer International Publishing Switzerland 2015
R.M. Tanguay, L.E. Hightower (eds.), *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*, Heat Shock Proteins 8, DOI 10.1007/978-3-319-16077-1_13

315