



HAL
open science

Le macrophage dans la fibrose pulmonaire idiopathique : effets du nintédanib et expression du biomarqueur pronostique CXCL13

Nessrine Bellamri

► To cite this version:

Nessrine Bellamri. Le macrophage dans la fibrose pulmonaire idiopathique : effets du nintédanib et expression du biomarqueur pronostique CXCL13. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B067 . tel-02874584v2

HAL Id: tel-02874584

<https://theses.hal.science/tel-02874584v2>

Submitted on 7 Jul 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « *Sciences Pharmaceutiques* »

Par

Nessrine BELLAMRI

**Le macrophage dans la fibrose pulmonaire idiopathique :
Effets du nintédanib et expression du biomarqueur pronostique
CXCL13.**

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 18 Décembre 2019.
Unité de recherche : UMR Inserm 1085 - Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET).

Rapporteurs avant soutenance :

Sophie LANONE : Directrice de recherche Inserm, Université Paris Est Créteil.

Sylvain MARCHAND-ADAM : Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université de Tours.

Composition du Jury :

Présidente du jury : Nathalie RIOUX-LECLERCQ Professeure des universités - Praticien hospitalier, Université Rennes-1.

Examinatrice : Saadia Kerdine-Römer Professeure des universités, Université Paris-Sud.

Rapporteurs : Sophie LANONE Directrice de recherche Inserm, Université Paris Est Créteil.

Sylvain MARCHAND-ADAM Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université de Tours.

Co-dir. de thèse : Stéphane JOUNEAU Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université Rennes-1.

Dir. de thèse : Laurent VERNHET Professeur des universités, Université Rennes-1.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que la compagnie pharmaceutique Boehringer Ingelheim, qui grâce à leur financement, le projet de thèse s'est déroulé dans de très bonnes conditions.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail. Je remercie ainsi le Professeur Sylvain Marchand-Adam et la directrice de recherche Sophie Lanone d'avoir accepté de lire et d'évaluer ma thèse en qualité de rapporteur. Je remercie également le Professeur Nathalie Rioux-Leclercq et le Professeur Saadia Kerdine-Romer de siéger à mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Je remercie chaleureusement le directeur de notre institut, le Docteur Michel Samson pour m'avoir si bien accueillie au sein de l'IRSET « Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail » au cours de mon Master 2 et durant les années de thèse qui ont suivies. Je remercie particulièrement le Professeur Olivier Fardel pour m'avoir accueillie au sein de son équipe 01 « Contaminants environnementaux et barrière pulmonaire », pour ces conseils et ses encouragements.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse le Professeur Laurent Vernhet qui m'a donné l'opportunité d'effectuer cette thèse. Merci Laurent pour le temps conséquent que tu m'as accordé durant ces trois années de thèse, pour les qualités pédagogiques et la rigueur scientifiques qui m'ont permis de mener à bien mon travail. Mille fois merci Laurent pour ta disponibilité, ta patience, ta confiance et tes conseils. J'ai beaucoup appris d'un point de vue scientifique et humain. C'était un réel plaisir de travailler sur ce projet sous ta direction.

Je remercie chaleureusement mon co-directeur de thèse le Professeur Stéphane Jouneau pour son attention, sa confiance, ses conseils, son écoute et son engagement qui ont été prépondérant pour la bonne réussite de cette thèse. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé pour la relecture de ce manuscrit. C'était un réel plaisir de travailler sur la fibrose pulmonaire idiopathique.

La thèse est loin d'être un travail solitaire, tous les membres du laboratoire IRSET de prêt ou de loin y ont contribué. Cette thèse s'est déroulée dans une ambiance inoubliable partagée lors des pauses déjeuners, autour des mots fléchés, en lisant l'horoscope ou les actualités du jour et au sein même du laboratoire en effectuant un Western Blot ou un Elisa ! C'était un réel plaisir de venir travailler chaque matin au sein de l'IRSET. Un laboratoire que je considère comme une deuxième famille !

Je ne sais comment remercier la Reine du labo Claudie « Morzadec ». Merci Claudie d'être mon garant depuis mon arrivée en France sans même me connaître lol. Merci Claudie pour ta patience, surtout au cours de mon stage de Master 2, on peut dire que j'ai tout appris grâce à toi « Culture cell, Western Blot, Elisa, Cytométrie en flux, » ! Je reviens de loin « De petite pyoupyou à un grand monstre de paillasse ». Merci pour ton aide précieuse pour l'élaboration du projet ! Merci pour tes conseils scientifiques et humain, ta gentillesse, ta sympathie et ta bonne humeur ! Je n'oublierai jamais nos fous rires au sein du laboratoire et

même en culture cell. Tu été une grande bouffée d'oxygène et tu arrivais toujours à me faire adopter la positive attitude «Ronchonchon, comme je suis». N'oublie pas une Nounou est toujours disponible pour garder les deux amours Ines et Alexis.

Un grand Merci à notre jeune maitre de conf « Audrey Joannes » qui grâce à elle j'ai pu découvrir le milieu de la FPI. Merci Audrey pour ta sympathie, ta simplicité, ta disponibilité à tout moment, ton écoute et tes conseils scientifique et humain. Je n'oublierai jamais tes tonnes de MW que tu gère avec un temps record, j'étais et je serai toujours impressionné par ton énergie. Je ne sais comment te remercier pour l'aide professionnelle ! C'était un réel plaisir de partager et parfois même de squatter ta paillasse pour faute de place lol.

Un grand Merci au Docteur Valérie Lecureur, pour les conseils scientifiques, les encouragements, la franchise, la sympathie et la gentillesse tout au long de mon travail. Je me souviendrais toujours de ton énergie incroyable, ton enthousiasme et de ta bienveillance.

Je remercie le Docteur Marc Le Vée et Elodie Jouan, mes camarades de paillasse pour les discussions et les conseils scientifiques et techniques toujours dans la joie et la bonne humeur. Je n'oublierai pas les petites taquineries et les discussions sur le devenir professionnel des enfants « Artiste vs Docteur »

Un grand Merci au Docteurs : Arnaud Bruyère et ABD pour vos conseils, votre gentillesse, votre sympathie, votre positive attitude, votre bienveillance et surtout la bonne humeur contagieuse !

Je remercie également les Docteurs : Normand Podechard et Éric Le Ferrec, pour les pauses cafés ou déjeuners très instructives au tour des mots croisés et des mots fléchés et même au tour des hypothèses très sérieuses et confirmées, bien-sûr après de longue étude sur le niveau intellectuel humain !

Un grand Merci au Docteurs : Sophie Langouet et Domminique Lagadic Gaussman, pour leur écoute, leur sympathie, leur encouragement, leur soutien et leur conseil!

Un grand Merci au Professeur Vincent Lagente et au Docteur Corinne Martin-Chouly qui m'ont donné l'opportunité d'entamer un nouveau contrat d'enseignement et de recherche ! Merci pour votre compréhension, votre confiance et votre disponibilité!

Un grand Merci à Patricia André et à Brigitte Bardot (qui me fascine pour ces voyages humanitaires à travers le monde !), les fées administratives du Labo qui nous simplifient la vie et qui assure le bon déroulement des déplacements lors des congrès et des formations!

Merci au deux fofolles Marie Febvre-James et Noémie Tournadre. Merci pour l'ambiance que vous mettiez au sein du bureau. Alors on a tout entendu « le Despacito, une chanson très contagieuse et dont l'effet s'est vraiment propagé avec le temps » « We are the world, une chanson de réchauffement de la voie, car bien-sûr c'est des vrais Stars », du « ED sheeran et One Direction avec Niall et Harry Style, un effet chronique et sévère mais on est arrivé à sortir de cette période ». Merci pour les cafés après le boulot et même durant les week-end

car j'avoue que ce n'était pas facile de me convaincre de venir loool « 19 :30-20 :00 je rentre les filles ». Merci pour vos encouragements et surtout votre bonne humeur.

Merci à Marie Lelong ! notre Marissou qui va plus vite que son ombre lol ! Pleine d'énergie et toujours présente pour toute aide possible ! Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta positive attitude et tes encouragements ! Je t'apprécie tellement ! Je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille qui s'agrandit avec l'arrivée de la princesse ou du prince !

Merci à Alain Lescoat ! Monsieur « Sclérodémie systémique ». Merci pour ta gentillesse, ta sympathie et ta bonne humeur ! Bon courage pour la suite de ta thèse qui sera sûrement riche en datas !

Merci à Nelly Guéniche, notre doctorante frileuse, douce, très calme ou presque ! Merci pour ta gentillesse, ta sympathie, tes encouragements, et ta bonne humeur. Bon courage pour la suite, je te souhaite une très bonne réussite dans tes différents projets !

Merci à ma compatriote foffolle Ghania Kara-Ali ! Merci pour ta présence, ta joie de vivre, tes encouragements, ta bonne humeur ! Je n'oublierai jamais nos fous rires, nos « imports vs exports » durant un mois critique de l'année en plein sevrage de caféine mais qu'on a vite fait repris lol ! Sache que ton sourire est contagieux ! Garde le et avance le plus loin possible ! J'espère assister à ta soutenance « tu n'as pas intérêt à m'oublier lol »

Merci à ma deuxième compatriote et ma voisine Karima Alim, notre post doc, pleine d'énergie ! vite fait venu et vite fait intégré au sein de l'équipe, cela se comprend vu ta bonne humeur et tes rires contagieux ! Je pensais être la seule à avoir un rire portant mais j'ai trouvé une autre lol ! Merci pour ta gentillesse, tes encouragements ! Plein de réussite « que je n'en doute pas » pour la suite !

Merci Marie Cuvelier et Sophie Rose, les doctorantes de l'équipe 05, Reines des culture 3D et du Bio-printing d'hépatocytes, pour votre esprit très sympathique et stimulant que vous avez fait planer tout au long de ces années ! Merci pour les discussions bien-sûr très scientifiques durant les pauses déjeuners ! Merci Sophie d'avoir toujours partagé ta grille de mots fléchés même si on n'arrivait jamais à battre Marie Cu !

Merci Fred, d'être toujours présent pour nous à la paillasse, merci pour tes conseils, tes formations, ta gentillesse et ta sympathie. J'espère juste que tu te trompe plus sur mon prénom la prochaine fois lol.

Merci à tout les autres doctorants : Manon, Nettie, Hélène, Imran pour votre gentillesse et votre sympathie.

Cette thèse n'a pu se faire sans le soutien incontournable des personnes très chères !

À mon Zouzou, mon Babouch ! avec qui j'ai fait un bon long chemin plein d'embuches mais qui s'est concrétisé avec notre réussite ! Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours soutenue dans les moments de doute, des moments très difficiles où j'ai failli tout abandonné ! Ta présence été et sera toujours très importante ! Tes conseils été et resteront très précieux ! Merci pour ton soutien indéfectible ! Merci pour ta bonne humeur, ta joie de vivre et toute l'ambiance que tu mets ! Merci pour nos différentes promenades en Bretagne et même ailleurs qui ont été une sacrée bouffée d'oxygène ! Je suis prête pour de nouvelles aventures et sache que je n'aurai jamais assez de mots pour te remercier !

Ce travail n'a pu se faire sans le sacrifice de mes parents que j'aime tant ! Merci de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études en France ! Merci pour la réalisation du rêve professionnel, car faire de la recherche dans le pays n'était pas possible ! je n'oublierai jamais vos premières paroles « en pleurs ! » le jour de mon départ en France « Vas découvrir la vie réelle, Enrichie toi de savoir, de sciences et vas le plus loin possible dans tes études car c'est ce qui te reste, Soit forte combative et ne baisse jamais les bras, la concurrence est rude mais tu vas y arriver, On croit et on y croit toujours en toi ». Merci pour votre confiance papa et maman, je n'espère jamais vous décevoir ! Je vous aime.

Comment ne pas remercier mes deux sœurs Medjdati et Kamouch. hooo Medjda, le matelot qui a toujours été présent quelque soit les vagues ! Qui m'a toujours accompagné ! Sache que tu représentes un bel exemple pour tes sœurs, futur chercheur de la famille ! Tu été une deuxième maman pour moi et tu le fais tellement bien lol ! Tu nous as offert un beau cadeau cette année, la naissance du petit ange Aymène Ryan ! Un vrai sucre a consommer avec modération lol ! Excuse de t'avoir zappé une fois qu'il est né lol. Ma petite kamouch d'amour au caractère bien trompé, notre futur ingénieur en automatisme, la seul qui a préféré les math et la physique « comme son papa » à la biologie, il nous fallait bien une ! Je suis fière de toi petite sœur ! «tu resteras toujours à tes 16 ans » et sache que tu es une vrais bouffée d'oxygène ! Je vous aime toute les deux, hoops tous les Trois !

TABLE DES MATIERES

Résumé/Abstract	12
LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
LISTE DES FIGURES	21
LISTE DES TABLEAUX	24
Chapitre I:	26
Généralités sur la fibrose pulmonaire idiopathique	26
I- Classification.....	28
II- Généralités sur la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).....	29
1- Définition	29
2- Épidémiologie	29
3- Les facteurs de risques	29
3.1- Les facteurs génétiques	29
3.2- Les facteurs épigénétiques	31
3.3- Les facteurs environnementaux.....	31
4- Aspects cliniques de la FPI	32
4.1- Les signes cliniques.....	32
4.2- Le diagnostic de Pneumopathie Interstitielle Commune ou PIC	34
5- Physiopathologie de la FPI	35
5.1- Les cellules épithéliales alvéolaires (CEA).....	36
5.1.a- Stress du réticulum et activation de la réponse UPR	37
5.1.b- Mécanismes d'apoptose des CEA	38
5.1.c- Sécrétion des médiateurs pro-fibrotiques et sénescence.....	39
5.1.d- La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	41
5.2- Le fibroblaste et le myofibroblaste.....	43
5.2.a- Résistance des myofibroblastes à l'apoptose.....	45
5.2.b- La matrice extracellulaire (MEC).....	46

5.3- Les cellules immunitaires	49
5.3.a- Mise en jeu des cellules de l'immunité innée	49
1) Les cellules dendritiques (CD).....	50
2) Les fibrocytes	50
3) Les neutrophiles	51
4) Les cellules lymphoïdes innées (CLI).....	51
5.3.b- Mise en jeu des cellules de l'immunité adaptative	53
1) Les lymphocytes T (LT).....	53
2) Les lymphocytes B (LB)	54
Chapitre II: Le macrophage	57
I- Les macrophages pulmonaires	60
1- Le macrophage alvéolaire (MA).....	60
1.1- Ontogénie du macrophage alvéolaire	60
1.2- Fonctions générales du macrophage alvéolaire chez le sujet sain	61
2- Le macrophage interstitiel (MI)	61
II- Le monocyte.....	64
1- Les sous-populations monocytaires et leur implication dans la FPI.....	65
2- La différenciation du monocyte en macrophage: rôle du M-CSF	67
III- Polarisation des macrophages.....	72
1- Le macrophage pro-inflammatoire type M1	74
1.1- Les TLR (Toll Like Receptor).....	74
1.1.a- La signalisation commune des TLR	76
1) La voie dépendante de MyD88	76
2) La voie indépendante de MyD88 et dépendante de TRIF	77
1.2- La signalisation NF- κ B (Nuclear Factor- κ B).....	79
1.3- Rôle des cytokines et des chimiokines M1 dans le développement de la FPI ...	81
1.3.a- Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)	81

1.3.b- L'interleukine-1beta (IL-1 β)	83
1.3.c- L'interleukine-10 (IL-10)	85
1.3.d- La chimiokine CXCL13	88
2- Le macrophage pro-fibrotique de type M2a	90
2.1- Rôle des cytokines pro-fibrosantes	93
2.1.a- La chimiokine CCL18	93
2.1.b- La chimiokine CCL22	94
2.1.c- Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	95
Chapitre III: Place du Nintedanib dans la prise en charge thérapeutique de la FPI	98
I- La prise en charge non pharmacologique	100
1- La transplantation pulmonaire	100
2- La réhabilitation respiratoire	101
3- L'oxygénothérapie.....	102
II Les traitements médicamenteux à visée symptomatique	102
1- Toux et dyspnée	102
2- Reflux gastro-œsophagien	103
3- Exacerbations aiguës.....	103
III- Les médicaments antifibrosants.....	104
1- Pirfénidone	104
2- Nintedanib.....	105
2.1- Présentation et mécanismes d'action du Nintedanib.....	105
2.2- Étude préclinique démontrant les effets antifibrosants	108
2.3- Études cliniques chez les patients souffrant de FPI	109
2.4- La pharmacocinétique du NTD	110
2.5- La tolérance du NTD chez les patients souffrant de FPI.....	111
Objectifs de la thèse	114
Chapitre IV:	117

RESULTATS.....	117
Article 1:	119
I- Contexte et justification de l'étude.....	119
II- Résumé des principaux résultats	120
1- Le NTD inhibe la phosphorylation de CSF-1R et l'activation des voies de signalisation induites par le CSF-1.....	120
2- Le NTD réduit l'adhérence des macrophages M0 et la sécrétion de CCL2	120
3- Le NTD diminue partiellement l'expression des marqueurs phénotypiques M2a mais ne modifie pas celle des marqueurs M1	121
4- Le NTD diminue l'expression de différentes cytokines par le macrophage M1	121
III- Conclusions	121
Article 2:	125
I- Contexte et justification de l'étude.....	125
II- Résumé des principaux résultats	126
1- CXCL13 est exprimée dans les MA (CD68 ⁺ /CD206 ⁺) de patients souffrant de FPI	126
2- Le LPS induit l'expression de CXCL13 dans le MDM, via l'activation de la voie NF-κB canonique et non-canonique.....	126
3- Le TNF-α et l'IL-10 contrôlent l'expression du gène CXCL13 en activant respectivement les voies NF-κB et JAK-STAT dans les MDM stimulés par le LPS ..	127
4- Le TNF-α et l'IL-10 contrôlent l'expression de CXCL13 dans le MA humain	128
5- Les concentrations sériques de CXCL13, chez les patients atteints de FPI, sont corrélées positivement avec celles du TNF-α et de l'IL-10	128
III Conclusions.....	129
Discussion et perspectives	132
Conclusion générale	144
Annexes:	147
Références bibliographiques.....	150

Résumé/Abstract

Résumé : Le nintedanib (NTD), un médicament antifibrosant, ralentit le déclin de la fonction respiratoire chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Le NTD exerce ses effets antifibrosants en inhibant l'activité cellulaire de différentes protéines à tyrosine kinase. Le NTD inhibe également l'activité kinase de la protéine humaine recombinante CSF-1R. Ce récepteur, exprimé par les cellules myéloïdes, contrôle différentes fonctions du macrophage. Cellule immunitaire résidente ou différenciée à partir du monocyte, le macrophage contribue au développement de la fibrose pulmonaire en sécrétant des molécules pro-inflammatoires et pro-fibrosantes. Un premier objectif de mes travaux de thèse a été de déterminer si, en bloquant l'activité de CSF1-R, le NTD altère les propriétés *in vitro* du macrophage humain différencié à partir du monocyte circulant (MDM) par le CSF-1. Nos résultats démontrent que le NTD inhibe la phosphorylation et l'activité de CSF-1R dans le MDM, à de faibles concentrations équivalentes à celles bloquant l'activité de la protéine recombinante. En réduisant l'activité de CSF-1R, le NTD diminue l'adhérence du macrophage et l'expression de la chimiokine pro-fibrosante CCL2. De plus, en bloquant l'activité de CSF-1R et celles d'autres cibles moléculaires, le NTD altère la polarisation des MDM en macrophages M1 et M2. Il réduit la production de diverses interleukines et chimiokines par le macrophage M1 et prévient l'expression de marqueurs membranaires par le macrophage M2. Nos résultats démontrent en particulier que le NTD réduit l'expression de CXCL13, un biomarqueur pronostique de la FPI. Cette chimiokine est exprimée dans le tissu pulmonaire mais son origine cellulaire reste incertaine. Le second objectif de mes travaux de thèse a donc été de caractériser l'expression de CXCL13 dans le macrophage pulmonaire. Nos résultats démontrent que CXCL13 est exprimé par les macrophages alvéolaires de patients atteints de FPI. *In vitro*, l'expression de CXCL13 dans le macrophage alvéolaire et dans le MDM activé est induite par le TNF- α et l'IL-10, via l'activation respective des voies de signalisation NF- κ B et JAK/STAT. Nous montrons que les concentrations sériques de CXCL13, de TNF- α et d'IL-10 sont significativement corrélées entre elles chez les patients atteints de FPI. Ces résultats suggèrent donc que le TNF- α et l'IL-10 peuvent contrôler l'expression de CXCL13 chez ces patients.

Abstract: Nintedanib (NTD) is an antifibrotic drug that decreases the decline of the respiratory function of patients suffering from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). NTD exerts antifibrotic effects by inhibiting cellular activity of various tyrosine kinase proteins. It also prevents the activity of the human recombinant CSF-1R protein that is expressed by myeloid cells, especially macrophages. Resident cells or differentiated from circulating monocytes, the macrophages contribute to IPF by secreting several proinflammatory and profibrotic cytokines. In this context, the first objective of my thesis was to determine, if by inhibiting CSF-1R activity, NTD could alter the functions of human macrophages differentiated from blood monocytes (MoDM) by CSF-1 (also called M-CSF). Our results demonstrate that NTD blocks the phosphorylation and the activity of CSF-1R in CSF-1-activated MoDM at very low concentrations that are similar to those inhibiting the human recombinant protein. By preventing CSF-1R activity, NTD reduces cell adhesion and expression of the profibrotic chemokine CCL2. Moreover, by blocking the activity of CSF1R

and that of other molecular targets, NTD modulates the polarization of CSF-1-activated MoDM. It reduces the production of various interleukins and chemokines by M1 MoDM and prevents the membrane expression of M2 markers. Our results notably demonstrate that NTD significantly inhibits the expression of CXCL13, a prognostic biomarker of IPF. This chemokine is expressed in pulmonary tissues but its cellular origin is unclear. The second objective of my thesis was thus to characterize CXCL13 expression in pulmonary macrophages. Our results demonstrate that CXCL13 is expressed by alveolar macrophages in patients with IPF. *In vitro*, CXCL13 expression in activated alveolar macrophages and MoDM is controlled by TNF- α and IL-10 through the activation of the NF- κ B and JAK/STAT pathways, respectively. Moreover, we demonstrate that seric concentrations of TNF- α , IL-10 and CXCL13 are correlated in patients with IPF. These results thus suggest that TNF- α and IL-10 could mediate CXCL13 expression in those patients.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide DésoxyriboNucléique.

ALAT: Latin American Thoracic Society.

AMAC-1: Alternative Macrophage Activation-associated CC-chemokine-1, CCL18.

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché.

AP-1: Activated protein-1.

Arg1: Arginase-1.

ARN: Acide RiboNucléique.

ASC: Adaptator protein apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD.

ATF6: Activating Transcription Factor 6.

ATP: Adénosine TriPhosphate.

ATS: American Thoracic Society.

BALT: Bronchus-associated lymphoid tissue.

BCA-1: B Cell Attracting Chemokine-1.

BCR: B-Cell antigen Receptor.

BLC: B-Lymphocyte Chemoattractant, CXCL13.

BLR1: Burkitt Lymphoma Receptor 1.

BLys: B-Lymphocyte stimulating factor, BAFF.

BPCO: Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive.

BtK: Bruton's tyrosine Kinase.

CBP: CREB Binding Protein.

CCL2: Chemokine Ligand 2, MCP-1.

CCR: récepteur aux chimiokines de type CC.

CCR2: récepteur au CCL2.

CD: Cellules Dendritiques.

CDKN: Cyclin-Dependent Kinase inhibitor.

CEA: Cellule Epithéliale Alvéolaire.

CEAI: Cellule Epithéliale Alvéolaire de type I.

CEAII: Cellule Epithéliale Alvéolaire de type II.

CI50: Concentration Inhibitrice médiane.

cIAP-1 et cIAP-2: Inhibitor of cellular Apoptosis Protein.

CLI: Cellules Lymphoïdes Innées.

CMHII: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II.

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigène.

CREB: cAMP response element binding protein.

CSF-1: Colony Stimulating Factor-1.

CSF-1R: Colony Stimulating Factor-1 Receptor.

CSIF: Cytokine Synthesis Inhibitory Factor.

CTGF: Connective Tissue Growth Factor.

CVF: Capacité Vitale Forcée.

CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12, SDF-1.

CXCR4: CX-Chemokine Receptor 4.

CX3CR1: CX3C-chemokine receptor 1.

CYP450: Cytochromes P450.

DAMP: Danger Associated Molecular Pattern.

DC-CK1: Dendritic Cell-Chemokine 1, CCL18.

DC-LAMP: Dendritic cell lysosomal associated membrane glycoprotein.

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (ouCD209).

DLco: capacité de transfert du monoxyde de carbone au travers de la barrière alvéolo-capillaire.

DMD: Discussion MultiDisciplinaire.

EBV: Epstein-Barr Virus.

ED-A: Fibronectine Type III Extra Domain.

EFR: Explorations Fonctionnelles Respiratoires.

EGR-1: Early Growth Response 1.

ELC: Epstein-Barr virus-induced molecule 1 Liguand CC Chemokine, CCL19.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ELMOD2: ELMO Domain containing 2.

ERK: Extracellular signal Regulated Kinase.

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène

ERS: European Respiratory Society.

FAK: Focal Adhesion Kinase.

FAS-L: Fas Liguand.

FcγR: Récepteur au Fragment constant (Fc) gamma.

FGF: Fibroblasts Growth Factor.

FGFR-R: Fibroblasts Growth Factor-Receptor.

FLIP: FLICE-Inhibitory Protein.

Flt-3: Fms-like tyrosine-protein kinase-3.

FOXP: Forkhead bOX P3.

FPI: Fibrose Pulmonaire Idiopathique.

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor.

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Stimulating Factor.

GM-CSFR: Granulocyte Macrophage Stimulating Factor Receptor.

GM-CFU: Granulocyte and Macrophage Colonizing Forming Unit.

GRHL2: Grainyhead-like 2.

HcK: Hematopoietic cell Kinase.

HIF-2α: Hypoxia Inducible Factors-2α.

HRCT: tomodensitométrie thoracique haute résolution.

HSC: cellule souche hématopoïétique.

HSP: Heat Shock Protein.

ICAM1: Intracellular Adhesion Molecule 1.

IFNAR: Interferon Receptor.

IFN-α: Interferon α.

IFN-β: Interferon β.

IFN-γ: Interferon γ.

IKK: Inhibitor of κB Kinase.

IL: Interleukine.

iNOS: inducible NO Synthase.

IRAK: IL1 Receptor Associated Kinase.

IRE1α: Inositol Requiring Enzyme 1α.

IRF-3: IFN Regulatory Factor 3

IRF-9: IFN Regulatory Factor 9

ISGF3: IFN Stimulated Gene Factor 3.

ITGAL: integrin alpha 1.

JAK1: Janus Kinase 1.

JMD: domaine juxta-membranaire.

JRS: Japanese Respiratory Society.

KLF4: Kruppel Like Factor 4.

LAP: Latency Associated Peptide.

LB: Lymphocytes B.

LBA: lavages Broncho-Alvéolaires.

LBP: LPS Binding Protein.

Lck: lymphocyte-specific tyrosine protein kinase.

LPS: LipoPolySaccharide.

LRR: Leucin Rich Repeat.

LT: Lymphocytes T.

LTβR: Lymphotoxin β Receptor.

LTh: LT helper.

LTreg: LT régulateurs.

Lyn: tyrosine-protein kinase lyn.

Lyve-1: Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1.

MA: Macrophage Alvéolaire.

Mal: MyD88 adapter like.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor.

M-CFU: Macrophage Cloning Forming Unit.

MD-2: Myeloid Differentiation factor 2.

MDC: Macrophage-Derived Chemokine, CCL22.

MDM: macrophage humain dérivé de monocyte.

MEC: Matrice ExtraCellulaire.

MerkTK: Mer proto-oncogène Tyrosine Kinase.

MI: Macrophage Interstitiel.

MIP-4: Macrophage Inflammatory Protein-4, CCL18.

ML-CFU: Myeloid and Lymphoid Cloning Forming Unit.

mmLDL: minimal modified Low Density Lipoprotein.

MMP: métalloprotéinases.

MR: Mannose Receptor (ou MRC1 ou CD206).

MUC5B: Mucine 5B

MyD88: Myeloid Differentiation factor 88.

NCoR: Nuclear Receptor Corepressor.

NE: Neutrophil Elastase.

NEMO: NF-κB Essential Modulator.

NF-κB: Nuclear Factor κB.

NIK: NF-κB Inducing Kinase.

NK: Natural Killers.

NLR: NOD Like Receptor.

NO: monoxyde d'azote.

NOD: NLR, nucleotide oligomerization domain receptors.

NPM: nucleophosmine.

NSCLC: Non Small Lung Cancer.

NTD: Nintedanib.

OLS: Organisations Lymphoïdes Secondaires.

OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network.

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns.

PARC: Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine (ou CCL18).

PDGF: Platelet Derived Growth Factor.

PDGF-R: Platelet Derived Growth Factor Receptor.

PERK: PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase.

P-gp: P-glycoprotéine.

PIC: Pneumopathie Interstitielle Commune.

PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses.

PI3K: PhosphoInositide 3-Kinase.

PPARγ: Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma.

PRR: Pattern Recognition Receptor.

PTPφ: Protein Tyrosine Phosphatase phi.

Pyk-2: Paxillin-associated tyrosine kinase.

RE: Réticulum Endoplasmique.

RIP-1: Receptor Interacting Protein-1.

RLC: Receptor Lectine type C.

RT-qPCR: RetroTranscription-quantitative Polymerase Chain Reaction.

SASP: Senescence Associated Secretory Phenotype.

SBE: STAT Binding Element.

SDF-1: Stromal cell-Derived Factor-1, CXCL12.

Sema 7a⁺: Semamorphin 7A⁺.

SFTPC: Surfactant Protein C

SFTPA: Surfactant Protein A.

SFK: famille des kinases Src.

SGRQ: St George's Respiratory Questionnaire.

SHP2: Src Homology 2domain-containing Phosphatase 2.

Siglec F: Sialic acide-binding lectin.

SIRP α : Signal Regulatory Protein alpha.

SLC: Secondary Lymphoid tissu Chemokine, CCL21.

SLT: Structures Lymphoïdes Tertiaires.

SOCS3: Supressor Of Cytokine Signaling-3.

SODD: Silencer of Death Domain.

SP-A: Surfactant Protein A.

SP-D: Surfactant Protein D.

Sp1: Specificity protein1.

SR-A: Scavenger Receptor A.

SR- B: Scavenger Receptor B.

Src: proto-oncogene tyrosine-protein kinase src.

STAT: Signal Tansducer and Activator of Transcription.

STCP-1: Stimulated T cell Chemotactic Protein-1, CCL22.

TAB1: TAK1 Binding Protein.

TACE: TNF- α Conserving Enzyme, ADAM17.

TAK1: TGF β Activated Kinase 1.

TBK1: TANK Binding Kinase 1.

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse.

TERC: Telomerase RNA Component.

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase.

TGF- β : Transforming Growth Factor-beta.

TGF- β -R: Transforming Growth Factor-beta Receptor.

Thf: lymphocytes Th folliculaire.

Thy1: Thy-1 membrane glycoprotein

TICAM-1: TIR domain Adapter Molecule-1.

TICAM-2: TIR Containing Adapter Molecule-2.

TIMP: Tissue Inhibitor of Metallopeptidase.

TIR: Toll/Interleukin-1 Receptor like.

TIRAP: TIR domain containning Adapter Protein.

TIRP: TIR containing Protein.

TLR: Toll- Like Receptor.

TNF: Tumor Necrosis Factor.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha.

TNF-R: Tumor Necrosis Factor-Receptor.

TOLLIP: TOLL Interacting Protein.

TOMORROW: To imprOve pulMOnaRy fibROsis With BIBF1120.

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain.

TRAF: TNF Receptor Associated Factor.

TRAF 2: TNFR Associated Factor 2.

TRAM: TRIF related Adapter Molecule.

TRIF: TIR domain containing adapter protein interferon- β .

Tyk2: Tyrosine Kinase 2.

UGT: UDP-GlucuronosylTransferase.

UIP: Usual Interstitial Pneumonia.

UPR: Unfolded Protein Response.

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VEGF-R: Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor.

XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein.

ZEB1: Zinc finger E-box binding homeobox1.

α -SMA: alpha-Smooth Muscle Actin.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification des pneumopathies interstitielles diffuses (PID).

Figure 2: Facteurs de risques de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).

Figure 3: Evolution clinique de la FPI.

Figure 4: Algorithme diagnostique de la fibrose pulmonaire idiopathique.

Figure 5: (A,B) Pneumopathie interstitielle commune (PIC) en tomодensitométrie thoracique haute résolution comportant des opacités réticulaires de prédominance basale et sous-pleurale avec un aspect en rayon de miel (C) l'aspect histologique de la PIC en biopsie pulmonaire avec présence de foyers fibroblastiques (flèches) associés au rayon de miel (D).

Figure 6: Changement du paradigme sur la physiopathologie de la FPI.

Figure 7: Représentation schématique de l'alvéole pulmonaire.

Figure 8: Voies de signalisation pro-apoptotiques induites dans les CEA.

Figure 9: Les différents facteurs moléculaire influençant le phénotype pro-fibrotique des CEAI.

Figure 10: Le rôle de la TEM dans le mécanisme physiopathologique de la fibrose pulmonaire.

Figure 11: l'activation et la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste.

Figure 12: Les médiateurs et les voies de signalisation anti-apoptotiques activés dans le fibroblaste et le myofibroblaste des patients atteints de FPI.

Figure 13. Modèle expliquant la libération du TGF- β induite par la contraction du myofibroblastes dans le contexte de fibrose pulmonaire.

Figure 14: Le rétrocontrôle positif entre le TGF- β 1 et la MEC.

Figure 15: Le rôle du système immunitaire inné dans la de la FPI.

Figure 16: Le rôle du système immunitaire adaptatif dans la physiopathologie de la FPI.

Figure 17: Localisation tissulaire du macrophage pulmonaire en homéostasie.

Figure 18: Ontogénie du macrophage pulmonaire.

Figure 19: Développement du macrophage alvéolaire au cours de la vie.

Figure 20: Origine, développement et recrutement du monocyte.

Figure 21: Sélection des trois sous-populations de monocytes humains selon leur expression relative en CD14 et CD16.

Figure 22: Régulation du développement du macrophage par le M-CSF.

Figure 23: Structure du CSF-1R.

Figure 24: La signalisation CSF-1/CSF1R durant la différenciation macrophagique.

Figure 25: La fonction du complexe CSF-1/CSF-1R.

Figure 26: Inducteurs et propriétés fonctionnelle des différentes populations du macrophage polarisé.

Figure 27: Localisation et ligand des TLR.

Figure 28: Interaction du LPS via LBP et le complexe CD14/MD-2/TLR4.

Figure 29: La voie dépendante de MyD88 induite par le TLR.

Figure 30: La voie dépendante de TRIF induite par le TLR.

Figure 31: La voie de la signalisation NF- κ B via la voie canonique et alternative.

Figure 32: Voies de signalisation contrôlant la polarisation du macrophage M1.

Figure 33: Modèle de la signalisation induite par le complexe I-TNF-R.

Figure 34: Structure de l'inflammasome NLRP3.

Figure 35: Activation de l'inflammasome et sécrétion de l'IL1 β .

Figure 36: Activation du récepteur à l'IL-10.

Figure 37: Récepteurs et voies de signalisation activées par IL-4 et/ou IL-13.

Figure 38: Caractéristiques et voie de signalisation impliquées dans le macrophage M2a.

Figure 39: Les ligands PDGF et leur interaction avec le récepteur PDGF-R.

Figure 40: Structure chimique de la pirféridone.

Figure 41: Structure chimique de l'éthanosulfonate du BIBF1120.

Figure 42: Mécanisme d'action du Nintedanib.

Figure 43: Métabolisme et excrétion du Nintedanib.

Figure 44: Résumé graphique de l'effet du NTD sur le MDM.

Figure 45: les voies de signalisation contrôlant l'expression de CXCL13 dans le MDM activé.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Résumé des caractéristiques clefs du macrophage alvéolaire et le macrophage interstitiel.

Tableau 2: Résumé des caractéristiques des sous-populations monocytaires.

Tableau 3: Comparaison des recommandations de 2011 et de 2015 pour la prise en charge de la FPI.

Tableau 4: Doses inhibitrices de NTD inhibant 50 % de l'activité (CI50) de différentes protéines kinases recombinantes humaines.

Chapitre I:
Généralités sur la fibrose pulmonaire
idiopathique

I- Classification

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) sont des maladies respiratoires chroniques qui atteignent principalement le tissu conjonctif de soutien appelé interstitium pulmonaire. Les PID se caractérisent par une inflammation et/ou une fibrose pulmonaire qui est le stade final de ces pathologies conduisant à une perte progressive des fonctions respiratoires. Les PID regroupent un spectre large et très hétérogène de maladies divisées en quatre groupes principaux (voir figure 1): les PID induites par les médicaments ou associées à une connectivité, les PID granulomateuses telle que la sarcoïdose, les PID rares telles que la protéinose alvéolaire pulmonaire et les PID de cause inconnue, encore appelées idiopathiques (Hostettler, 2017). Ces dernières pathologies surviennent en l'absence de toute cause connue et de contexte médical spécifique. La forme la plus fréquente et sévère des PID idiopathiques est la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) (Raghu et al., 2011). Ce premier chapitre regroupe un ensemble des connaissances allant de l'épidémiologie à la physiopathologie de la FPI.

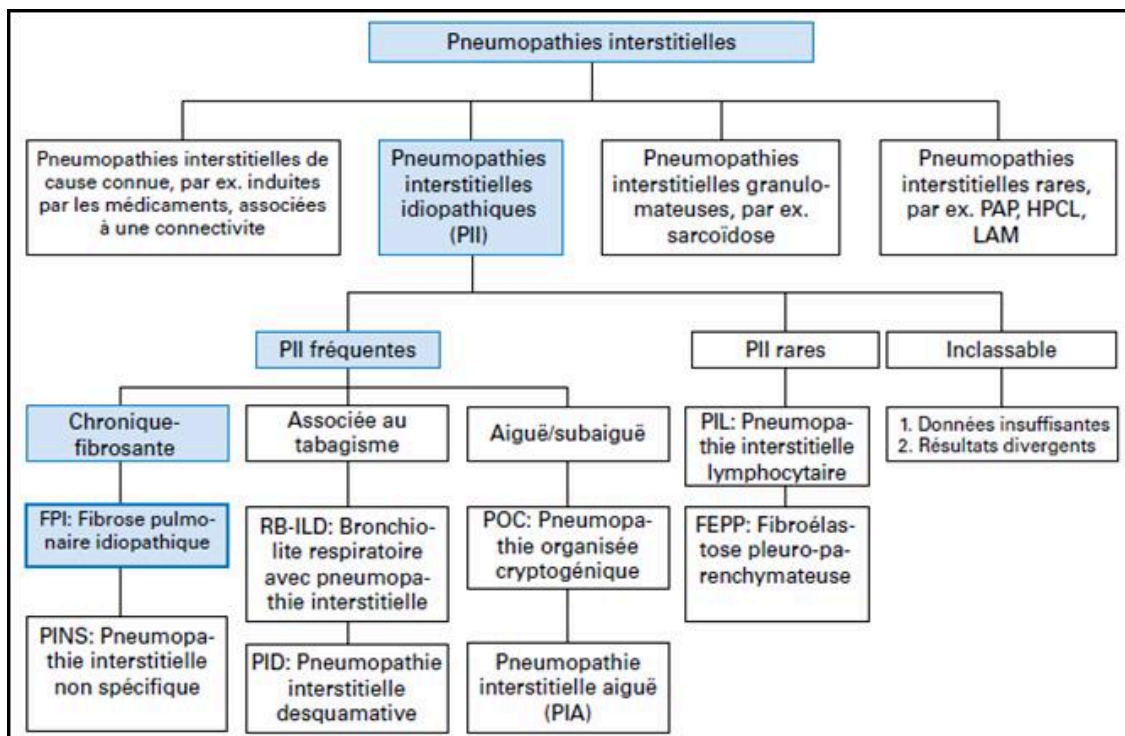


Figure 1: Classification des pneumopathies interstitielles diffuses (PID). PAP: protéinose alvéolaire pulmonaire; HPCL: histiocytose pulmonaire à cellules de Langerhans; LAM: lymphangioléiomyomatose (Hostettler, 2017).

II- Généralités sur la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

1- Définition

La FPI est une maladie rare, chronique, irréversible et de cause inconnue. Elle se manifeste chez les personnes âgées de 55-75 ans (l'âge médian au diagnostic est de 66 ans) avec une prédominance masculine (King et al., 2011a). La médiane de survie n'est que de 2,5 à 3,5 ans lorsque le diagnostic est posé (King et al., 2011a). Ce pronostic sombre est l'un des plus mauvais parmi les PID (Raghu et al., 2018a). La FPI se caractérise par une fibrose pulmonaire progressive qui évolue graduellement et uniquement dans le poumon (Raghu et al., 2018a). Elle est associée à une perte progressive des fonctions respiratoires et à la détérioration rapide de la qualité de vie du patient. La FPI s'inscrit dans une forme sporadique ou une forme familiale qui se définit par la présence d'au moins deux cas de fibrose dans la même famille (Borie et al., 2015). Entre 2 et 20 % des FPI seraient des formes familiales, associées à une maladie génétique (Borie et al., 2015).

2- Épidémiologie

Différentes études épidémiologiques suggèrent que la FPI présente une incidence de 2 à 30 nouveaux cas pour 100.000 personnes par an et une prévalence de 10 à 60 cas pour 100.000 personnes (Martinez et al., 2017). La FPI affecterait 3 millions de personnes dans le monde, avec 130.000 cas aux États-Unis, 300.000 cas en Europe et 640.000 personnes souffrant de cette maladie en Asie orientale (Martinez et al., 2017). En France, l'incidence serait de 6,8 à 9/100.000 par an, soit plus de 4000 nouveaux cas chaque année (Cottin et al., 2017). Il est à noter que l'incidence et la prévalence de cette pathologie augmentent avec l'âge du patient (Raghu et al., 2018a). La prévalence chez les patients de plus de 65 ans serait de supérieure à 400 cas pour 100.000 personnes (Raghu et al., 2014). En dehors de l'âge et du sexe, des facteurs de risques génétiques, épigénétiques et environnementaux sont susceptibles de favoriser le développement de la FPI.

3- Les facteurs de risques

3.1- Les facteurs génétiques

Selon *Raghu et coll.* (2018), 30% des sujets atteints d'une FPI familiale ou sporadique présentent une prédisposition génétique qui constituerait donc un facteur de risque important d'apparition de la maladie. Des mutations de nombreux gènes ont été identifiées chez les

malades atteints de FPI, mais aucune n'est systématiquement associée aux formes sporadiques de la FPI

Des mutations touchent des gènes liés au maintien de la taille du télomère (notamment TERT, TERC), aux fonctions de la cellule épithéliale pulmonaire (MUC5B, SFTPC, SFTPA), ainsi qu'à l'immunité innée (TLR3, TOLLIP, ELMOD2) (Kropski et al., 2015). Les mutations des gènes TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) et TERC (Telomerase RNA Component) sont associées à la FPI. Ces dernières ont été mises en évidence respectivement dans 15% des formes familiales et 2 à 3% des formes sporadiques de FPI (Borie et al., 2015). Ces mutations entraînent un raccourcissement des télomères et par conséquent des chromosomes lors de la mitose. Le raccourcissement des télomères favorisent l'activation des voies de dommages à l'ADN et l'expression de la protéine p53. Il augmente également la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui contribuent au développement de la fibrose pulmonaire (Gulati and Thannickal, 2019). D'autre part, il existe des mutations de gènes codant pour le surfactant SFTPC (Surfactant Protein C) et SFTPA (Surfactant Protein A). Ces mutations engendrent un défaut de repliement de la protéine dans la cellule épithéliale alvéolaire de type II, à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique et/ou d'une altération du trafic intracellulaire de la protéine (Borie et al., 2015). Cela favorise une perturbation de l'homéostasie pulmonaire et de la fonction respiratoire (Kropski et al., 2013). En 2011, *Seibold et coll* ont mis en évidence un polymorphisme dans le promoteur de gène codant pour la mucine 5B (MUC5B) chez les patients atteints de PID familiale et de FPI sporadique (Seibold et al., 2011). La mucine 5B est une glycoprotéine sécrétée par les cellules épithéliales bronchiques, dont l'expression est diminuée chez les malades présentant un polymorphisme de MUC5B. Cette protéine est essentielle pour la clairance mucociliaire et la défense immunitaire innée (Fletcher and Evans, 2014). La diminution de l'expression de la mucine 5B est associée au développement de maladies respiratoires chroniques (Seibold et al., 2011; Zhang et al., 2011), mais paradoxalement la présence du polymorphisme semble augmenter la survie des patients atteints de FPI (Peljto et al., 2013). Enfin, d'autres études ont rapporté une association entre le développement de la FPI et les polymorphismes i) du gène TOLLIP (Toll Interacting Protein) qui code une protéine inhibant la voie TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) et régulant l'immunité innée en interagissant avec les Toll- Like Receptor (TLR) (Noth et al., 2013), ii) du gène ELMOD2 (ELMO Domain containing 2) qui contrôle l'expression d'une protéine jouant un rôle important contre les

infections virales (Pulkkinen et al., 2009), et iii) du gène TLR3 qui joue également un rôle majeur dans l'immunité innée (O'Dwyer et al., 2013).

3.2- Les facteurs épigénétiques

Différentes régulations épigénétiques pourraient être impliquées dans le développement de la FPI, notamment la modification du niveau de méthylation d'un certain nombre de gènes (Rabinovich et al., 2012). En effet, en 2014 une étude a identifié 2130 régions du génome dont le niveau de méthylation différait entre des patients atteints de FPI et des sujets contrôles (Yang and Schwartz, 2015). Parmi les gènes dont la méthylation est modifiée, on retrouve notamment ceux impliqués dans le développement embryonnaire du poumon contrôlé par la voie WNT- β caténine (Yang et al., 2014). D'autres études ont identifié des modifications de l'expression de divers microARN. Par exemple, l'expression du microARN Let 7 est réprimée dans les cellules épithéliales alvéolaires issues des patients atteints de FPI. Ceci contribue à la transition épithélio-mésenchymateuse (Pandit et al., 2010). Enfin, des études ont démontré des modifications de l'acétylation et/ou de la méthylation de certaines histones dans les fibroblastes pulmonaires, réduisant par exemple l'expression de la protéine anti-fibrosante Thy1 (Thy-1 membrane glycoprotein) (Sanders et al., 2011).

3.3- Les facteurs environnementaux

Plusieurs études épidémiologiques ont associé le développement de la FPI à différentes expositions environnementales (voir figure 2). Notamment, l'exposition au tabac ou aux poussières générées lors d'une activité professionnelle (agriculture, tailleurs de pierre, métallurgie) favorise la survenue et/ou la progression de la FPI (Taskar and Coultas, 2006).

Le tabagisme représente en effet un facteur de risque environnemental majeur de la FPI, et probablement le plus fréquent. Les patients fumeurs atteints de FPI ont une médiane de survie plus faible que celle des patients non-fumeurs (Baumgartner et al., 1997). L'exposition domestique ou professionnelle à différents types de poussières influence le pronostic vital des patients atteints de FPI. En effet, plusieurs études ont montré la corrélation entre la FPI et l'exposition aux poussières (Taskar and Coultas, 2008, 2006). Une étude menée sur 1311 patients atteints de FPI montre que les travailleurs exposés à des poussières organiques ou inorganiques manifestent des signes cliniques plus précoces et une mortalité plus importante que des travailleurs non exposés (Lee et al., 2015). Les agents microbiens jouent également un rôle potentiel dans la physiopathologie de la FPI (Chioma and Drake, 2017). Des études ont montré l'augmentation de la charge bactérienne dans les liquides de lavages broncho-

alvéolaires (LBA) de patients atteints de FPI (Han et al., 2014a; Molyneaux et al., 2014). On détecte notamment une présence anormale de bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) et à Gram négatif (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella*) (Han et al., 2014a; Molyneaux et al., 2014). Une altération du microbiote pulmonaire est associée aux déclin de la fonction pulmonaire et à la survie des patients (Han et al., 2014b; Molyneaux et al., 2014). *Huang et coll.* (2017) ont montré une association entre la répression de l'expression des récepteurs NOD (NLR, nucleotide oligomerization domain receptors) par les cellules du sang périphérique, l'augmentation de la charge bactérienne au niveau des LBA et la plus faible survie des patients atteints de FPI (Huang et al., 2017b). L'augmentation de la charge bactérienne au niveau pulmonaire pourrait résulter de l'augmentation de micro-inhalations de liquide gastrique chez les malades souffrant de reflux gastro-œsophagien ou d'une réduction de la clairance bactérienne mucociliaire (Lee et al., 2010; Raghu and Meyer, 2012). Les agents viraux tels que l'EBV (Epstein-Barr Virus), le cytomégalovirus, le virus de l'hépatite C et les virus de l'Herpes sont souvent détectés au niveau de l'épithélium alvéolaire des patients atteints de FPI (Molyneaux et al., 2014), cependant leur contribution réelle à la maladie reste à préciser (Sgalla et al., 2018).

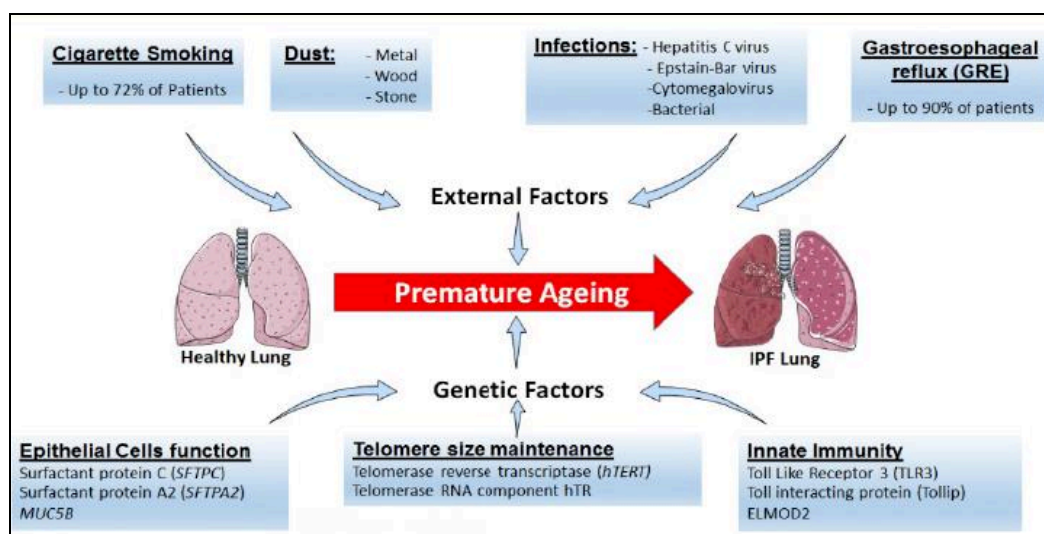


Figure 2: Facteurs de risques de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).

4- Aspects cliniques de la FPI

4.1- Les signes cliniques

La FPI présente une phase asymptomatique pouvant durer plusieurs années puis une phase symptomatique peu spécifique ne permettant souvent de poser le diagnostic qu'à un stade déjà

avancé de la maladie. Les patients diagnostiqués présentent des signes fonctionnels tels qu'une toux sèche non productive, une dyspnée d'effort d'apparition progressive et des râles secs diffus crépitants reproduisant le bruit du « velcro ». Dans près de la moitié des cas, on observe un symptôme extra-pulmonaire d'hippocratisme digital (Cottin et al., 2017).

La progression de la FPI, qu'elle soit lente ou rapide, se manifeste par l'aggravation des symptômes, un déclin irréversible de la fonction respiratoire et par la dégradation de la qualité de vie du patient. L'exploration fonctionnelle respiratoire montre une diminution de la capacité vitale forcée (CVF) et de la capacité de transfert du monoxyde de carbone au travers de la barrière alvéolo-capillaire (DLco) (Cottin et al., 2013, 2017). Cette altération des échanges gazeux conduit le plus souvent à un stade irréversible d'insuffisance respiratoire, entraînant à terme le décès du patient (Ley et al., 2011). Bien que généralement considéré comme une maladie à évolution lente, la fonction respiratoire et l'état clinique du malade peuvent se dégrader brutalement lors d'exacerbations aiguës (voir figure 3). La progression de la FPI serait associée à des exacerbations aiguës dans 5 à 20% des cas (King et al., 2011a). Ces épisodes d'aggravation de la maladie peuvent être idiopathiques ou bien être secondaires à des infections, des inhalations, des gestes chirurgicaux/interventionnels ou des médicaments (Collard et al., 2016). En dehors de toute autre cause, les exacerbations aiguës sont fortement liées à la mortalité des patients avec une médiane de survie de seulement 3 à 4 mois (Collard et al., 2016). L'ensemble de ces signes cliniques restent peu spécifiques et peuvent être présents chez des malades souffrant d'autres fibroses pulmonaires et même d'autres maladies. Le diagnostic de la FPI est donc le plus souvent complexe.

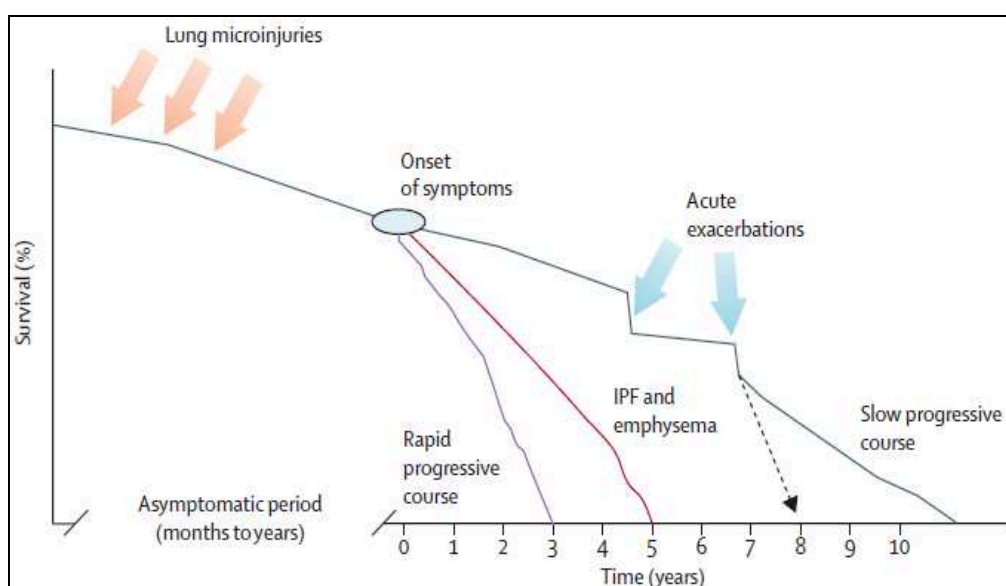


Figure 3: Evolution clinique de la FPI (King et al., 2011a).

4.2- Le diagnostic de Pneumopathie Interstitielle Commune ou PIC

Le diagnostic fait appel à une approche pluridisciplinaire. Il associe la clinique, les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR), l'imagerie tomodensitométrique thoracique et parfois l'aspect histo-pathologique pulmonaire. Ainsi, en absence de toute cause identifiable de PID (i.e. médicament, exposition ou maladie systémique), la présence d'une PIC (ou UIP terme anglosaxon pour Usual Interstitial Pneumonia) en imagerie et/ou en histologie est obligatoire pour poser le diagnostic (Raghu et al., 2018a) (voir figure 4).

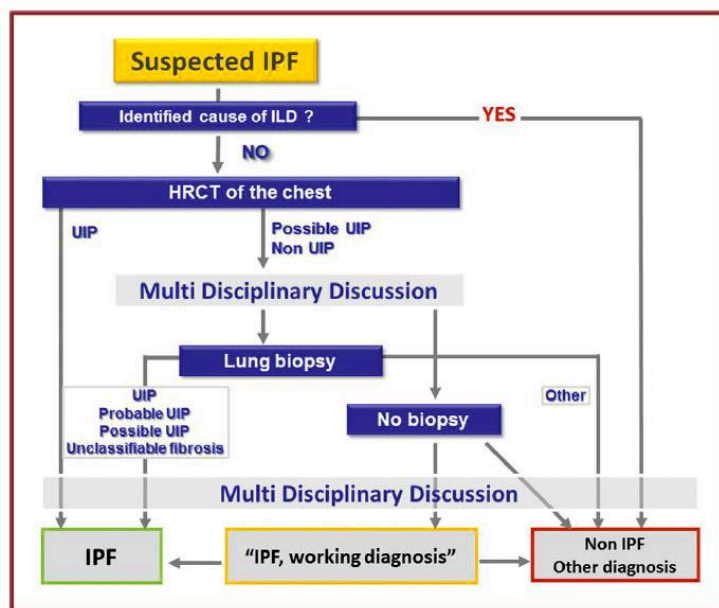


Figure 4: Algorithme diagnostique de la fibrose pulmonaire idiopathique. UIP: usual interstitial pneumonia; ILD: interstitial lung disease; CT: computed tomography (Cottin et al., 2017).

Le résultat de la tomodensitométrie thoracique haute résolution (HRCT) ou scanner est fondamentale et permet d'identifier la PIC, parfois avec certitude (PIC certaine) (Cottin et al., 2013). En effet, en cas de PIC certaine, le scanner thoracique montre des opacités réticulaires sous pleurales à prédominance basale, des lésions présentant un aspect en « rayon de miel » avec ou sans bronchectasie par traction (Raghu et al., 2018a). Dans ce cas, si on considère que cette PIC certaine est idiopathique, on peut retenir le diagnostic de FPI sans recourir à d'autres examens complémentaires (i.e. LBA ou biopsie pulmonaire). Dans le cas où le scanner ne permet pas de conclure à une PIC certaine, le diagnostic dépend alors des images histologiques obtenues sur une biopsie pulmonaire chirurgicale (Raghu et al., 2018a). Le diagnostic de PIC certaine en histologie repose sur la présence d'une fibrose marquée, d'un

remodelage architectural à prédominance sous-pleurale, d'une hétérogénéité spatiale des lésions de fibrose, de la présence de foyers fibroblastiques et de l'absence d'autres signes suggérant un autre diagnostic (Cottin et al., 2017; Raghu et al., 2018a). Les foyers fibroblastiques correspondent le plus souvent à un agrégat dense de fibroblastes, de myofibroblastes et de matrice extracellulaire riche en collagène (King et al., 2011a). Du rayon de miel peut s'associer à ces foyers fibroblastiques. Ce sont des espaces kystiques sous-pleuraux et fibrotiques fréquemment remplis de mucus et de cellules inflammatoires qui sont bordés par un épithélium bronchiolaire (King et al., 2011a) (voir figure 5). Ils témoignent de l'évolution de la PID (Raghu et al., 2018a).

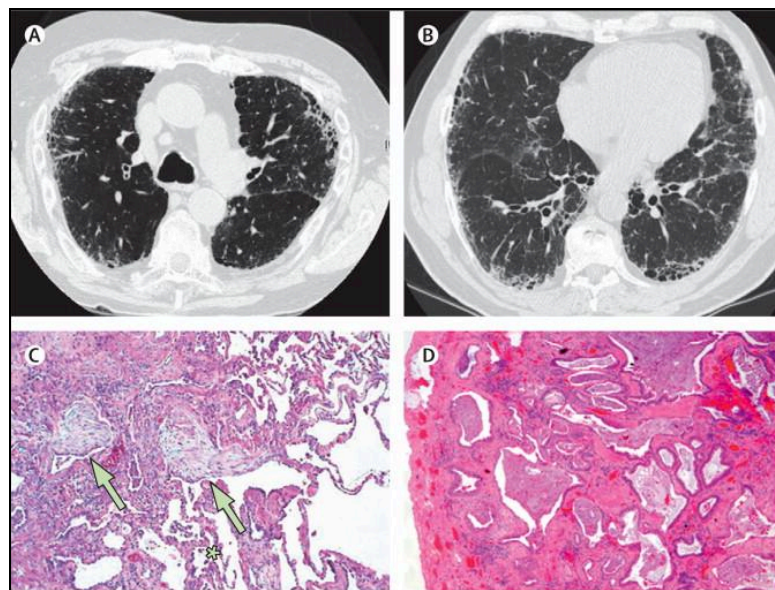


Figure 5: (A,B) Pneumopathie interstitielle commune (PIC) en tomographie thoracique haute résolution comportant des opacités réticulaires de prédominance basale et sous-pleurale avec un aspect en rayon de miel (C) l'aspect histologique de la PIC en biopsie pulmonaire avec présence de foyers fibroblastiques (flèches) associés au rayon de miel (D) (King et al., 2011a).

D'autres aspects histologiques sont également décrits. Le diagnostic de FPI repose sur une discussion multidisciplinaire (DMD) au cours de laquelle est réalisée la synthèse des données cliniques, fonctionnelles, radiologiques, biologiques et histologiques.

5- Physiopathologie de la FPI

La physiopathologie de la FPI est particulièrement complexe car elle implique de multiples acteurs cellulaires dont les rôles évoluent probablement au cours du temps. De ce fait, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du processus de fibrose ne sont pas

totale­ment connus et reposent encore fréquemment sur des hypothèses issues des modèles expérimentaux de fibrose développés chez les rongeurs. Il est consensuel d'affirmer que la fibrose pulmonaire est initiée sur le long terme par la répétition de l'agression de l'épithélium alvéolaire. Selon l'ancien paradigme, les lésions de cet épithélium induisaient le recrutement et l'activation de cellules immunitaires inflammatoires, qui étaient secondairement responsables de la différenciation myofibroblastique au niveau du tissu alvéolaire agressé (voir figure 6) (Desai et al., 2018). Cependant les cellules immunitaires n'apparaissent plus comme les acteurs cellulaires clés initiant l'activation des fibroblastes. Selon le nouveau paradigme aujourd'hui accepté par la communauté scientifique et médicale, ce sont les lésions chroniques des cellules épithéliales alvéolaires (CEA) qui créent un microenvironnement favorable à l'activation, la prolifération et la différenciation du fibroblaste. Ces derniers prolifèrent et secrètent les éléments de la matrice extracellulaire (MEC) au niveau du tissu alvéolaire endommagé. Ces processus s'accompagnent d'une réponse inflammatoire qui contribue à l'agression du tissu épithélial alvéolaire mais également à la différenciation des fibroblastes (Desai et al., 2018). L'activation du système immunitaire jouerait davantage un rôle régulateur de cette interaction CEA/fibroblaste qui favoriserait le processus de fibrose pulmonaire. Dans ce chapitre nous allons décrire plus en détails ces différents types cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la FPI.

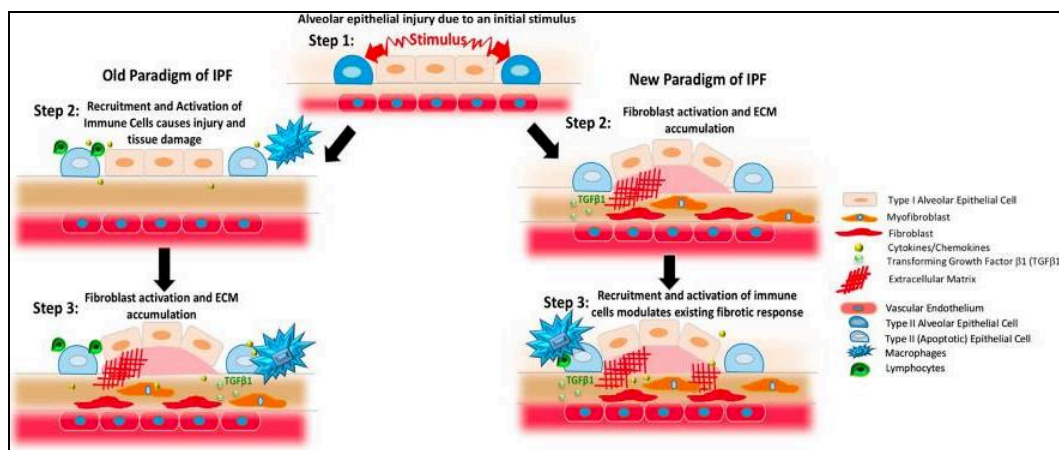


Figure 6: Changement du paradigme sur la physiopathologie de la FPI (Desai et al., 2018).

5.1- Les cellules épithéliales alvéolaires (CEA)

L'épithélium alvéolaire est constitué de 95% de CEA de type I (CEAI) et de 5% de cellules épithéliales alvéolaires de type II (CEAII) (voir figure 7). Les CEAI forment avec l'endothélium capillaire une barrière et une surface d'échange gazeux. Les CEAII contrôlent

la synthèse du surfactant, une protéine tensio-active empêchant le collapsus des alvéoles lors de l'expiration et jouant un rôle essentiel dans la défense immunitaire innée du poumon. De plus, les CEAI assurent le renouvellement de l'épithélium alvéolaire en se différenciant en CEAI (Nabhan et al., 2018).

Physiologiquement, la mort des CEAI induite par des lésions occasionnelles stimule transitoirement la prolifération et la différenciation des CEAI afin de restaurer au plan structural et fonctionnel le tissu alvéolaire. En revanche, au cours de la fibrose pulmonaire, les agressions répétées de l'épithélium alvéolaire, notamment par les différents facteurs de risques chimiques et biologiques, entraînent un stress chronique des CEA conduisant à terme à un défaut du renouvellement du tissu épithélial (Selman et al., 2001). Cette mauvaise cicatrisation tissulaire se manifeste par des modifications profondes du devenir et du phénotype des CEA: mort cellulaire, production anormale de protéines pro-inflammatoires /pro-fibrosantes, sénescence et transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Tanjore et al., 2012; Winters et al., 2019).

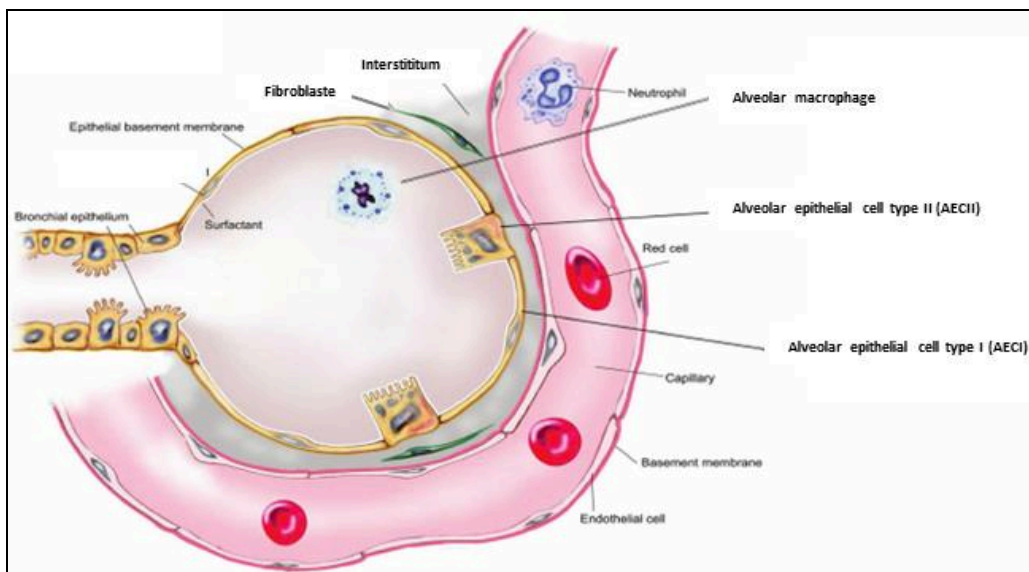


Figure 7: Représentation schématique de l'alvéole pulmonaire. Adapté selon (Grommes and Soehnlein, 2011).

5.1.a- Stress du réticulum et activation de la réponse UPR

Il est aujourd'hui admis que la répétition des agressions des CEA induit sur le long terme un stress du réticulum endoplasmique (RE) perturbant les régulations post-traductionnelles et le repliement tridimensionnel des protéines. L'accumulation intracellulaire de protéines ayant des défauts de structure et de conformation favorise l'activation de la voie de signalisation UPR (Unfolded Protein Response).

Ce processus implique différentes protéines transmembranaires du RE dont PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6), IRE1 α (Inositol Requiring Enzyme 1 α). L'UPR a notamment pour rôle d'induire l'expression des protéines chaperonnes. Ces dernières vont assurer le repliement de la protéine, la diminution de sa synthèse, l'augmentation de sa dégradation et si nécessaire engendrer une apoptose cellulaire (Burman et al., 2018). Des études *in vivo* ont démontré le rôle de l'UPR dans le développement de la fibrose pulmonaire. Notamment, l'induction du stress du RE par l'administration de tunicamycine potentialise le développement de la fibrose pulmonaire chez la souris exposée à la bléomycine (Lawson et al., 2011). L'expression des marqueurs de la réponse UPR tels que les protéines ATF4 et ATF6 ont également été identifiés dans les CEAI issues des patients atteints de FPI (Korfei et al., 2008). Une première conséquence majeure de l'induction du stress du RE et de l'activation de la voie UPR est l'induction chronique de l'apoptose des CEA.

5.1.b- Mécanismes d'apoptose des CEA

Différents modèles murins de fibrose pulmonaire ont démontré que le processus de fibrose se développe, le plus souvent, secondairement à l'apoptose des CEA. Chez la souris, l'induction de l'apoptose des CEA par le facteur « Fas ligand, FasL ou CD95L » induit une fibrose pulmonaire qui est potentialisée par le TGF- β , un facteur pro-fibrosant puissant (Hagimoto et al., 1997; Hagimoto et al., 2002). Une autre étude a démontré que la surexpression du TGF- β induit une fibrose pulmonaire qui s'accompagne d'une apoptose des CEA impliquant le gène Early Growth Response 1 (EGR-1) (Lee et al., 2004). Enfin, la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris est caractérisée par une apoptose des CEA initiée par la production des ERO et médiée par la voie des caspases (Wallach-Dayana et al., 2006). Des études réalisées sur des tissus pulmonaires issus des patients atteints de FPI montrent également une augmentation du taux des CEAI apoptotiques, localisées essentiellement à proximité des foyers fibroblastiques (Barbas-Filho et al., 2001; Uhal et al., 1998). Cette apoptose est associée à l'expression des protéines pro-apoptotique p53 et suppressive de tumeur p21 et à des dommages à l'ADN (Kuwano et al., 1996) (voir figure 8).

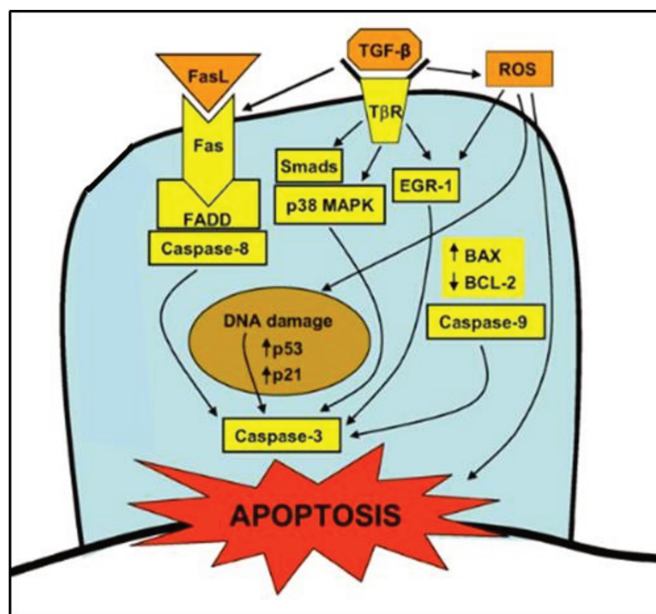


Figure 8: Voies de signalisation pro-apoptotiques induites dans les CEA. Adapté selon (Thannickal, 2006).

5.1.c- Sécrétion des médiateurs pro-fibrotiques et sénescence

La stimulation de la voie UPR stimule également la production de médiateurs pro-inflammatoires et/ou pro-fibrosants, telles que les chimiokines C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) et Chemokine Ligand 2 (CCL2), le facteur de croissance Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ou encore le TGF- β 1 qui est considéré comme un médiateur central de la FPI. En effet, le TGF- β 1 inhibe la prolifération des CEA, active le fibroblaste, stimule sa différenciation en myofibroblaste, et promeut la TEM (Sgalla et al., 2018). Le TGF- β 1 est sécrété par la CEA sous une forme inactive piégée dans un dimère du peptide LAP (Latency Associated Peptide). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la libération de la forme active du TGF- β 1. De nombreuses études ont démontré le rôle de différentes protéases et plus récemment celui de l'activité contractile des cellules. En effet, le peptide LAP est lié à la MEC et à l'intégrine α β 6 exprimée à la surface des CEA. La partie cytoplasmique de l'intégrine est elle-même associée au cytosquelette d'actine des CEA. Cette intégrine est la première à avoir été impliquée dans l'activation du TGF- β 1. L'expression de l'intégrine α β 6 par les CEA est fortement augmentée au cours de la fibrose pulmonaire. Suite à une stimulation des CEA et/ou un stress cellulaire, la contraction des fibres d'actine et de myosine des cellules épithéliales produit une force mécanique de traction qui ouvre le dimère du peptide LAP et libère le TGF- β 1 sous sa forme active (Wolters et al., 2014). *In vivo*, les souris déficientes en intégrine α β 6 et traitées par la bléomycine présentent une fibrose

pulmonaire de plus faible intensité que celle des souris contrôles. De plus, au sein du tissu pulmonaire de ces souris déficientes en $\alpha\beta6$, l'expression des gènes cibles du TGF- β 1 n'est pas significativement augmentée par la bléomycine, contrairement à celle des gènes de souris sauvages (Munger et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc un rôle important du stress cellulaire induit par la bléomycine pour augmenter l'expression de $\alpha\beta6$ et activer l'expression et la libération du TGF- β 1. Toutefois, le rôle de l'intégrine $\alpha\beta6$ dans l'activation du TGF- β 1 durant la FPI reste à démontrer (Wolters et al., 2014)

Par ailleurs, durant le développement de la fibrose pulmonaire, la persistance du stress cellulaire, favorise l'arrêt irréversible du cycle cellulaire des CEA, qui s'engagent alors dans un processus de sénescence. La cellule adopte un phénotype sécrétoire dit SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype). Elle sécrète des cytokines, des facteurs de croissances et des métalloprotéinases (Winters et al., 2019). *Lehmann et coll* ont identifié une augmentation de l'expression de marqueurs de sénescence cellulaire, telles que celles de la cyclin-dépendent kinase inhibitor (CDKN) 2A (P16) et de la CDKN1A (P21), dans le tissu pulmonaire de patients atteints de FPI (Lehmann et al., 2017). Les protéines P16 et P21 co-localisent avec le pro-Surfactant Protein-C, un marqueur des CEAI (Lehmann et al., 2017). *In vitro*, le traitement des CEA de souris par la bléomycine induit l'expression de P16. De plus, le surnageant de ces cellules sénescents induit l'expression du collagène par le fibroblaste (Tian et al., 2019). Enfin, il est important de noter que le raccourcissement des télomères entraîne aussi la sénescence des CEA (Winters et al., 2019). Les voies moléculaires pouvant influencer le phénotype des CEAI sont présentées dans la figure 9.

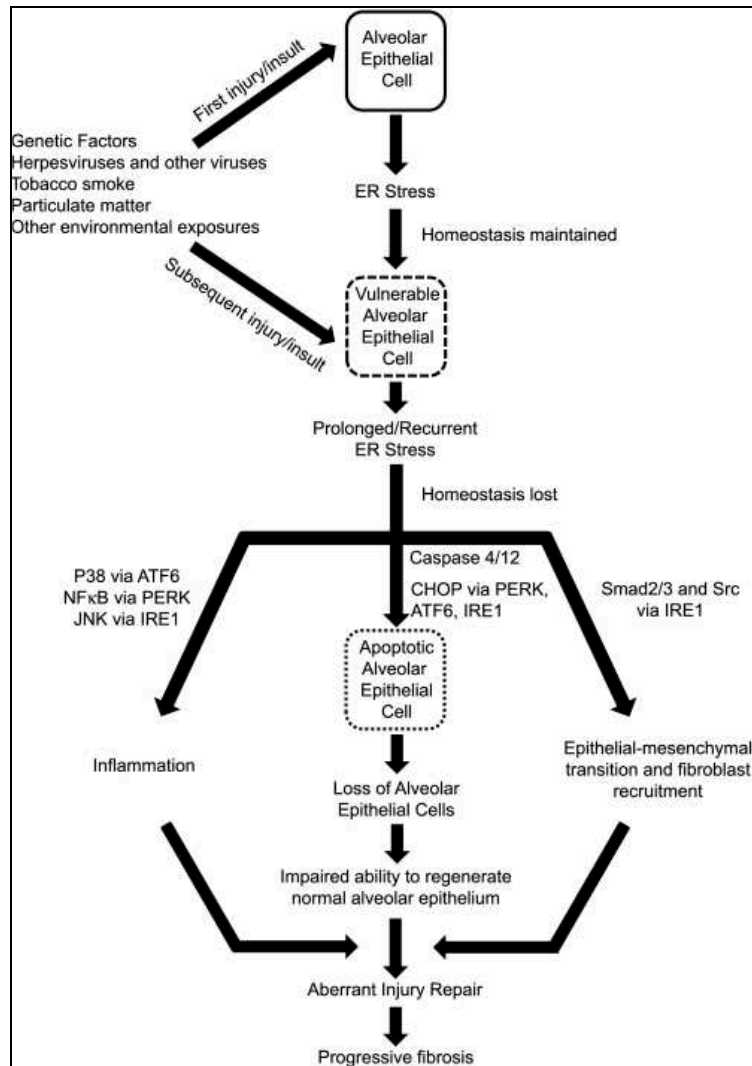


Figure 9: Les différents facteurs moléculaires influençant le phénotype pro-fibrotique des CEaII (Tanjore et al., 2012).

5.1.d- *La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)*

La TEM est un processus biologique durant lequel la cellule épithéliale perd sa polarité apico-basale et son adhérence. Elle acquiert alors des caractéristiques mésenchymateuses d'invasion, de migration et de synthèse de la MEC. Au niveau moléculaire, la TEM se traduit par la diminution de l'expression des gènes codant des protéines épithéliales telles que la E-Cadhérine et les cytokératines et par l'augmentation de l'expression des gènes codant des protéines mésenchymateuses telles que la N-Cadhérine, la Vimentine, l' α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) et la fibronectine (Salton et al., 2019). La TEM est induite par plusieurs facteurs de croissance mais le TGF- β représente le ligand extracellulaire le plus étudié. Après sa fixation sur son récepteur (TGF- β -R), le complexe TGF- β / TGF- β -R active les protéines SMAD2 et SMAD3. Le dimère SMAD2/SMAD3 forme un complexe trimérique avec

SMAD4. Ce dernier est transloqué au noyau et participe à la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes cibles. Le complexe SMAD diminue l'expression de l'E-Cadhérine via les facteurs de transcription SNAIL et augmente l'expression de la N-Cadhérine, de la fibronectine et de différentes métalloprotéinases (MMP) (voir figure 10) (Salton et al., 2019).

Le processus de TEM des CEA pourrait contribuer au développement de la FPI, mais le rôle de ce mécanisme reste encore incertain (Jolly et al., 2018). Plusieurs arguments soutiennent l'hypothèse selon laquelle le développement des fibroblastes au niveau du tissu alvéolaire est induit, au moins en partie, par la TEM des CEA (King et al., 2011b). D'une part, des études montrent que les CEA localisées dans les foyers fibroblastiques de tissus pulmonaires de patients atteints de FPI expriment des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux (Willis et al., 2005; Yamaguchi et al., 2017). Par exemple, *Varma et coll* ont démontré que les cellules de l'épithélium alvéolaire issues des patients atteints de FPI co-expriment le marqueur épithélial GRHL2 (Grainyhead-like 2) et les marqueurs mésenchymateux vimentine et Zinc finger E-box binding homeobox1 (ZEB1) (Varma et al., 2013). De plus, les CEA isolées de tissus pulmonaires de patients atteints de FPI et cultivées sur une matrice contenant de la fibronectine, perdent l'expression de marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux tels que le collagène-1 ou α -SMA (Marmai et al., 2011). Enfin, *in vivo*, une étude de «Lineage Tracing» sur un modèle murin de fibrose pulmonaire a démontré que 17 à 21 jours après l'administration intratrachéale de bléomycine, les CEAI de souris expriment des marqueurs mésenchymateux dont la vimentine et l' α -SMA (DeMaio et al., 2012). En revanche, la présence d'une co-expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux indique une transition incomplète des CEA en fibroblastes humains. Ceci montre que les CEA présentent un phénotype hybride et que le processus de TEM au cours de la FPI est incomplet. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les cellules issues de la TEM peuvent se différencier de façon définitive en fibroblaste et en myofibroblaste, notamment en sécrétant les éléments de la MEC (Jolly et al., 2018). De plus, on ne peut exclure que les cellules endothéliales et les fibrocytes subissent un processus de transition mésenchymateuse favorisant la formation de ces foyers fibroblastiques (King et al., 2011b).

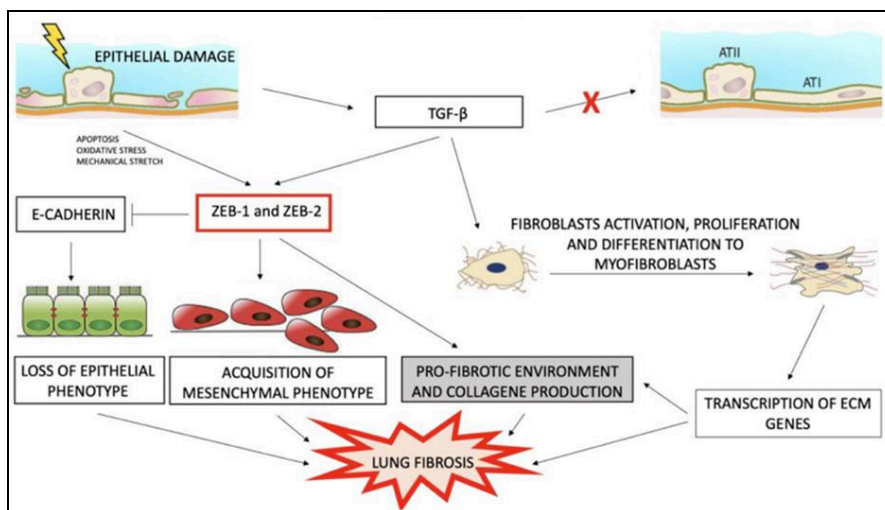


Figure 10: Le rôle de la TEM dans le mécanisme physiopathologique de la fibrose pulmonaire. Adapté selon (Salton et al., 2019).

5.2- Le fibroblaste et le myofibroblaste

Durant un processus physiologique de cicatrisation tissulaire, un dialogue spatio-temporel entre l'épithélium et les cellules mésenchymateuses est primordial. En effet, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules épithéliales, sont coordonnées avec le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses. Ces événements s'accompagnent d'un remodelage de la MEC et à la fin du processus de cicatrisation d'une élimination des myofibroblastes par l'induction de leur apoptose (Horowitz and Thannickal, 2006). Différentes études ont démontré que ce dialogue intercellulaire est altéré durant la FPI.

Le fibroblaste pulmonaire, résident ou recruté, est une cellule mésenchymateuse majeure de la FPI. Il assure le dépôt de la MEC lorsqu'il est différencié en myofibroblaste. Cependant l'origine de ces fibroblastes durant le développement de la FPI reste incertaine et possiblement multiple. Les fibroblastes pourraient proliférer et se différencier à partir i) de fibroblastes résidents ou ayant migré et infiltré le tissu pulmonaire, ii) de fibrocytes ayant migré du sang périphérique, et/ou iii) de cellules du tissu alvéolaire ayant subi une transformation mésenchymateuse (épithéliale, endothéliale et mésothéliale) (King et al., 2011b). Suite à un stress ou une stimulation, le fibroblaste (résident ou recruté) génère des fibres de stress composées d'actine cytoplasmique. Le fibroblaste devient alors un proto-myofibroblaste pouvant générer une force contractile. En présence de TGF- β (secrété par les CEA notamment), de protéines de la MEC telle que la fibronectine ou d'un stress mécanique,

le proto-myofibroblaste se différencie en myofibroblaste (Tomasek et al., 2002) (voir figure 11).

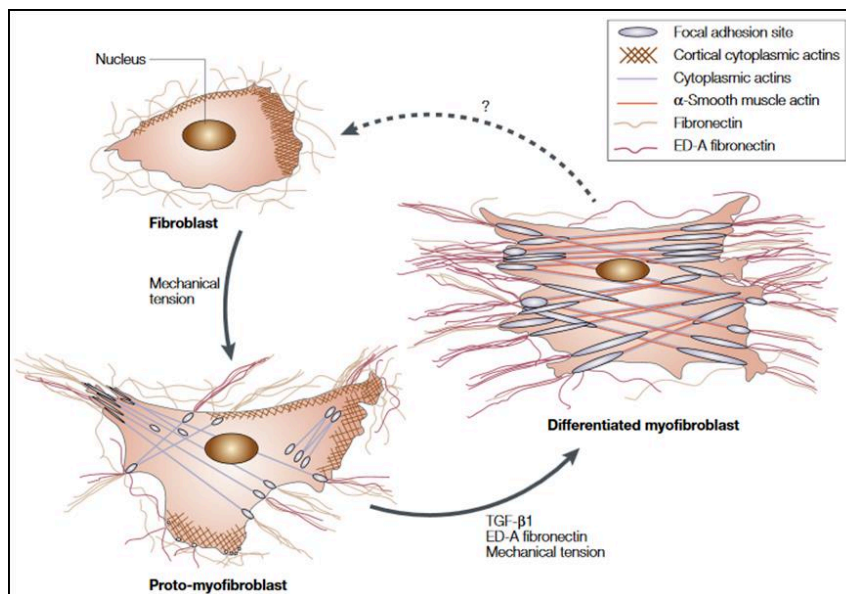


Figure 11: l'activation et la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste (Tomasek et al., 2002).

Les myofibroblastes sont des cellules mésenchymateuses de phénotype hybride. Elles regroupent des caractéristiques du fibroblaste et de la cellule musculaire lisse. En effet, son cytosquelette est constitué de β et γ -actine comme le fibroblaste, mais aussi d' α -actine du muscle lisse (α -SMA) (Tomasek et al., 2002). Comme toute cellule mésenchymateuse, les myofibroblastes issus des patients atteints de FPI se caractérisent par leur phénotype migratoire (Suganuma et al., 1995), leur capacité à sécréter des médiateurs pro-fibrotiques incluant le TGF- β 1, et leur activité contractile (Hinz et al., 2007). Cette dernière est liée à la formation des fibres de stress qui sont notamment composées de la protéine α -SMA (Hinz et al., 2007). Au cours du processus de cicatrisation physiologique, l'activité contractile est essentielle pour la fermeture de la plaie avant que le myofibroblaste ne soit normalement éliminé.

Durant la FPI, et contrairement aux CEA, les myofibroblastes acquièrent une résistance à l'apoptose cellulaire. Ce paradoxe de la mort cellulaire est considéré selon *Thannickal et coll* comme un point essentiel de la physiopathologie de la FPI (Thannickal, 2006). Il peut expliquer la présence des myofibroblastes au niveau du tissu alvéolaire lésé et la formation des foyers fibroblastiques au niveau desquels des médiateurs de l'apoptose telle que la forme clivée de la caspase-3 ou le récepteur Fas sont peu exprimés (Nho et al., 2013).

5.2.a- Résistance des myofibroblastes à l'apoptose

L'élimination des myofibroblastes par apoptose est essentielle dans la cicatrisation tissulaire car elle limite le dépôt excessif de la MEC et le développement de fibrose. Cette apoptose serait induite par la chute de l'expression des facteurs de croissance, la diminution de la synthèse de la MEC et la libération du monoxyde d'azote (NO) (Thannickal, 2006).

La résistance des myofibroblastes à l'apoptose, notamment induite par le FasL, durant le processus de fibrose pulmonaire peut s'expliquer par une dérégulation de l'expression des protéines anti- ou pro-apoptotiques. La résistance à l'apoptose induite par FasL résulterait de l'augmentation de l'expression des facteurs inhibiteurs de l'apoptose tels que XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) et FLIP (FLICE-Inhibitory Protein) (Tanaka et al., 2002). La surexpression du TGF- β chez les patients atteints de FPI contribuerait à l'acquisition du phénotype de résistance des myofibroblastes. En effet, le TGF- β 1 inhibe l'apoptose des myofibroblastes induite par l'IL-1 β , probablement en supprimant l'activité de la NO-synthase inductible (iNOS) et en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Zhang and Phan, 1999). Un autre mécanisme du TGF- β impliquerait l'induction de l'expression d'intégrines qui renforcent, non seulement l'adhérence des myofibroblastes, mais également leur survie en stimulant la voie de signalisation Focal Adhesion Kinase (FAK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT (Xia et al., 2004). L'activation d'AKT augmente l'expression de différentes protéines anti-apoptotiques notamment via la stimulation du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) (Thannickal et Horowitz, 2006). Enfin, *In vivo*, l'administration des inhibiteurs de la voie FAK et AKT réduit l'accumulation des myofibroblastes et diminue la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Vittal et al., 2005). L'ensemble des voies moléculaires anti-apoptotiques engagées dans le fibroblaste et le myofibroblaste est résumé dans la figure 12.

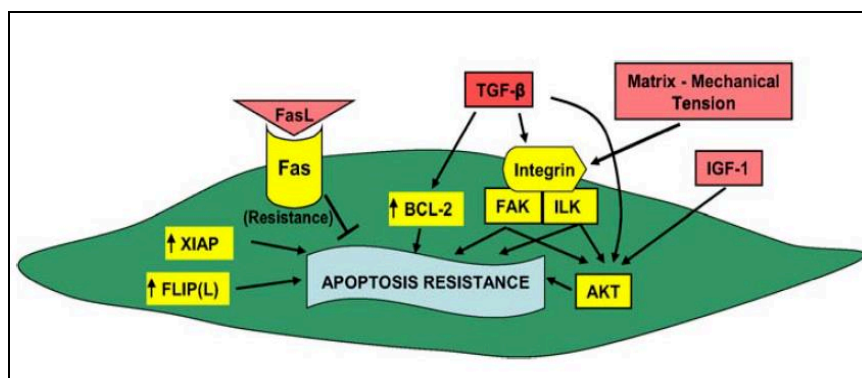


Figure 12: Les médiateurs et les voies de signalisation anti-apoptotiques activés dans le fibroblaste et le myofibroblaste des patients atteints de FPI (Thannickal, 2006).

5.2.b- La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est un réseau macromoléculaire dynamique qui exerce trois fonctions principales : (1) constituer un support physique structuré empêchant le collapsus des voies respiratoires supérieures, (2) former une membrane basale spécialisée dans les échanges gazeux au niveau des voies respiratoires inférieures et (3) servir de réservoir de facteurs de croissance qui sont libérés lors de la dégradation de la MEC (Tomos et al., 2017).

La MEC est un assemblage macromoléculaire tridimensionnel de nature glucidique et protéique. Ces macromolécules sont regroupées en trois catégories : les fibres de collagènes (fibrillaire I, II, III, V et non fibrillaire IV) et d'élastine, les glycoprotéines de structure (fibronectine, laminine) et les protéoglycanes et polysaccharides hydratés. La MEC est une structure extrêmement dynamique qui subit un renouvellement et un remodelage permanent. Son homéostasie est régulée par le fibroblaste qui secrète des protéines de dégradation de la MEC, telles que les MMP, et des inhibiteurs de MMP nommés Tissue Inhibitor of Metallopeptidase (TIMP) (Bagnato and Harari, 2015). Les myofibroblastes secrètent du collagène, de la laminine et de la fibronectine dans l'interstitium pulmonaire (Burgess et al., 2016). La capacité des fibroblastes et des myofibroblastes à secréter les différents éléments de la MEC de manière équilibrée est régulée par différentes cytokines, facteurs de croissance, médiateurs lipidiques, protéases, ainsi que par les forces mécaniques s'exerçant sur ces cellules. Lors du processus de fibrose, cet équilibre est rompu et engendre un dépôt excessif de MEC à l'origine d'une rigidité anormale du tissu pulmonaire (Clarke et al., 2013).

Les MMP sont des endopeptidases zinc-dépendant qui exercent physiologiquement une activité protéolytique sur les éléments de la MEC. Chez l'homme, il existe 24 MMP dont 8 semblent impliquées dans la physiopathologie de la FPI (Tomos et al., 2017). Au niveau tissulaire, ces MMP sont localisées dans l'épithélium alvéolaire entourant les lésions fibrotiques (Fukuda et al., 1998). La MMP-7 (matrilysin) est la plus étudiée dans le contexte de la fibrose pulmonaire. La concentration de la pro-MMP-7 est augmentée dans les liquides de LBA issus des patients atteints de FPI. Au niveau tissulaire, cette dernière est exprimée par les CEAI et les macrophages alvéolaires (Fujishima et al., 2010). *In vivo*, les souris déficientes en MMP-7 présentent moins de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Zuo et al., 2002) comparée aux souris contrôles. *In vivo*, la surexpression de la MMP-3 induit une fibrose pulmonaire typique caractérisée par un accroissement du dépôt de collagène et l'accumulation des myofibroblastes. De plus, les auteurs ont démontré que la MMP-3 induit la TEM des cellules épithéliales pulmonaires murines (Yamashita et al., 2011).

L'activité catalytique des MMP est contrôlée par les TIMP. La famille des TIMP comprend 4 membres (de TIMP-1 à TIMP-4) et leur rôle dans la physiopathologie de la FPI reste peu clair (Tomos et al., 2017). La suppression de TIMP-1 ne semble pas modifier la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Kim et al., 2005). Cependant, l'expression des TIMP est augmentée dans le tissu pulmonaire de patients atteints de FPI (Selman et al., 2000). Un déséquilibre entre l'expression des MMP et des TIMP pourrait réduire la dégradation de la MEC, induire une rigidité matricielle du tissu pulmonaire et in fine amplifier le processus de fibrose pulmonaire. En effet, la rigidité matricielle du tissu pulmonaire, associée aux tensions mécaniques induites par les mouvements respiratoires, modulent le phénotype du fibroblaste. Les fibroblastes pulmonaires « normaux » acquièrent un phénotype « FPI » lorsqu'ils sont cultivés dans une matrice dotée d'une rigidité optimale. L'augmentation de la rigidité matricielle favorise leur prolifération, leur résistance à l'apoptose, leur migration et leur capacité à produire de la MEC, notamment en inhibant la production de prostaglandine E2, un puissant inhibiteur de fibrose (Liu et al., 2010). La rigidité matricielle accroît également la capacité des myofibroblastes à sécréter du TGF- β 1 sous sa forme active lors de la contraction de leurs fibres de stress (Wipff et al., 2007). Le mécanisme implique complète celui expliqué pour les CEA en prenant en compte cette notion de rigidité du tissu extracellulaire: Le TGF- β 1 produit par le myofibroblaste est sécrété sous forme inactive associée au peptide LAP. Au niveau tissulaire, LAP est préférentiellement localisée au niveau des foyers fibroblastiques et co-localisé avec la fibronectine, la fibrilline-1 et la fibrilline-2, suggérant une connexion directe du complexe LAP/TGF- β 1 avec la MEC (Leppäranta et al., 2012). Les intégrines détectées à la surface des CEA relient également le peptide LAP au cytosquelette des myofibroblastes. La forte activité contractile des myofibroblastes induirait une traction du cytosquelette et une tension au niveau du complexe LAP/TGF- β 1. Lorsque la MEC est peu rigide et élastique, la traction serait transmise à la MEC qui se rétracterait, empêchant l'ouverture du dimère LAP. En revanche, lorsque la MEC devient rigide, comme cela est observé au cours du processus de fibrose pulmonaire, elle résisterait à la traction induite par la contraction des fibres musculaires. La tension serait alors maximale sur le dimère LAP qui s'ouvrirait et libérerait le TGF- β 1 (voir figure 13) (Wipff et al., 2007). Cet impact de la rigidité de la MEC serait également opérant pour la libération du TGF- β 1 à partir des CEA.

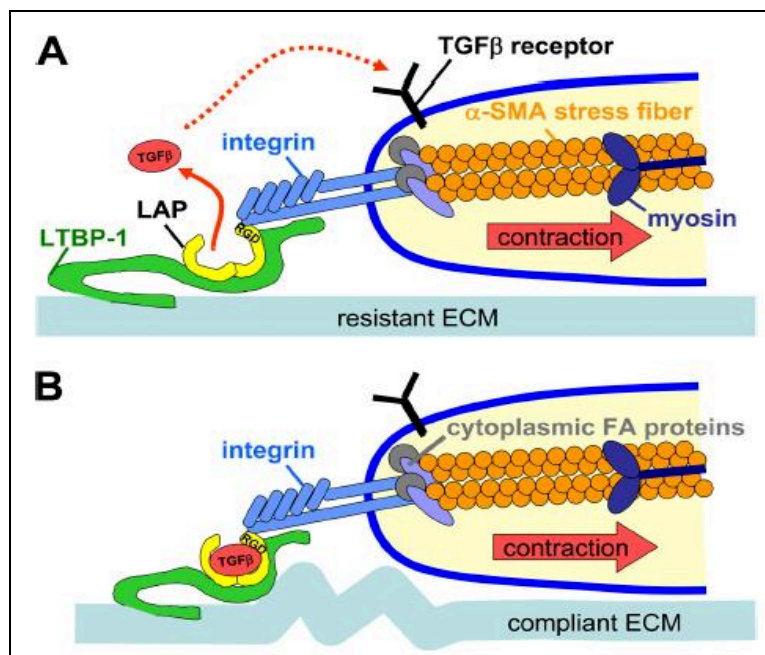


Figure 13. Modèle expliquant la libération du TGF-β induite par la contraction du myofibroblastes dans le contexte de fibrose pulmonaire (Wipff et al., 2007).

De plus, ce mécanisme démontré *in vitro* sur des fibroblastes en culture, semble être fonctionnel au niveau du tissu pulmonaire soumis au stress mécanique induit par la ventilation. En effet, lorsqu'il est soumis à une traction mécanique mimant l'inspiration, le tissu pulmonaire issu de rat ou d'humain présentant une fibrose pulmonaire secrète davantage de TGF-β1 sous forme active que le tissu sain (Froese et al., 2016). Par ailleurs, au niveau moléculaire, ce stress mécanique stimule la phosphorylation de la protéine FAK au niveau des intégrines des myofibroblastes, puis active la voie Rho/Rock qui contrôle l'induction de gènes codant pour les éléments de la MEC (Upagupta et al., 2018) (voir figure 14). Au cours de la fibrose pulmonaire, le stress mécanique imposé aux tissus lors des mouvements respiratoires pourrait donc induire un rétrocontrôle positif entraînant une amplification des signalisations pro-fibrosantes qui renforcerait le dépôt de MEC.

Chez les patients souffrant de FPI, la rigidité matricielle entraîne probablement une baisse de l'élasticité du tissu pulmonaire. Au plan fonctionnel et clinique, ces mécanismes contribuent à l'altération des échanges gazeux et à l'apparition des premiers signes cliniques (Upagupta et al., 2018).

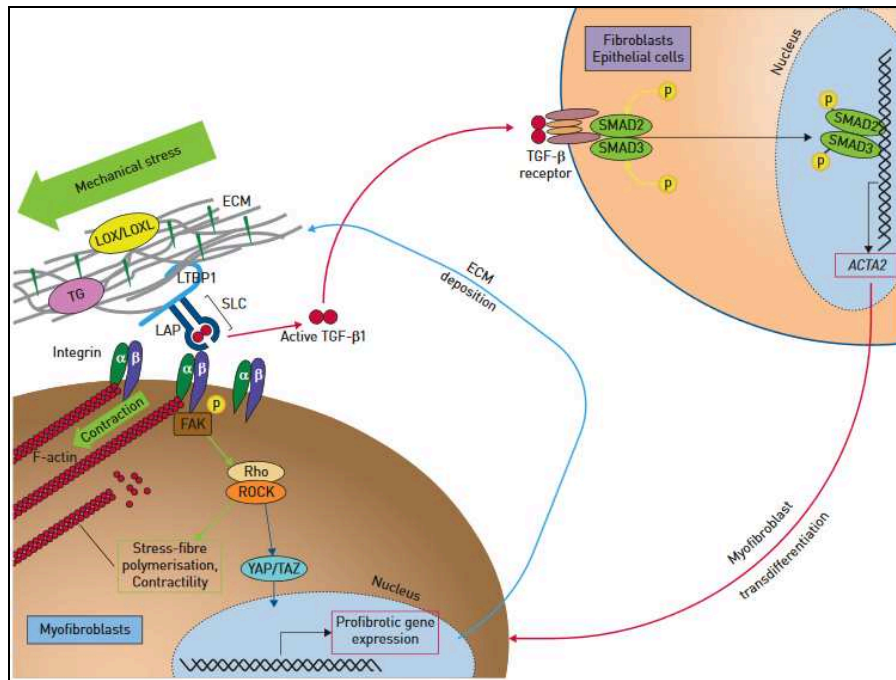


Figure 14: Le rétrocontrôle positif entre le TGF-β1 et la MEC (Upagupta et al., 2018).

5.3- Les cellules immunitaires

Le système immunitaire a pour fonction de préserver l'intégrité de l'organisme en luttant contre les différents agents pathogènes. Afin d'éliminer ces éléments étrangers, le système immunitaire met en jeu une réponse immunitaire innée, non spécifique et rapide, et une réponse immunitaire adaptative, spécifique d'un antigène et plus tardive. La répétition des agressions de l'épithélium alvéolaire au cours de la fibrose pulmonaire favorise le développement d'une réaction inflammatoire chronique pouvant contribuer à la FPI (Desai et al., 2018). Les réponses immunitaires innées et adaptatives ont été mises en évidence au cours de la FPI, cependant leurs rôles dans la physiopathologie de la fibrose semblent complexes, parfois contradictoires et restent encore mal compris (Desai et al., 2018). Ce chapitre présente succinctement l'implication des principales cellules immunitaires dans le développement de la FPI. Le rôle du macrophage est décrit en détail dans la seconde partie de ce document.

5.3.a- Mise en jeu des cellules de l'immunité innée

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme. Il regroupe les cellules phagocytaires (monocytes/macrophage et cellules dendritiques (CD)), les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et les cellules lymphoïdes innées qui incluent les cellules Natural Killers (NK).

1) Les cellules dendritiques (CD)

Les CD sont les principales cellules immunitaires contrôlant le lien entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les CD sont présentes au niveau pulmonaire, où elles sont exposées de façon continue à différents agents pathogènes. Après leur activation, les CD migrent vers les ganglions où elles interagissent de façon spécifique avec les lymphocytes T (LT) (Liu et al., 2017a). La concentration de CD myéloïdes CD1c⁺ immature est augmentée dans les liquides de LBA des patients atteints de FPI (Tsoumakidou et al., 2009). Au niveau tissulaire, *Marchal-Sommé et coll* ont identifié la présence des CD immatures CD1a⁺CD1c⁺ DC-SIGN⁺ (DC-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin) préférentiellement dans les zones de foyers fibroblastiques (Marchal-Sommé et al., 2007). Cependant, des CD matures CD83⁺CD86⁺DC-LAMP⁺ seraient également détectées au niveau de structure appelée structures lymphoïdes tertiaires (SLT). Chez la souris, le traitement par la bléomycine augmente les concentrations de CD matures dans le tissu pulmonaire durant la phase de fibrose (Bantsimba-Malanda et al., 2010). L'inhibition de l'activité des CD par un agent immunomodulateur réduit la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine dans ce modèle.

2) Les fibrocytes

Les fibrocytes dériveraient de précurseurs monocytaires et pourraient se différencier en fibroblastes au sein des tissus lésés. Ils représentent une petite fraction des leucocytes circulant chez l'individu sain. Leur taux augmente lors de pathologies inflammatoires chronique médiée par le macrophage et caractérisée par la persistance de fibroblastes activés (Reilkoff et al., 2011). Lors d'une agression tissulaire, le fibrocyte migre vers le site endommagé en réponse à différentes chimiokines et se différencie en cellules mésenchymateuses ayant des propriétés de fibroblaste (Strieter et al., 2009). Le fibrocyte est caractérisé phénotypiquement par l'expression des marqueurs de cellule souche hématopoïétique tels que le CD45 et le CD34. Comme le fibroblaste, il peut sécréter le collagène (Reilkoff et al., 2011). De plus, les fibrocytes expriment plusieurs récepteurs aux chimiokines, dont le récepteur CXCR4 (CX-Chemokine Receptor 4) sur lequel se fixe la chimiokine CXCL12 (SDF-1, Stromal cell-Derived Factor-1). CXCL12 semble jouer un rôle prépondérant dans la migration des fibrocytes et leur infiltration du tissu pulmonaire (Strieter et al., 2009). *In vivo*, l'expression de CXCL12 est augmentée dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. La neutralisation de CXCL12 diminue l'infiltration pulmonaire des fibrocytes et l'intensité de la fibrose pulmonaire induite chez la souris

(Andersson-Sjöland et al., 2008; Phillips et al., 2004). Les concentrations de CXCL12 sont augmentées dans le sérum et le liquide de LBA prélevés chez des patients atteints de FPI par rapport à celles mesurées chez les sujets contrôles. Chez ces malades, le taux de fibrocytes circulant est augmenté et l'infiltration des fibrocytes $CD34^+CD45^+CXCR4^+$ dans le tissu pulmonaire est corrélée positivement au nombre de foyers fibroblastiques (Moeller et al., 2009). Ce taux de fibrocytes circulant peut être utilisé comme un marqueur clinique de progression de la maladie. L'ensemble de ces études suggère un rôle potentiel du fibrocyte durant la FPI, mais celui-ci reste à confirmer (Desai et al., 2018).

3) Les neutrophiles

Lors d'une agression par un agent pathogène, les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées au niveau du tissu pulmonaire. Ils assurent leur fonction antibactérienne en sécrétant des protéases, des molécules oxydantes, des cytokines et des chimiokines (Kruger et al., 2015). La migration des neutrophiles vers le tissu pulmonaire endommagé est induite par la chimiokine IL-8 (CXCL8) et par le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Le nombre de neutrophiles et les concentrations d'IL-8 et de G-CSF sont augmentées dans les liquides de LBA de patients atteints de FPI (Ashitani et al., 1999; Xaubet et al., 1998). Le nombre de neutrophiles est également corrélé négativement à la CVF des patients malades (Ashitani et al., 1999). Les neutrophiles contribuent au développement de la fibrose pulmonaire en sécrétant diverses MMP et TIMP (Desai et al., 2018). En particulier, les neutrophiles activés produisent une élastase ou neutrophile élastase (NE) qui dégrade divers composants de la MEC et génère des signaux de danger. *In vivo*, l'inhibition de la NE par une délétion génétique ou par un inhibiteur chimique diminue la fibrose pulmonaire induite par l'amiante (Gregory et al., 2015). De plus, cette NE induit la prolifération et la différenciation des fibroblastes pulmonaires humains en myofibroblastes (Gregory et al., 2015). Enfin l'expression de la NE est augmentée chez les patients atteints de FPI (Obayashi et al., 1997). Bien que les neutrophiles puissent jouer un rôle pro-fibrosant dans les modèles murins, leur contribution à la physiopathologie de la FPI reste incertaine. En effet chez les patients souffrant de FPI, l'aspect histopathologique de PIC n'est pas caractérisé par l'accumulation des neutrophiles (Desai et al., 2018).

4) Les cellules lymphoïdes innées (CLI)

Les CLI sont des lymphocytes associés au système immunitaire inné et sont issus d'un précurseur lymphoïde commun (Duerr and Fritz, 2016). Contrairement aux LT du système

immunitaire adaptatif, les CLI sont activées indépendamment d'une reconnaissance antigénique. Elles comprennent les CLI cytotoxiques (NK) et les CLI auxiliaires. Ces dernières sont classées en trois sous-groupes selon les cytokines produites: les CLI1 secrétant l'IFN- γ (Interferon γ), CLI2 produisant l'IL-13 et l'IL-5, et les CLI libérant de l'IL-17 et de l'IL-22. Les cytokines responsables de l'activation et de la prolifération des CLI2 sont l'IL-33 et l'IL-25 qui sont sécrétées par les cellules épithéliales soumis à un stress, les cellules endothéliales, les CD et les macrophages (Duerr and Fritz, 2016). Ces cytokines jouent un rôle important dans la fibrose pulmonaire. *In vivo*, la bléomycine induit une fibrose pulmonaire de plus faible intensité chez les souris déficientes en récepteur à l'IL-33 (ST2^{-/-}) ou traitées par un anticorps anti-IL-33 que celle induite chez les souris sauvages (Li et al., 2014). Inversement, les souris sauvages traitées par l'IL-33 recombinante ont une exacerbation de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Li et al., 2014). Hams et coll ont montré que l'administration d'IL-25 est suffisante pour induire le développement d'une fibrose pulmonaire probablement médiée par les CLI2 (Hams et al., 2014). En effet, les souris déficientes en CLI2 et traitées par l'IL-25 présentent moins de fibrose pulmonaire. Les CLI2 activées par l'IL-25 ou par des agents environnementaux seraient pro-fibrosantes en sécrétant l'IL-13 qui stimule la production de collagène par le fibroblastes (Desai et al., 2018). Enfin, les auteurs ont démontré que les concentrations d'ILC2 et d'IL-25 sont augmentées dans les liquides de LBA et dans les tissus pulmonaires de patients atteints de FPI (Hams et al., 2014). L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle potentiel, mais à confirmer, des ILC dans la FPI. L'engagement des cellules immunitaires innées dans la FPI est schématisé dans la figure 15.

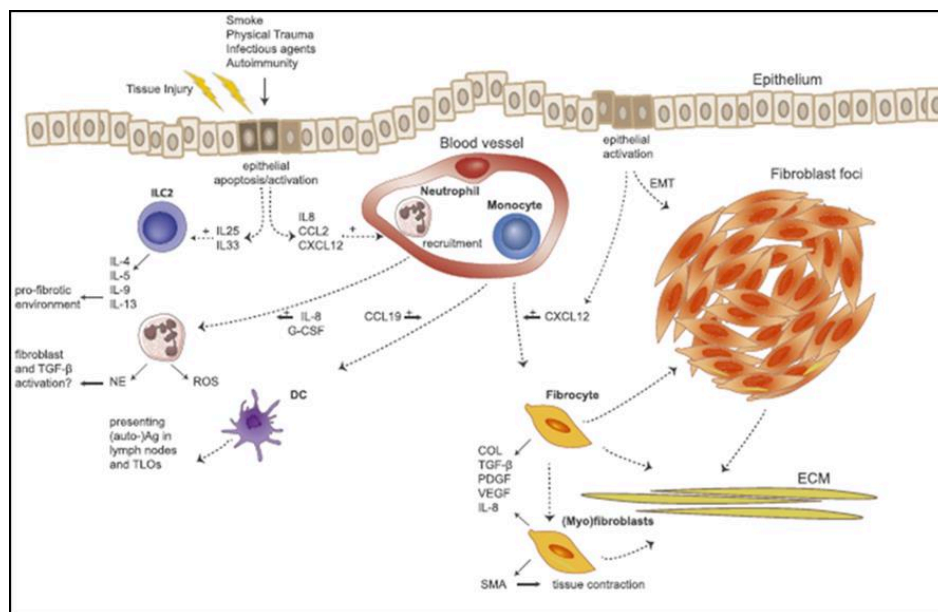


Figure 15: Le rôle du système immunitaire inné dans la de la FPI (Heukels et al., 2019).

5.3.b- Mise en jeu des cellules de l'immunité adaptative

Les LT et les lymphocytes B (LB) contrôlent respectivement les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale. Ces deux familles de lymphocytes sont détectées dans le tissu pulmonaire de patients atteints de FPI.

1) Les lymphocytes T (LT)

Les LT ont été identifiés en grand nombre dans les SLT des tissus pulmonaires de patients atteints de FPI (Marchal-Sommé et al., 2006). Les SLT sont des structures comprenant des zones riches en LT et LB, semblables aux organes lymphoïdes secondaires, mais elles ne sont pas encapsulées (Marchal-Sommé et al., 2007). Par un marquage de la prolifération cellulaire (Ki-67) et de l'apoptose (caspase-3 clivée), ces auteurs montrent que les LT ne prolifèrent pas et qu'ils ne sont pas engagés dans un processus apoptotique (Todd et al., 2013). Les LT auxiliaires CD4⁺ sont les LT les plus étudiés dans la FPI. Ils sont classés en plusieurs sous-populations de LT helper (LTh) et en LT régulateurs (Treg).

Historiquement, la balance LTh1/LTh2 a été considérée comme jouant un rôle important dans la physiopathologie de la FPI, avec un rôle anti-fibrosant pour les Th1 et un rôle pro-fibrosant pour les Th2. Les LTh1, qui sont principalement activées par l'IL-12, secrètent notamment l'IFN- γ qui possède des propriétés anti-fibrosantes. Chez la souris, l'administration d'IL-12 diminue l'intensité de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine par rapport à celle observée chez la souris non traitée (Keane et al., 2001). Cet effet anti-fibrosant de l'IL-12 est associé à une augmentation des concentrations d'IFN- γ dans les liquides de LBA et dans les tissus pulmonaires des souris. Un co-traitement par l'IL-12 et par un anticorps neutralisant l'IFN- γ réduit l'effet protecteur de l'IL-12 (Keane et al., 2001). Inversement, les cytokines IL-4 et IL-13 sécrétées par les LT polarisés en LTh2 induisent la prolifération et la différenciation du fibroblaste humain en myofibroblaste. Ces effets sont inhibés par la culture des fibroblastes en présence d'IFN- γ (Saito et al., 2003). L'expression de l'IL-13 est augmentée dans le tissu pulmonaire et dans les liquides de LBA des patients souffrant de FPI (Parker et al., 2017). Le traitement de ces malades par l'IFN- γ (King et al., 2009) ou par un anticorps anti-IL-13 (Tralokinumab) (Parker et al., 2017) ne réduit ni leur survie ni le déclin de leur fonction respiratoire. Le rôle des LTh1 et LTh2 dans la physiologie de la FPI demeure donc incertain.

Les LTh17 secrètent l'IL-17 et l'IL-22. L'IL-17 stimule les défenses antimicrobiennes mais contribue aussi fortement au développement de maladies inflammatoires chroniques notamment dans un contexte d'auto-immunité (Desai et al., 2018). *Mi et coll* ont démontré

que l'IL17 induit *in vitro* la sécrétion du collagène et promeut la TEM des cellules épithéliales murines en partie via la production de TGF- β 1 (Mi et al., 2011). *In vivo*, les auteurs montrent que la neutralisation de l'IL-17 diminue la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou par la silice. Des cellules Th17 sont détectées dans les infiltrats inflammatoires chez les patients atteints de FPI (Heukels et al., 2019). Cependant, en l'absence d'étude clinique sur les effets de molécules anti-IL17, le rôle exact de cette cytokine durant la FPI reste à démontrer (Desai et al., 2018).

La contribution des LTreg dans la progression de la FPI est également mal comprise. D'une part, les résultats de travaux étudiant l'évolution des concentrations des LTreg au cours de la maladie sont contradictoires. En effet, selon *Kotsianidis et coll.*, la concentration des LTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans les liquides de LBA et dans le sang périphérique, ainsi que leur fonctions immunosuppressives vis-à-vis des LTh, sont diminuées chez les patients atteints de FPI (Kotsianidis et al., 2009). Cependant une autre étude démontre l'augmentation des concentrations de LTreg dans ces tissus (Galati et al., 2014). D'autre part, le rôle des Treg dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire semble également dépendre de la période à laquelle ces cellules interviennent. En effet, une étude effectuée sur le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, et traitée par un anticorps anti-CD25 bloquant l'activité des LTreg, indique que les LTreg possèdent un rôle pro-fibrosant durant la première phase de la fibrose pulmonaire en induisant la sécrétion de TGF- β 1 et de collagène. Mais ces LTreg exerceraient un rôle anti-fibrosant durant le stade avancé de la fibrose pulmonaire (Boveda-Ruiz et al., 2013). Par ailleurs, une sous population de Treg Sema 7a⁺ (Semamorphin 7A) détectable chez les patients atteints de FPI, est capable d'induire une fibrose pulmonaire impliquant le TGF- β 1 chez la souris (Reilkoff et al., 2013).

2) Les lymphocytes B (LB)

Comme les LT, les LB CD20⁺ ont été identifiés dans les SLT des tissus pulmonaires prélevés chez des patients atteints de FPI (Marchal-Sommé et al., 2006). Leur migration vers ces structures est assurée par la chimiokine CXCL13 qui est un biomarqueur pronostic de la FPI (voir la présentation CXCL13 dans le chapitre 2) (Vuga et al., 2014). Au niveau phénotypique, ces LB sont positifs pour les marqueurs CD40⁺ et CD40L. L'expression de CD40L reflète l'activation des lymphocytes qui peuvent à leur tour activer les CD CCR7⁺ CD40⁺ nouvellement recrutées au sein du tissu pulmonaire (Marchal-Sommé et al., 2006). De plus l'interaction CD40L/CD40 est essentielle dans le modèle de fibroses pulmonaire induite par l'auto-immunité (Zhang-Hoover et al., 2001). Toutefois, la FPI n'est pas une pathologie

auto-immune bien que des auto-anticorps soient fréquemment détectés chez ces malades. Les autoanticorps sont majoritairement dirigés contre des protéines présentes dans les CEA, telles que les protéines de structure comme la vimentine. *Li et coll* ont identifié une augmentation des concentrations plasmatiques d'IgG anti-vimentine chez les patients atteints de FPI, par rapport à celles mesurées chez des sujets contrôles. Ces concentrations sont corrélées négativement à la DLco, la CVF et la survie des patients (Li et al., 2017a). Le facteur BLys (B Lymphocyte stimulating factor, BAFF) régule la survie, la prolifération et la fonction des LB et joue un rôle critique dans les maladies auto-immunes. *In vivo*, la bléomycine induit l'expression de BLys chez la souris. L'invalidation génétique ou la neutralisation de cette cytokine diminue l'intensité de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (François et al., 2015). Chez les patients atteints de FPI, la concentration sanguine de BLys est augmentée par rapport à celle de sujets contrôles et est corrélée négativement à la DLco de ces patients (Xue et al., 2013). L'infiltration des LB et la production d'auto-anticorps au niveau du tissu pulmonaire entretiennent probablement la réaction inflammatoire au cours de la FPI et notamment lors des exacerbations aiguës. Ainsi, chez des patients FPI présentant une exacerbation aiguë et des autoanticorps, l'élimination de ces immunoglobulines par échange plasmatique, et le traitement par le rituximab bloquant les LB, améliorent leur état clinique (Donahoe et al., 2015). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre leur rôle exact dans la physiopathologie de la FPI.

L'engagement de l'ensemble des lymphocytes dans la FPI est schématisé dans la figure 16.

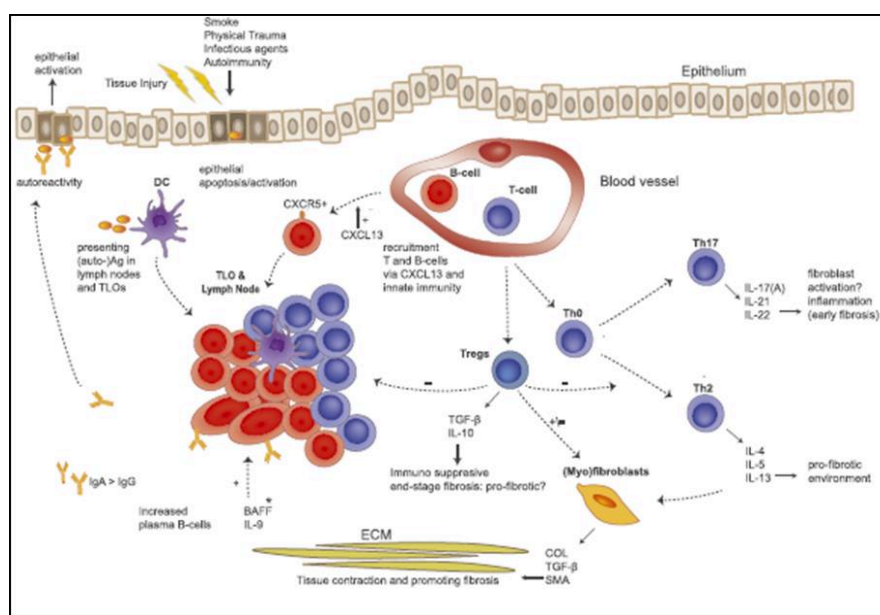


Figure 16: Le rôle du système immunitaire adaptatif dans la physiopathologie de la FPI (Heukels et al., 2019).

Chapitre II: Le macrophage

En 1892, Elie Metchnikov décrit l'existence de cellules très mobiles dotées d'une fonction fondamentale qui est la phagocytose des microorganismes. Ces cellules sont ainsi nommées « Macrophage » (Mechnikov, 1988). Ce sont des cellules immunitaires abondantes, présentes dans tous les tissus. L'environnement spécifique de chaque tissu influence la différenciation des macrophages qui acquièrent une spécificité fonctionnelle. Ainsi, les macrophages sont classés en sous populations en fonction de leur localisation anatomique et leur phénotype. On parlera d'ostéoclaste au niveau des os, de microglie au niveau du cerveau, de cellule de kupffer au niveau du foie et de macrophage pulmonaire au niveau du poumon.

Dans l'arbre respiratoire, et chez le sujet sain, le macrophage est localisé dans la lumière alvéolaire, l'interstitium alvéolaire, la sous-muqueuse bronchique et l'adventice vasculaire (Garbi and Lambrecht, 2017). La classification du macrophage pulmonaire distingue deux populations : (1) le macrophage alvéolaire (MA) localisé au niveau de la lumière alvéolaire, et (2) le macrophage interstitiel (MI) situé entre l'épithélium alvéolaire et l'endothélium vasculaire (voir figure 17).

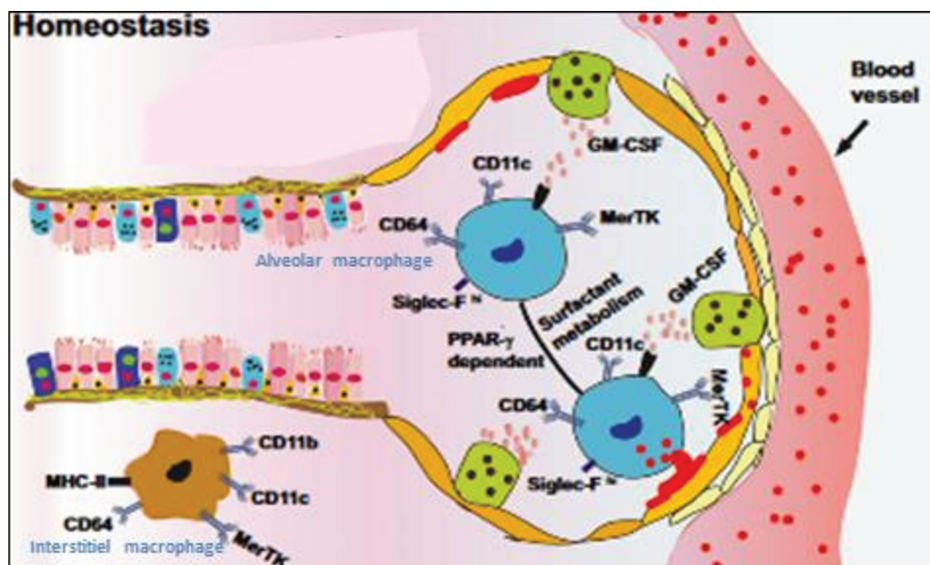


Figure 17: Localisation tissulaire du macrophage pulmonaire chez le sujet sain.

(Puttur et al., 2019).

I- Les macrophages pulmonaires

1- Le macrophage alvéolaire (MA)

Les MA représentent une grande fraction des cellules de la lumière alvéolaire. Ils sont en contact avec les CEA et sont directement exposés aux polluants environnementaux (Joshi et al., 2018). Elles sont dotées d'une grande taille, d'une forte granulosité et de capacité phagocytaire. Ainsi, le MA est très caractéristique et facilement identifiable (Fathi et al., 2001). Au niveau phénotypique, le MA de souris est caractérisé par l'expression de MerTK (Mer proto-oncogène Tyrosine Kinase), CD64, CD68, CD206 et F4/80. De plus, ces macrophages expriment fortement l'intégrine CD11c et la Siglec F (Sialic acide-binding lectin) mais n'expriment ni CX3CR1 ni CCR2 (Gibbings et al., 2015, 2017). Chez les humains sans pathologie respiratoire inflammatoire, le MA est identifié par l'expression de CD11c, HLA-DR, CD68, CD206 et CD169 (siglec1, Sialoadhesin) (Byrne et al., 2016).

1.1- Ontogénie du macrophage alvéolaire

Historiquement, *Van Furth et coll* ont suggéré que tous les macrophages tissulaires sont issus du monocyte circulant (van Furth and Cohn, 1968). Cette théorie a été réfutée suite à des études récentes qui montrent que les macrophages tissulaires résidents ont une origine embryonnaire. En effet, les MA sont issus de précurseurs embryonnaires du sac vitellin « yolk sac » ou des monocytes du foie fœtal (Guilliams et al., 2013). Contrairement aux autres macrophages qui occupent l'organe durant la phase prénatale, les précurseurs embryonnaires du MA occuperaient la niche alvéolaire immédiatement après la naissance (Guilliams et al., 2013). La migration trans-épithéliale et l'implantation de ces précurseurs au niveau alvéolaire est dépendante de l'expression de la L-plastin (Todd et al., 2016). Cependant, leur différenciation en MA est assurée par le facteur de croissance GM-CSF (Granulocyte Macrophage Stimulating Factor), qui est principalement sécrété par les CEAI (Schneider et al., 2014). *In vivo*, les souris déficientes en GM-CSF ne produisent pas de MA même si les monocytes sont bien présents au niveau du tissu pulmonaire. Ceci démontre que le GM-CSF est primordial pour la différenciation du monocyte résident en MA et pour sa maturation chez la souris saine (Guilliams et al., 2013). Une fois différenciée, cette population de MA est dotée d'une durée de vie longue. Leur maintien serait assuré par un auto-renouvellement in situ résultant de leur prolifération, avec une contribution minimale du monocyte circulant chez le sujet sain (Guilliams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013).

1.2- Fonctions générales du macrophage alvéolaire chez le sujet sain

Une des fonctions clef du MA est d'assurer l'homéostasie du surfactant, une lipoprotéine qui réduit la tension superficielle air-liquide afin d'éviter tout collapsus alvéolaire. Le surfactant contribue aussi aux défenses immunitaires lors des infections microbiennes. Ces différents constituants assurent notamment l'opsonisation des agents microbiens et l'inhibition de l'entrée virale dans la cellule hôte. Ainsi l'homéostasie du surfactant est essentielle pour la fonction et l'immunité pulmonaire. La synthèse du surfactant est assurée par les CEAI et sa dégradation est contrôlée par le MA et les CEAI après sa recapture (Garbi and Lambrecht, 2017). Le catabolisme du surfactant par le MA est dépendant du GM-CSF. Les patients ayant des mutations du récepteur au GM-CSF (GM-CSFR) présentent une réduction du nombre de MA matures, des concentrations élevées de surfactant à l'origine d'une protéinose alvéolaire et sont plus susceptibles de développer des infections pulmonaires. L'expression du *peroxisome proliferator activated receptor-gamma* (PPAR γ), induite par le GM-CSF, est essentielle pour le bon développement des MA et pour le catabolisme du surfactant (Garbi and Lambrecht, 2017). Chez le sujet sain, en l'absence de processus inflammatoire, le MA présente une activité de phagocytose beaucoup plus faible que les autres cellules de l'immunité innée. Dans cette situation, le MA est immuno-réprimé et présente une tolérance immunitaire contrôlée notamment par le récepteur *Signal Regulatory Protein alpha* (SIRP α) (Garbi and Lambrecht, 2017). Une fois activé par ses ligands CD47, SP-A (Surfactant Protein A) et SP-D (Surfactant Protein D), le récepteur SIRP α inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la phagocytose par les MA (Garbi and Lambrecht, 2017).

2- Le macrophage interstitiel (MI)

Le MI représente une population peu abondante de macrophages pulmonaires. Ils sont localisés au niveau de l'interstitium pulmonaire et sont en contact avec les CEA et les cellules endothéliales vasculaires (Garbi and Lambrecht, 2017; Liegeois et al., 2018). Contrairement au MA, les MI sont des cellules de petite taille. Leur morphologie est proche du monocyte circulant (Fathi et al., 2001). Le MI est peu étudié du fait d'une accessibilité réduite, et son ontogénie reste encore mal comprise. Néanmoins selon *Scott et coll (2014)*, à la naissance, les MI pourraient dériver de macrophages embryonnaires issus du sac vitellin « yolk sac » et de la différenciation de monocytes circulants d'origine médullaire (Scott et al., 2014). À l'âge adulte, le MI serait principalement différencié à partir du monocyte circulant (Liegeois et al.,

2018). À noter que ces MI possèdent une demi-vie plus courte que celle des MA (Cai et al., 2014). La figure 18 résume l'origine du macrophage pulmonaire.

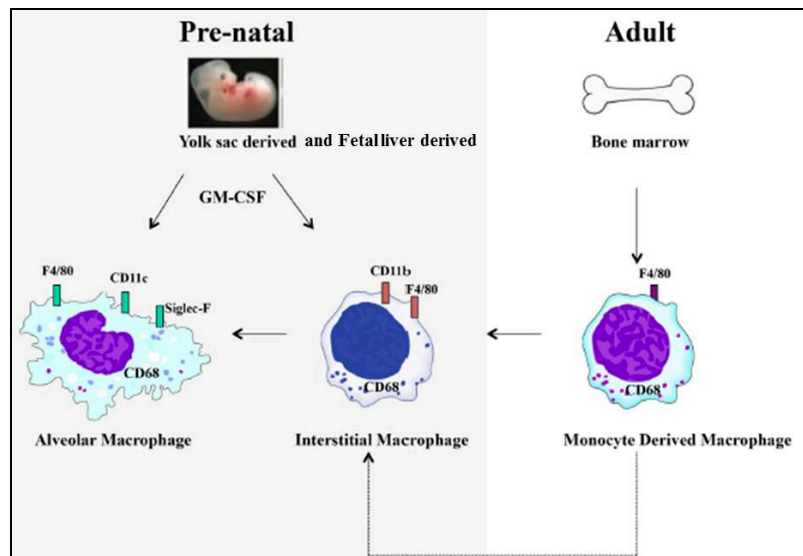


Figure 18: Ontogénie du macrophage pulmonaire (Byrne et al., 2015).

Le MI de souris est caractérisé par l'expression de CMHII (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), MerTK, CD64, CD206 et l'absence de l'expression de Siglec F. De plus ces macrophages expriment fortement CD11b (Byrne et al., 2016). Chez les humains sains, le MI est identifié par l'expression de HLA-DR, CD68, CD206 et CD11b (Byrne et al., 2016). Le MI représente une population très hétérogène. Une étude récente sur souris a suggéré que les MI identifiés comme MerTK⁺CD64⁺CD11b⁺CX3CR1⁺SiglecF⁻ peuvent être subdivisés en trois sous-types (Gibbins et al., 2017). Cette classification est définie selon leur niveau d'expression en CMHII, CD206, CCR2, Lyve-1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1), et CD11c. Ces populations sont nommées MI-3 (CMHII⁺CD206^{Lo}CCR2⁺Lyve-1⁻CD11c⁺), MI-2 (CMHII⁺CD206⁺CCR2⁻Lyve-1^{+/-}CD11c⁻) et MI-1 (CMHII^{Lo}CD206⁺CCR2⁻Lyve-1⁺CD11c⁻). Concernant la localisation, les auteurs suggèrent que les MI-3 se développent à proximité des monocytes et sont issus de la population monocyttaire tandis que les MI-1 et les MI-2 sont des macrophages plus matures. Le profil transcriptomique de ces populations suggère qu'elles représentent un continuum de la différenciation du MI, allant de l'infiltration du monocyte circulant (MI-3) au MI différencié mature (MI-1 et MI-2) (Gibbins et al., 2017). Cependant, selon Chakarov et coll (2019), il n'y aurait que deux sous populations de MI différenciées à partir des monocytes circulants. Leur classification serait déterminée selon l'expression de CMHII et de Lyve-1 :

une population CMHII^{Lo}Lyve-1^{Hi} et une autre CMHII^{Hi}Lyve-1^{Lo} (Chakarov et al., 2019). Les MI peuvent phagocyter les bactéries et autres microorganismes et possèdent une fonction immuno-régulatrice. En effet, ces cellules sécrètent davantage de cytokines que les MA, de nature pro-inflammatoire et immunosuppressive comme l'IL-10 (Liegeois et al., 2018). Les caractéristiques du MA et MI sont résumés dans le tableau 1.



Criteria	Interstitial Macrophages	Aveolar Macrophages
Morphology		
Origin	?	Yolk sac/fetal liver
Tissue location	Lung parenchyma	Airway lumen
Proliferation capacity	?	Yes
Surfactant processing	No	Yes
Antigen presentation	Good	Poor
Surface marker expression (murine)	MerTK ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{lo} CD64 ^{hi} MHC II ⁺ CD24 ⁻ CD206 ⁺	MerTK ⁺ CD68 ⁺ Siglec F ⁺ CD11b ^{lo} CD11c ⁺ CD64 ⁺ CD200R ⁺⁺ CD206 ⁺⁺
Surface marker expression (human)	CD68 ⁺ CD11b ⁺ HLA-DR ⁺⁺ CD206 ⁺ CD169 ⁻ CD11c ^{lo} CD206 ⁺	CD68 ⁺ CD11b ^{lo} HLA-DR ⁺⁺ CD206 ⁺⁺ CD169 ⁺ CD11c ⁺⁺ CD206 ⁺⁺
Phagocytosis	Good	Poor
Tolerogenic potential	Good	Good
Cytokine production	High	Low

Tableau 1: Résumé des caractéristiques du macrophage alvéolaire et du macrophage interstitiel (Byrne et al., 2016).

À l'âge adulte, et lors de l'exposition à différents agents chimiques, physiques et biologiques (polluants, particules et microorganismes), le tissu pulmonaire est rapidement infiltré par des monocytes de sang périphérique qui se différencient en MI et/ou MA au cours d'un processus inflammatoire (Morales-Nebreda et al., 2015) (voir figure 19).

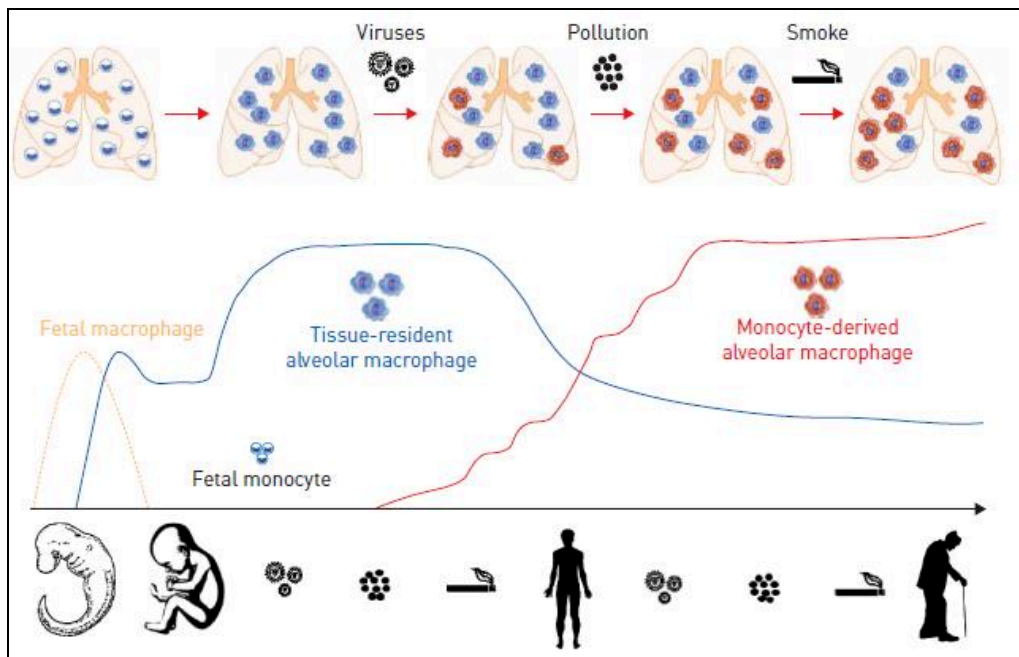


Figure 19: Développement du macrophage alvéolaire au cours de la vie

(Morales-Nebreda et al., 2015).

II- Le monocyte.

Les monocytes sont des cellules localisées au niveau du sang, de la moelle osseuse et de la rate. Morphologiquement, ils ont une forme cellulaire irrégulière avec un noyau en forme de « rein » et un ratio cytoplasme/noyau élevé. Ils constituent 10% des leucocytes totaux chez les humains et seulement 2-4% chez la souris. Le monocyte demeure dans le sang 1 à 2 jours, et en absence de dommage tissulaire induit par l'exposition à un agent pathogène, il est éliminé (Italiani and Boraschi, 2014). Le monocyte est originaire d'une cellule souche hématopoïétique (HSC) de la moelle osseuse. Cette dernière se différencie en précurseur commun myéloïde et lymphoïde dit ML-CFU (Myeloid and Lymphoid Cloning Forming Unit). En réponse au GM-CSF, le ML-CFU se différencie en précurseur commun des granulocytes et des macrophages dit GM-CFU (Granulocyte and Macrophage Cloning Forming Unit). Puis, sous l'action synergique des facteurs de croissance M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) et GM-CSF, le GM-CFU se différencie en progéniteur commun myéloïde M-CFU (Macrophage Cloning Forming Unit). En présence de M-CSF, le précurseur myéloïde se transforme ensuite en monoblaste et promonocyte avant d'atteindre le stade final de monocyte mature (Das et al., 2015) (voir figure 20). Ce monocyte est alors sécrété dans le sang et va circuler vers ses tissus cibles via l'action des chimiokines.

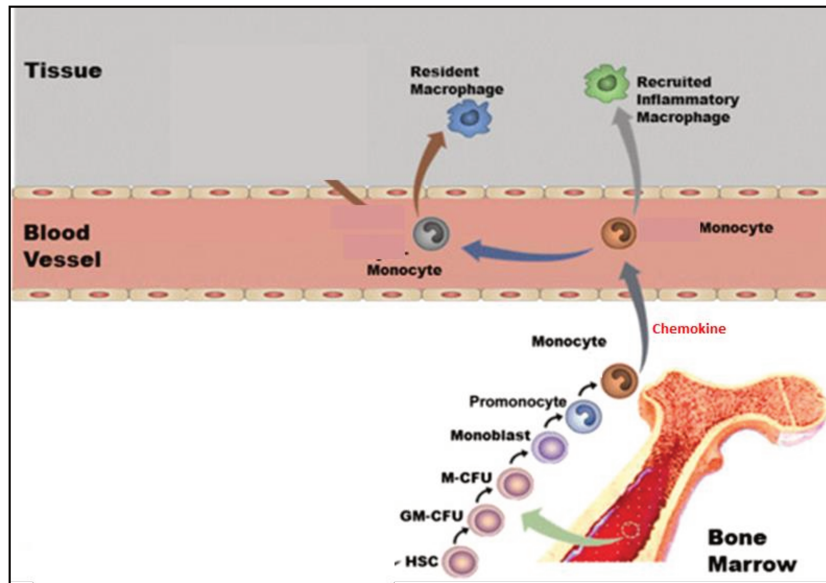


Figure 20: Origine, développement et recrutement du monocyte. Adapté selon (Das et al., 2015).

1- Les sous-populations monocytaires et leur implication dans la FPI

Le monocyte regroupe une population hétérogène. Chez la souris, on distingue deux classes de monocytes. D'une part, les monocytes classiques formés au niveau de la moelle osseuse et caractérisés par l'expression de l'antigène Ly6C ($Ly6C^{high}$). Ces monocytes migrent de la moelle osseuse vers le sang périphérique après stimulation par les chimiokines CCL2 (MCP-1) et CCL7. Le fibroblaste, la cellule épithéliale et la cellule endothéliale secrètent CCL2 (Florez-Sampedro et al., 2018). Ces monocytes classiques ont un phénotype pro-inflammatoire et sont généralement retrouvés durant la phase d'inflammation aiguë. D'autre part, les monocytes peuvent se différencier en monocytes non-classiques identifiés comme $Ly6C^{low}CX3CR1^{+}$ (CX3C-chemokine receptor 1) (Florez-Sampedro et al., 2018). Chez l'homme, le monocyte est classé selon son niveau d'expression en CD14 et en CD16 (récepteur au fragment constant des immunoglobulines G de type III ou Fc γ RIII). La sous-population majoritaire (85%) est dite classique : ces monocytes sont $CD14^{high}CD16^{-}$. La population mineure est subdivisée en monocyte intermédiaire $CD14^{high}CD16^{low}$ (5%) et en monocyte non classique $CD14^{low}CD16^{high}$ (10%) (voir figure 21). Comme chez la souris, le monocyte humain classique exprime le récepteur au CCL2 (CCR2) ($CCR2^{high}CX3CR1^{low}$) alors que les monocytes intermédiaires et non classiques sont $CCR2^{low}CX3CR1^{high}$. De façon similaire à ce qui se passe chez la souris, des études ont démontré que le monocyte classique humain peut se différencier, sous l'action du M-CSF, en monocyte intermédiaire puis non classique (Florez-Sampedro et al., 2018).

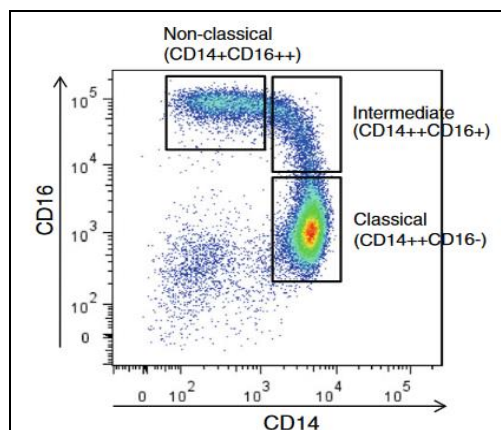


Figure 21: Sélection des trois sous-populations de monocytes humains selon leur expression relative en CD14 et CD16 (Wong et al., 2012).

Le rôle physiologique de chacune de ces sous-populations de monocytes n'est pas complètement défini. Ces cellules pourraient avoir des fonctions différentes dans les processus de défense immunitaire et de réparation tissulaire (Wong et al., 2012). En général, les monocytes classiques et intermédiaires ont des propriétés inflammatoires alors que le monocyte non classique (dite aussi patrouilleur) est doté de propriétés de surveillance (Italiani and Boraschi, 2014). Contrairement au monocyte patrouilleur, la forte expression de CCR2 chez le monocyte inflammatoire lui permet de migrer facilement au niveau des sites inflammatoires.

Subset	Markers	Chemokine receptors	Main functions
Human			
Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{high} CX3CR1 ^{low}	Immune response Phagocytosis
Intermediate	CD14 ⁺⁽⁺⁾ CD16 ⁺	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{high}	Proinflammatory Wound healing
Nonclassical	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{high}	Patrolling role Fibrosis
Mouse			
Classical/intermediate (*)	Ly6C ⁺ CD11b ⁺ CD115 ⁺	CCR2 ^{high} CX3CR1 ^{low}	Proinflammatory Phagocytosis
Nonclassical	Ly6C ⁻ CD11b ⁺ CD115 ⁺	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{high}	Patrolling Tissue repair

Tableau 2: Résumé des caractéristiques des sous-populations monocytaires (Sprangers et al., 2016).

Dans le contexte de la fibrose pulmonaire, des études montrent l'implication du monocyte classique Ly6C^{high}. *In vivo*, Ji et coll ont noté l'augmentation du taux de monocytes circulant Ly6C^{high} trois jours après l'administration de bléomycine chez la souris, puis une augmentation du taux de MA (F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺) et de MI (F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺) durant la phase fibrotique (Ji et al., 2014). La déplétion des monocytes classiques

Ly6C^{High}CD11b⁺CD115(CSF1R)⁺ du sang périphérique par le clodronate réduit la concentration des macrophages pulmonaires et l'intensité de la fibrose pulmonaire. Inversement, le transfert de cette population de monocytes inflammatoires après l'administration d'une faible concentration de bléomycine exacerbe la fibrose pulmonaire (Gibbons et al., 2011). De façon similaire, l'administration de spironolactone prévient le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en diminuant l'expansion des monocytes Ly6C^{high} et le nombre de macrophages F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺ activés au niveau alvéolaire (Ji et al., 2013). Enfin, le Pentraxin (Serum amyloid P), une nouvelle stratégie thérapeutique envisagée pour la FPI (Raghu et al., 2018b), réduit *in vivo* la fibrose pulmonaire induite par le TGFβ1 (Murray et al., 2011) et semble être un inhibiteur puissant de la différenciation du monocyte en macrophage (Moreira et al., 2010).

Concernant le rôle de la chimiokine CCL2 dans la fibrose pulmonaire, les souris déficientes en CCR2 présentent moins d'accumulation de monocytes classiques Ly6C^{high} et de macrophages CD68⁺ au niveau du tissu pulmonaire et développent moins de fibrose pulmonaire en réponse à la bléomycine (Baran et al., 2007; Osterholzer et al., 2013). La concentration de CCL2 est plus élevée dans les LBA de patients atteints de FPI que chez des sujets contrôle, ce qui suggère une possible augmentation de l'infiltration pulmonaire des monocytes chez ces malades (Suga et al., 1999). Cependant le traitement de ces patients par le Carlumab, un anticorps monoclonal dirigé contre CCL2, ne prévient pas le déclin de la CVF ou de la DLco, et n'augmente pas la durée de survie (Raghu et al., 2015). L'analyse des monocytes circulants de 35 patients atteints de FPI montre une association positive entre l'augmentation des sous-classes intermédiaires et non classiques de monocytes (CD14^{high}CD16^{High}) et la progression de la maladie (Moore et al., 2014). De plus, selon *Yu et coll*, chez les patients FPI, 28 % des MA et 17% des MI maintiendraient une forte expression du marqueur monocyttaire CD14 (Yu et al., 2016).

2- La différenciation du monocyte en macrophage: rôle du M-CSF

Une fois dans le sang, le monocyte peut circuler pendant 1 à 3 jours avant de migrer vers le tissu pulmonaire endommagé où il se différencie en MI. Cette différenciation est assurée principalement par le M-CSF (ou CSF-1, Colony Stimulating Factor-1), un facteur de croissance hématopoïétique sécrété par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les macrophages, les cellules stromales et les ostéoblastes (Hamilton, 2008; Pixley and Stanley, 2004) (voir figure 22). Sa concentration sérique est détectable chez le sujet sain et est estimée à environ 10 ng/ml (Hume and MacDonald, 2012).

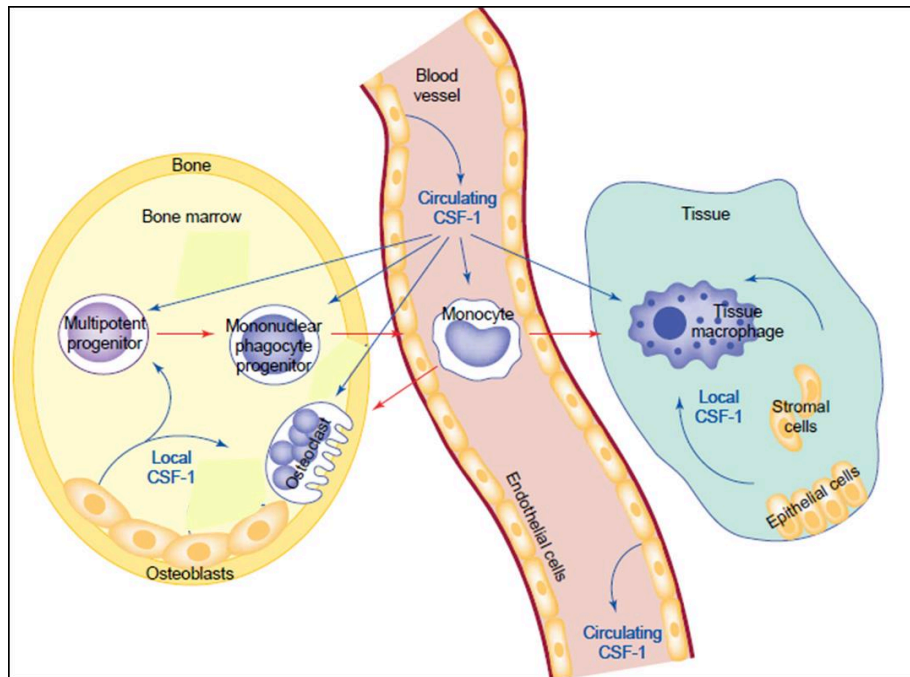


Figure 22: Régulation du développement du macrophage par le CSF-1. Adapté selon

(Pixley and Stanley, 2004).

Le CSF-1 exerce ses effets via le récepteur CSF-1R (Colony Stimulating Factor-1 Receptor). Au niveau hématopoïétique, ce récepteur est exprimé fortement par le monoblaste, le promonocyte, le monocyte, le macrophage et faiblement par la HSC (Pixley and Stanley, 2004; Stanley and Chitu, 2014). Le CSF-1R est un récepteur à tyrosine kinase homodimérique de type III de la famille des PDGF (Stanley and Chitu, 2014). Il est codé par le proto-oncogène *c-fms*. Ce dernier est localisé au niveau du chromosome 5 chez l'homme et au niveau du chromosome 18 chez la souris (Stanley and Chitu, 2014). Au niveau structural, le CSF-1R est une protéine transmembranaire, constituée d'une région extracellulaire fortement glycosylée et formée de cinq domaines d'immunoglobulines, d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire. Cette dernière est constituée d'un domaine juxta-membranaire (JMD) et d'un domaine intracellulaire à tyrosine kinase interrompue par un domaine d'insertion des kinases (Pixley and Stanley, 2004) (voir figure 23).

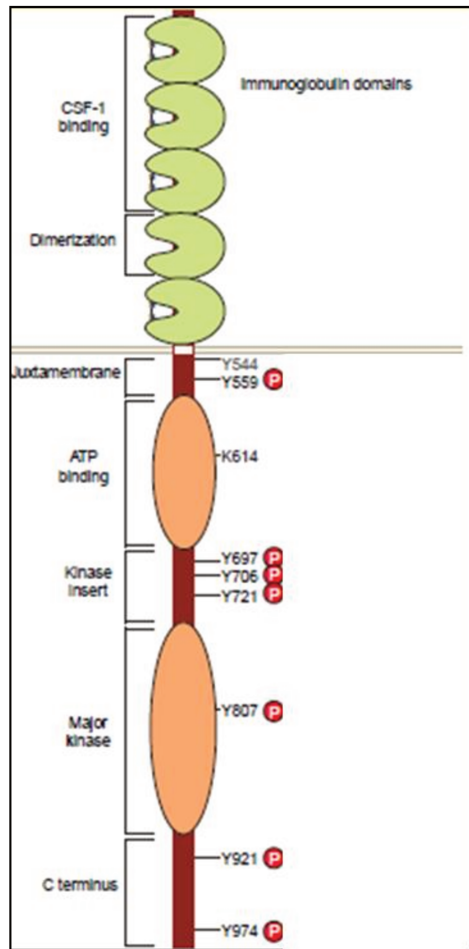


Figure 23: Structure du CSF-1R. Adapté selon (Pixley and Stanley, 2004).

La fixation du CSF-1 à son récepteur engendre son autophosphorylation sur plusieurs tyrosines. Chez la souris, on note la présence de huit tyrosines phosphorylées. La phosphorylation de ces tyrosines génère une plateforme de liaison de plusieurs protéines intracellulaires, qui secondairement contrôle l'activation de différentes voies de signalisation. Il est bien établi que la phosphorylation de la Tyr-559 (correspondant à la Tyr-561 chez l'homme) induit l'activation de la famille des kinases Src (SFK) et de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) ERK5 (Extracellular signal regulated kinase). La phosphorylation de Tyr-721 active la voie PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase)/Akt (Stanley and Chitu, 2014). Le complexe CSF-1/CSF-1R joue un rôle central durant l'hématopoïèse et contrôle la différenciation du monocyte en macrophage. Les souris déficientes en CSF-1R présentent une diminution des concentrations de monocytes et de macrophages (Pixley and Stanley, 2004). Le complexe CSF-1R/phospho-Tyr559/SFK initie l'activation de STAT3 et induit la phosphorylation d'ERK1 et ERK2 dont le rôle est central dans la différenciation myéloïde (myéloblaste, monoblaste et le pro-monocyte) chez la souris. La survie et la prolifération du

macrophage au niveau du tissu cible dépend de la voie PI3K/Akt induite par le complexe CSF-1/CSF-1R (Stanley and Chitu, 2014).

Chez les humains, le CSF-1R induit la différenciation des HSC vers la lignée monocyttaire via l'induction du facteur de transcription myéloïde PU.1. Au niveau du monocyte, le complexe CSF-1/CSF-1R engendre l'activation des kinases PI3K/Akt et ERK1/ERK2, de manière cyclique et corrélée à la phosphorylation/déphosphorylation de CSF-1R Tyr-723. Ces vagues successives d'activation d'Akt augmentent l'amplitude et la durée de la phosphorylation/déphosphorylation et sont essentiels pour l'activation des caspases 8 et 3. Le clivage de la nucleophosmine (NPM) par ces caspases contribue à la différenciation des monocytes en macrophages (Jacquel et al., 2009). Le rôle d'ERK1/2, qui n'est pas nécessaire au clivage de la nucleophosmine, reste cependant à définir plus précisément dans le processus de différenciation (Stanley and Chitu, 2014) (voir figure 24).

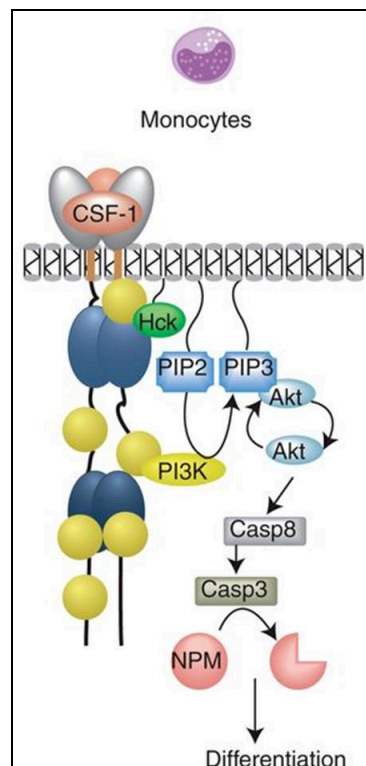


Figure 24: La signalisation CSF-1/CSF-1R durant la différenciation macrophagique

(Stanley and Chitu, 2014).

La migration cellulaire au sein des tissus est une fonction essentielle du macrophage mature. Le complexe CSF-1/CSF-1R contrôle cette propriété via la régulation des complexes focaux des macrophages. Ces complexes contiennent des protéines similaires à celles

détectées dans les complexes focaux du fibroblaste, telles que les intégrines, la vinculine et la paxilline. Cette dernière est phosphorylée par la kinase Pyk-2 (Paxillin-associated tyrosine kinase) qui est elle-même activée par le complexe CSF-1/CSF-1R (Pixley and Stanley, 2004). Les souris déficientes en Pyk-2 ont une altération de leur mobilité cellulaire et de leur polarité (Okigaki et al., 2003). Inversement, la surexpression de PTP ϕ (Protein Tyrosine Phosphatase phi) augmente son association avec Pyk-2, puis engendre la déphosphorylation de la paxilline. Ces réactions induisent une diminution de la formation des complexes focaux et de l'adhérence cellulaire, et au final favorisent la mobilité des macrophages (Pixley and Stanley, 2004). La voie CSF-1R-pTyr-721/PI3K régule l'adhérence des macrophages en contrôlant la phosphorylation de la paxilline et l'expression de PTP ϕ (Stanley and Chitu, 2014). En résumé le complexe CSF-1/CSF-1R est essentiel pour la différenciation du monocyte en macrophage, la prolifération, la survie, la migration et l'adhérence cellulaire (voir figure 25).

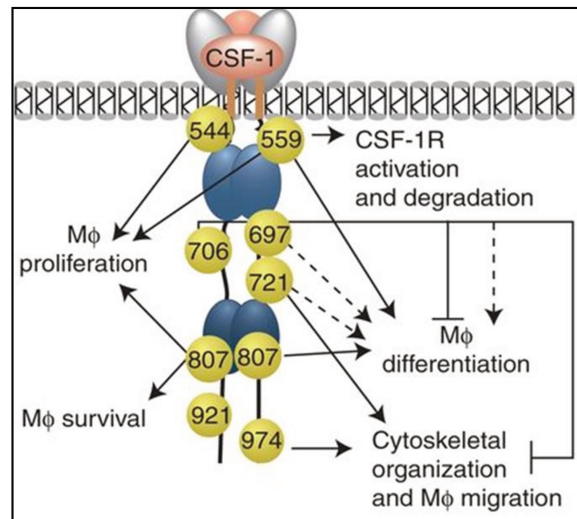


Figure 25: Fonctions induites par l'activation du complexe CSF-1/CSF-1R (Stanley and Chitu, 2014).

Au cours du processus de fibrose pulmonaire chez la souris, le CSF-1 sécrété par le fibroblaste est un facteur de croissance essentiel pour la prolifération des MA (Lehnert et al., 1994). En réponse à l'administration de bléomycine, les souris déficientes en CSF-1 présentent un recrutement des cellules phagocytaires CD68⁺, un dépôt de collagène et une expression de CTGF (Connective Tissue Growth Factor) au niveau du tissu pulmonaire plus faibles que ceux détectés chez la souris sauvage. L'absence de CSF-1 dans ce modèle murin réduit l'intensité de la fibrose pulmonaire. Par ailleurs, la stimulation des macrophages humains et de souris par le CSF-1 stimule la production de CCL2, et l'administration intra-trachéale de CSF-1 chez la souris induit la sécrétion de CCL2 dans les liquides des LBA

(Baran et al., 2007). De plus, les sujets atteints de FPI présentent des concentrations de CSF-1 et de CCL2 dans les liquides de LBA plus élevées que celles mesurées dans les LBA de sujets non malades, ce qui suggère que ces deux cytokines peuvent également contribuer au développement de la fibrose pulmonaire chez les humains (Baran et al., 2007).

Au total, le complexe CSF-1/CSF-1R joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire innée en promouvant la survie, la prolifération et la migration des macrophages, mais également en favorisant leur propriété de phagocytose et en augmentant leur capacité de synthèse de cytokines. Le profil des cytokines produites est un élément essentiel pour caractériser la polarisation des macrophages en cellules pro-inflammatoires M1 ou pro-fibrotique M2 (Hamilton et al., 2014). Ces deux types de macrophages jouent un rôle important durant le processus de fibrose pulmonaire. Ce concept de polarisation macrophagique est décrit de façon détaillé dans le paragraphe suivant.

III- Polarisation des macrophages

Les macrophages jouent un rôle indispensable dans le système immunitaire inné et adaptatif. Durant la réponse innée, le macrophage assure la défense contre l'agent pathogène et régule l'infiltration des leucocytes. De plus, il collabore avec les LT et LB par une communication cellulaire directe ou via un mécanisme qui engage des cytokines, des chimiokines, des radicaux libres et des métabolites (Gordon, 2003). Le macrophage joue un rôle important de l'initiation à la résolution de la réponse immunitaire adaptative. Sa fonction dépend du phénotype qu'il acquiert, c'est-à-dire sa polarisation, suite aux différents signaux générés par son microenvironnement tissulaire (Mantovani et al., 2005). La polarisation du macrophage peut conduire à un phénotype pro-inflammatoire ou pro-fibrosant contrôlant respectivement une altération tissulaire ou bien une régénération et une cicatrisation tissulaire.

Historiquement les LT ont été considérés comme jouant le rôle central de la réponse immunitaire, tandis que les macrophages étaient classés comme des cellules effectrices de la réponse inflammatoire. En 1986, *Mossmann Coffman et coll* ont démontré que les LT de souris peuvent être classés en sous-types Th1 et Th2. Cette classification est basée selon la capacité des cellules Th1 et Th2 à sécréter respectivement de l'IFN- γ et de l'IL-4 (Mosmann et al., 1986). Ces deux cytokines ont des effets opposés sur le système immunitaire générant ainsi ces réponses dénommées de type Th1 ou Th2 (Mosmann and Coffman, 1989a, 1989b). Même si les macrophages sont exclus de ce concept Th1/Th2, leur rôle dans cette balance n'est pas nul. En effet, ils sécrètent de l'IL-12 ou de l'IL-10 qui favorisent respectivement l'orientation des réponse de type Th1 ou Th2 (Gordon, 2003). Cette capacité des macrophages à produire

majoritairement de l'IL-12 ou de l'IL-10 a donné naissance au concept de la polarisation M1/M2 (Mantovani et al., 2004, 2005; Mills et al., 2000). L'IFN- γ sécrété par les cellules Th1 et les cellules NK promeut la polarisation M1 « classique » des macrophages qui présentent alors un phénotype pro-inflammatoire de type Th1. A l'inverse, l'IL-4 et l'IL-13 induisent une polarisation « alternative » M2 donnant naissance à des macrophages inflammatoires de type Th2 (Gordon, 2003). Cependant, selon le microenvironnement auquel les macrophages sont exposés, cette polarisation M2 peut-être orientée vers différents sous-types plus finement différenciés. Ainsi, Mantovani a proposé en 2004 que les macrophages soient polarisés en cellules pro-inflammatoires (« classiques ») de type M1, lorsqu'ils sont stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) seul ou en association avec l'IFN- γ , et en cellules de type M2a (« alternatifs », de type Th2, pro-fibrosants), M2b (« immunorégulateurs », impliqués dans la réparation tissulaire) et M2c (plus anti-inflammatoires et pro-fibrosants) en réponse à divers stimuli (Mantovani et al., 2004) (figure 26).

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser aux macrophages M1 et M2a, deux sous-types impliqués dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire.

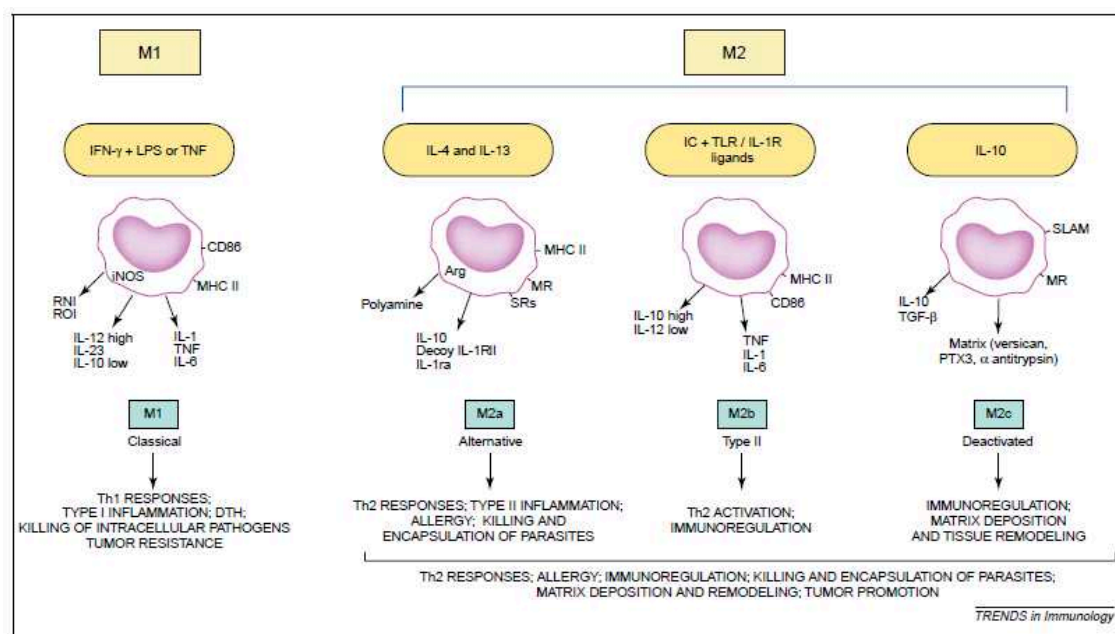


Figure 26: Inducteurs et propriétés fonctionnelles des différentes populations du macrophage polarisé (Mantovani et al., 2004).

1- Le macrophage pro-inflammatoire type M1

Les macrophages M1 classiques sont impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire médiée par des signaux impliquant l'IFN- γ et le LPS. Ces macrophages sont caractérisés par leur sécrétion de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-12 et IL-6 notamment) et de chimiokines (CXCL10 et CXCL11) pro-inflammatoires. De plus, les macrophages M1 présentent une forte expression du CMHII et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Fonctionnellement, les M1 présentent une forte activité d'endocytose et de phagocytose permettant de dégrader l'agent pathogène capturé. Cette activité antimicrobienne est contrôlée par plusieurs mécanismes comme l'acidification du phagosome, la synthèse des ERO et la libération du NO à partir de la L-arginine via l'activité catalytique de l'enzyme iNOS (Martinez et al., 2008).

L'IFN- γ est la principale cytokine polarisant le macrophage en cellule M1. Il est produit par les cellules NK, les lymphocytes CD4⁺ Th1 et les lymphocytes T CD8⁺, et il est faiblement sécrété par les LB. Le LPS, un composé membranaire majeur des bactéries à gram négatif, active également le macrophage et induit son phénotype M1 (Guha and Mackman, 2001). Le LPS présente une structure moléculaire PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) lui permettant de se fixer sur des récepteurs spécifiques de type PRR (Pattern Recognition Receptor) appelés TLR (Arora et al., 2019).

1.1- Les TLR (Toll Like Receptor)

Les TLR jouent un rôle critique dans la réponse immunitaire innée en fixant, non seulement les structures PAMP des agents pathogènes mais également des molécules DAMP (Danger Associated Molecular Pattern) de diverses natures tels que des acides nucléiques (ADN), des fragments d'organites libérés par la cellule en nécrose, de l'ATP ou du collagène (Arora et al., 2019). Il existe dix TLR conservés et fonctionnels chez l'homme (TLR1-TLR10) et douze TLR chez la souris (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) (Arora et al., 2019).

Au niveau pulmonaire, les MA expriment faiblement les TLR3, TLR5 et TLR9 et plus fortement le TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 et le TLR8 (Arora et al., 2019). Au niveau cellulaire, Les TLR sont localisés sur la membrane cellulaire ou au niveau d'organites intracellulaires (endosome, lysosome, endolysosome, et RE) pour les TLR3, 7, 8, et 9 (Margaritopoulos et al., 2017). Le TLR2 forme un complexe hétérodimérique avec le TLR6 ou le TLR1 afin de reconnaître respectivement les lipoprotéines di-acétylées et les lipoprotéines tri-acétylées exprimées par les bactéries à gram positif. Le TLR5 reconnaît une protéine des flagelles

bactériens nommée la flagelline. Les TLR 3,7, et 8 sont impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux à double brins (TLR3) et à simple brins d'ARN (TLR7, TLR8). Le TLR9 reconnaît les nucléotides CpG non méthylés retrouvés au niveau du génome bactérien ou viral (Margaritopoulos et al., 2017), alors que le TLR4 a pour ligand le LPS (voir figure 27). De plus, le TLR4 reconnaît d'autres composés pathogènes tels que les polymères d'acide manuronique des bactéries à gram négatif, l'acide teichuronique des bactéries à gram positif, les composés viraux telle que la F-protéine. En plus de ces composés exogènes, le TLR4 peut se lier à plusieurs molécules endogènes de type DAMP tels que les protéines HSP (Heat Shock protein) et ED-A (fibronectine type III extra domain), et certains acides gras saturés comme le mmLDL (minimal modified Low Density Lipoprotein). De nombreuses molécules libérées lors des processus de nécrose tissulaire peuvent stimuler le récepteur TLR4 et induire une réponse inflammatoire stérile (Vaure and Liu, 2014).

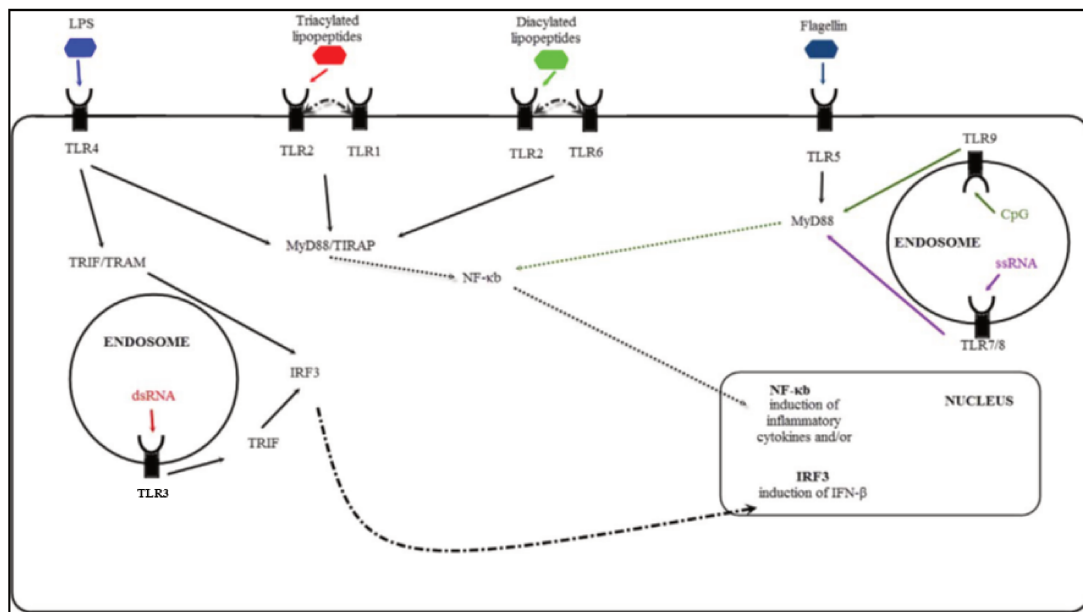


Figure 27: Localisation et ligands des TLR (Margaritopoulos et al., 2017).

Tous les TLR sont constitués d'un domaine extracellulaire LRR (Leucin Rich Repeat) permettant la reconnaissance du ligand et d'un domaine intracellulaire TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor like) (Takeda and Akira, 2004). Structuellement, le TLR4 forme un complexe extracellulaire avec d'autres protéines qui assurent sa liaison avec le LPS. Ainsi, le LPS associé à la LBP (LPS Binding Protein) peut se fixer au CD14, une protéine membranaire qui forme un co-récepteur avec le TLR4. La liaison du LPS au CD14 favorise son interaction

avec la protéine MD-2 (Myeloid differentiation factor 2) puis sa fixation à la partie extracellulaire du TLR4 qui est alors activée (Vaure and Liu, 2014) (voir figure 28).

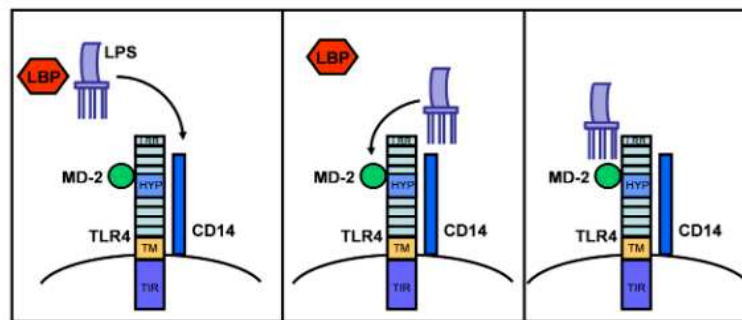


Figure 28: Interaction du LPS, via LBP, avec le complexe CD14/MD-2/TLR4 (Vaure and Liu, 2014).

1.1.a- La signalisation commune des TLR

Suite à la fixation du ligand à son récepteur TLR, quatre protéines adaptatrices contenant le domaine TIR peuvent être recrutées : MyD88 (Myeloid differentiation factor 88), Mal (MyD88 adapter like) également dénommée TIRAP (TIR domain containing adapter protein), TRIF (TIR domain containing adapter protein interferon- β) également dénommée TICAM-1 (TIR domain adapter molecule-1) et TRAM (TRIF related adapter molecule) également dénommée TIRP (TIR containing protein) ou TICAM-2 (TIR containing adapter molecule-2). Le TLR4 active deux voies de signalisation majeures : la voie dépendante de MyD88 nommée MyD88-TIRAP, et la voie indépendante de MyD88 mais dépendante de TRIF nommée TRIF-TRAM. Cette seconde voie de signalisation est activée lors de la translocation du TLR4 activé vers le compartiment endosomal (Vaure and Liu, 2014).

1) La voie dépendante de MyD88

MyD88 est une protéine adaptatrice constituée d'un domaine TIR au niveau C-terminal permettant de se lier au TLR et d'un domaine de mort au niveau N-terminal permettant de lier le TLR à la protéine IRAK (IL1 Receptor Associated Kinase) (Takeda and Akira, 2004). IRAK4 phosphoryle IRAK1 qui recrute et active alors TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor) au niveau du complexe récepteur. Le complexe IRAK1/TRAF6 se dissocie du récepteur et se lie à la membrane avec TAK1 (TGF β Activated Kinase 1), TAB1 et TAB2 (TAK1 Binding Protein). IRAK1 reste au niveau membranaire où il sera dégradé, alors que le complexe TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 se dirige vers le cytoplasme où il s'associe avec d'autres protéines telles que Ubc13 et Uev1 (E2 ligase). Ce large complexe multiprotéique

active TAK1 qui à son tour phosphoryle et stimule le complexe IKK (Inhibitor of κ B Kinase) et la MAPK JNK. Ces voies de signalisation plus distales contrôlent respectivement l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Activated protein-1) (Takeda and Akira, 2004) (voir figure 29). NF- κ B et AP-1 induisent l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-1 β , IL-6 et l'IL-8 (Tugal et al., 2013).

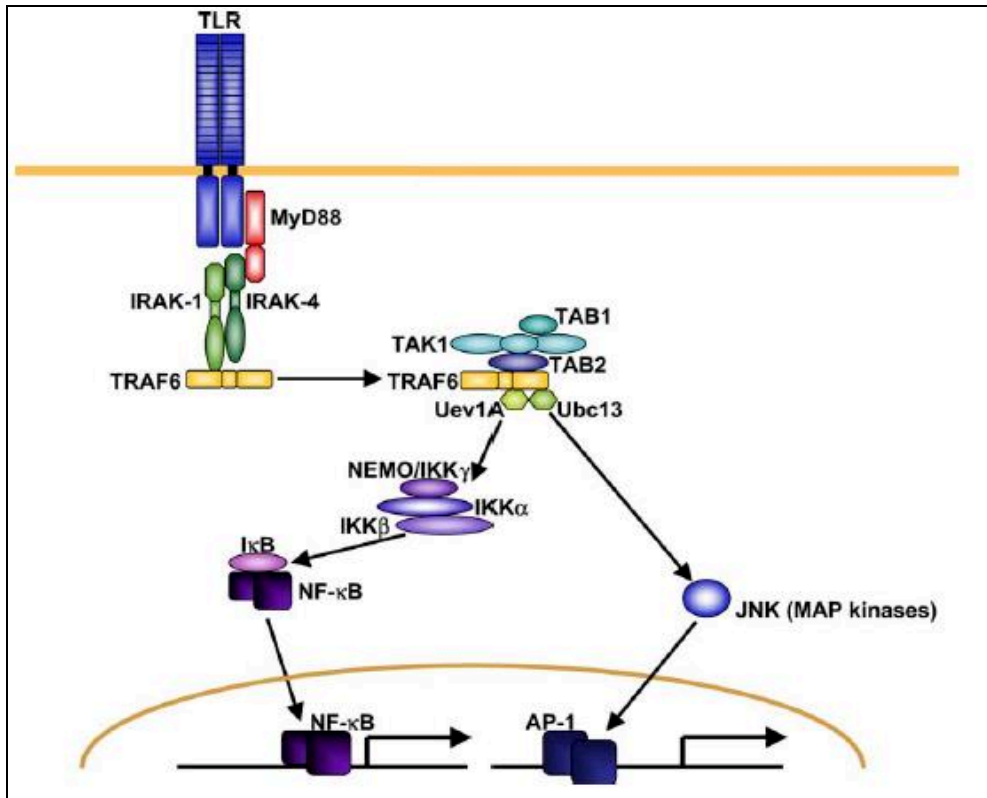


Figure 29: La voie dépendante de MyD88 induite par le TLR (Takeda and Akira, 2004).

2) La voie indépendante de MyD88 et dépendante de TRIF

L'internalisation du TLR4 dans les endosomes active la voie TRIF-TRAM et le facteur de transcription IRF-3 (IFN Regulatory Factor 3) via TBK1 (TANK Binding Kinase 1) et IKK ϵ /IKK ι (I κ B kinase). Au final, cette voie stimule l'expression de gènes codant des cytokines majeures telles que les IFN de type I (IFN- α et - β) (Takeda and Akira, 2004). Plus tardivement, le complexe TRIF-TRAM active également la voie de signalisation NF- κ B mais aussi les MAPK JNK et p38-kinases (Häcker et al., 2011) (voir figure 30). Ainsi, les deux voies dépendante et indépendante de MyD88 activent le facteur de transcription NF- κ B (Tugal et al., 2013).

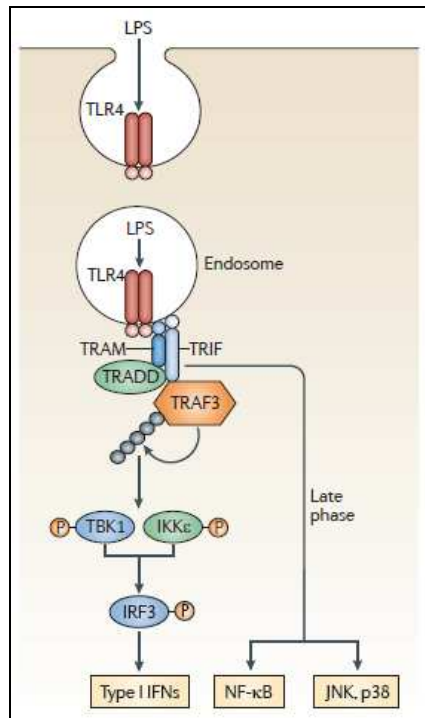


Figure 30: La voie dépendante de TRIF induite par le TLR (Häcker et al., 2011).

Une fois sécrétés, les IFN- α et - β vont se fixer sur leurs récepteurs IFNAR (Interferon Receptor) couplés à la signalisation JAK/STAT. Le récepteur activé recrute d'abord les protéines adaptatrices JAK1 (Janus Kinase 1) et Tyk2 (Tyrosine Kinase 2). Ces dernières phosphorylent les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription) qui forment alors un hétérodimère et migrent vers le noyau. Le dimère recrute IRF-9 (IFN Regulatory Factor 9) pour former le complexe ISGF3 (IFN Stimulated Gene Factor 3) qui se lie à l'ADN et induit l'expression de gènes codant des protéines d'action antivirale. L'IFN- α et - β peuvent aussi induire la formation d'un homodimère STAT1 qui à son tour induit l'expression des gènes pro-inflammatoires (Ivashkiv and Donlin, 2014). De la même façon, l'IFN- γ induit la phosphorylation et la dimérisation de STAT1 qui recrute à son tour IRF-3. Le complexe STAT1/IRF-3 induit l'expression de chimiokines telles que CCL2, CCL5 et CXCL10 (Biswas et al., 2012). De plus, l'IFN- γ contrôlent l'expression des gènes codant des récepteurs de cytokines (CSF2RB, IL-15R, IL-12R, IL-6R), des marqueurs d'activation (CD36, CD38, CD69, CD97) et des molécules d'adhérence cellulaire telles que ICAM1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) et ITGAL (integrin alpha 1) (Martinez and Gordon, 2014).

1.2- La signalisation NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)

NF- κ B représente une famille de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires, notamment dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Elle comporte cinq sous-unités actives : p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), RelA (p65), RelB et c-Rel (Liu et al., 2017b). A l'état basal, le facteur de transcription NF- κ B est inactif et est séquestré au niveau du cytoplasme par les protéines inhibitrices de la famille I κ B (Inhibitor of NF- κ B). Deux voies de signalisation majeures aboutissent à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B. Il s'agit de la voie canonique classique et de la voie non-canonique dite aussi alternative, qui toutes deux régulent la réponse immunitaire et inflammatoire (Liu et al., 2017b).

La voie canonique est activée par les ligands des récepteurs de différentes cytokines (TNF- α , IL-1 β) et ceux des PRR, notamment le LPS. Cette voie est initiée secondairement à la dégradation d'I κ B α lors de sa phosphorylation par le complexe I κ B-kinase (IKK). Ce complexe est composé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO, NF- κ B Essential Modulator). Le complexe IKK peut être activé par des cytokines, des facteurs de croissances, des composés microbiens et des agents de stress cellulaire. Après activation, IKK phosphoryle I κ B α , ce qui favorise sa conjugaison à des résidus d'ubiquitine et son adressage au protéasome où cette protéine inhibitrice est dégradée. L'élimination d'I κ B α permet alors la translocation nucléaire des sous-unités NF- κ B canoniques sous forme de dimères, tels que p50/RelA et p50/C-Rel (Liu et al., 2017b).

Contrairement à la voie canonique, la voie non-canonique est activée par un nombre restreint de stimuli appartenant à la superfamille des TNFR (Tumor Necrosis Factor-Receptor), telles que les protéines LT β -R (Lymphotoxin β Receptor), BAFF-R, et CD40. De plus, cette voie ne requiert pas la dégradation d'I κ B α mais celle de NF- κ B2/p100. La molécule centrale de cette signalisation est NIK (NF- κ B Inducing Kinase, MAP3K14) qui coopère avec IKK α afin de phosphoryler p100 puis d'induire son ubiquitination et son clivage sous sa forme mature p52. Cette sous-unité peut se dimériser avec la protéine RelB et migrer dans le noyau pour réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Liu et al., 2017b). La figure 31 résume l'ensemble des deux voies de signalisation NF- κ B. Il est important de noter que la voie canonique contrôle l'expression de p100 et de RelB et qu'elle régule donc positivement la voie non-canonique.

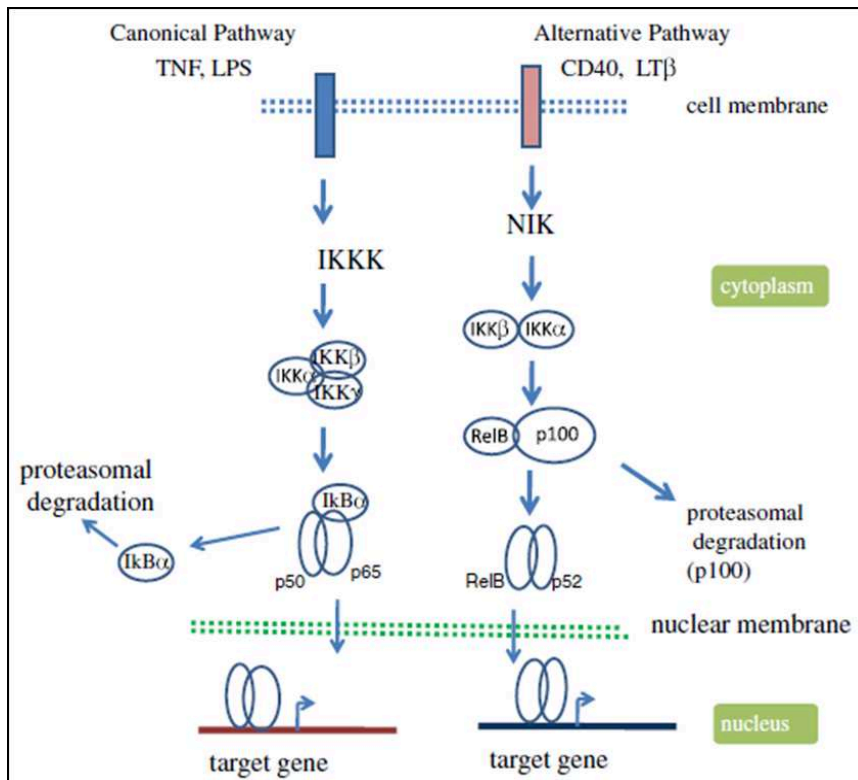


Figure 31: Les voies de signalisation canonique (classique) et non-canonique (alternative) de NF-κB.

Adapté selon (Pal et al., 2014).

Fonctionnellement, la voie NF-κB canonique est impliquée dans la réponse immunitaire tandis que la voie NF-κB non canonique est considérée comme un axe de signalisation supplémentaire qui coopère avec la voie canonique afin de réguler des fonctions spécifiques du système immunitaire adaptatif (Liu et al., 2017b). La voie NF-κB canonique induit l'expression de très nombreux gènes codant des protéines impliquées dans le processus pro-inflammatoire. Il s'agit de cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α, GM-CSF, IL-4, IL-5), de chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1α), de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin) (Bonizzi and Karin, 2004) et d'enzymes telle que iNOS (Bonizzi and Karin, 2004). La voie NF-κB non canonique contrôle principalement l'expression de gènes codant les chimiokines CXCL13 (B Lymphocyte Chemoattractant, BLC), SLC (Secondary Lymphoid tissue Chemokine, CCL21), SDF-1 (Stromal cell Derived Factor 1α, CXCL12) et ELC (Epstein-Barr virus-induced molecule 1 Ligand CC Chemokine, CCL19) qui sont impliquées dans le développement et le maintien des organes lymphoïdes secondaire (Bonizzi and Karin, 2004). Les principales caractéristiques du macrophage M1 et des voies de signalisation impliquées dans sa polarisation sont résumées dans la figure 32.

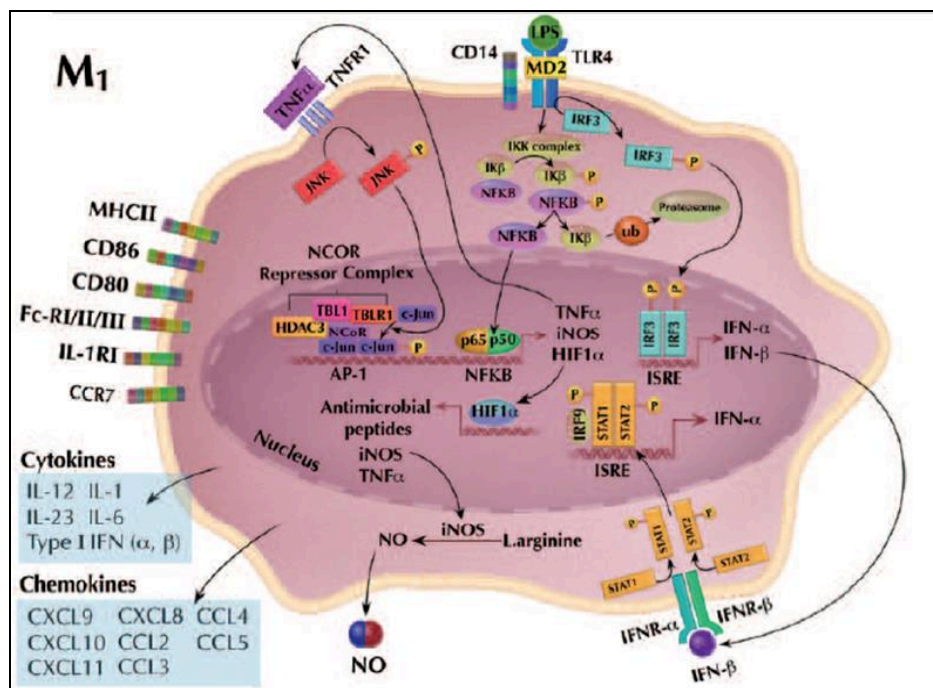


Figure 32: Voies de signalisation contrôlant la polarisation du macrophage M1 (Tugal et al., 2013).

1.3- Rôle des cytokines et des chimiokines M1 dans le développement de la FPI

Des cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans la physiopathologie de la FPI. Dans cette partie nous allons nous intéresser au rôle du TNF- α , IL-1 β , IL-10 et CXCL13.

1.3.a- *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)*

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée par différents types cellulaires dont le macrophage M1 et le MA. Chez l'homme, on distingue les formes membranaire et soluble du TNF- α . A l'issue de sa traduction, la protéine TNF- α est exprimée au niveau de la membrane plasmique. Cette forme membranaire subit un clivage protéolytique par une MMP nommée TACE (TNF- α Conserving Enzyme, ADAM 17) qui produit la forme soluble du TNF- α . L'action du TNF- α s'effectue via ces deux récepteurs, le TNF-R1 (p55 ou p60) et le TNF-R2 (p75 ou p80). Le TNF-R1 est présent sur de nombreux types cellulaires tandis que l'expression de TNF-R2 est fortement régulée et restreinte aux cellules immunitaires et notamment aux macrophages (Parameswaran and Patial, 2010).

Une fois sécrété, le TNF- α , sous forme homotrimérique, se lie au domaine extracellulaire du TNF-R1, ce qui libère la protéine inhibitrice SODD (Silencer of Death Domain) du domaine intracellulaire du TNF-R1 et permet le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). La protéine TRADD sert de plateforme

auxquelles s'associent les protéines adaptatrices RIP-1 (Receptor Interacting Protein-1, encore appelé RIPK1), TRAF2 (TNFR Associated Factor 2) et les protéines anti-apoptotiques cIAP-1 et cIAP-2 (inhibitor of cellular Apoptosis protein) (Borghi et al., 2016; Parameswaran and Patial, 2010). Ce complexe multiprotéique s'engage alors dans l'activation de différentes voies de signalisation conduisant notamment à l'expression de gènes codant d'autres protéines inflammatoires. Cette fonction « pro-inflammatoire » du TNF-R implique la voie canonique NF- κ B via l'activation d'IKK par la protéine RIPK1 et dans une moindre mesure l'activation de la MAPK JNK (voir figure 33). Concernant TNF-R2, son activation prolongée engendre la dégradation de TRAF2 et l'activation de la voie non canonique NF- κ B (Borghi et al., 2016).

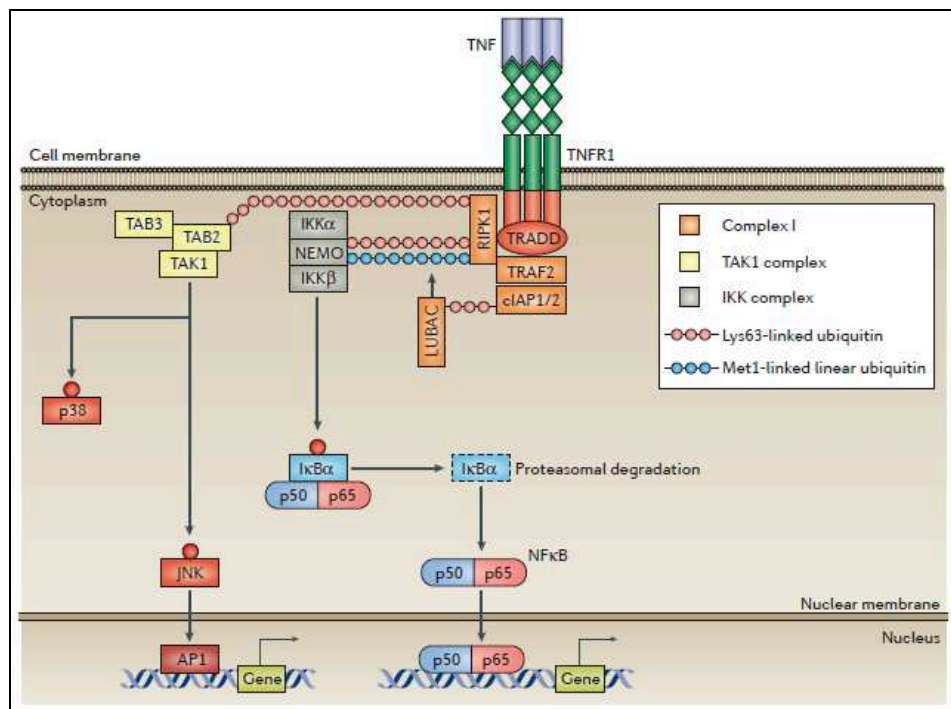


Figure 33: Modèle de la signalisation induite par le complexe I-TNF-R (Kalliolias and Ivashkiv, 2016).

Dans le contexte de la fibrose pulmonaire, le rôle du TNF- α reste encore mal compris. D'une part, l'administration intra-trachéale de TNF- α diminue les dépôts de collagène et améliore la compliance pulmonaire de souris traitées par la bléomycine. De plus, les souris invalidées pour le TNF- α (TNF- $\alpha^{-/-}$) et exposées à la bléomycine présentent un dépôt de collagène pulmonaire, une augmentation de l'infiltration pulmonaire par les cellules inflammatoires et une détérioration de la compliance pulmonaire plus importante que les souris sauvages. Ces résultats suggèrent donc que le TNF- α contribue à la résolution de la

fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Redente et al., 2014). En revanche, l'administration intra-trachéale de la bléomycine chez le rat augmente l'expression du TNF- α , et l'inhibition de sa production par l'Infliximab prévient le développement de la fibrose pulmonaire (Altintas et al., 2016). Par ailleurs, *Hou et coll* ont démontré que le TNF- α induit la différenciation des cellules pulmonaires mésenchymateuses de souris en myofibroblastes par un mécanisme dépendant de la voie NF- κ B (Hou et al., 2018). Enfin, le TNF- α induit l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires A549 et des CEAI de souris, et favoriserait donc l'induction de dommages épithéliaux à l'origine de l'activation des fibroblastes (Yang et al., 2018). Contrairement à d'autres études, ces résultats suggèrent donc que le TNF- α pourrait contribuer au développement de la fibrose pulmonaire (Hou et al., 2018). Ainsi le TNF- α pourrait avoir un rôle pro-fibrotique ou anti-fibrotique selon le microenvironnement tissulaire considéré. Toutefois, le traitement des patients atteints de FPI par l'Etanercept, un médicament neutralisant le TNF- α , ne prévient pas le déclin de leur fonction respiratoire (Raghu et al., 2008).

1.3.b- L'interleukine-1beta (IL-1 β)

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire majeure contrôlant l'expression d'autres cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires (KC, TARC, IL-6...) (Gasse et al., 2007). Elle est produite tout d'abord (appelé premier signal) sous la forme inactive de pro-IL-1 β . L'expression de cette pro-forme est induite par la voie NF- κ B canonique, notamment lors d'une stimulation par le LPS ou le TNF- α . Dans un second temps, le clivage de la pro-IL-1 β au niveau d'un complexe inflammasome génère la forme active IL-1 β qui est alors sécrétée (Swanson et al., 2019). L'inflammasome est un complexe multi-protéique contenant une des protéines NLR (NOD Like Receptor) qui sert de plateforme pour le recrutement de partenaires. Dans le macrophage, l'inflammasome clivant la pro-IL-1 β contient fréquemment la protéine NLRP3. Cette protéine, encore appelée NALP3 ou cryopyrine, est constituée des domaines PYD, NACHT et LRR. Elle s'associe à la protéine adaptatrice ASC (Adaptator protein apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD) et à la pro-caspase 1 (Parsamanesh et al., 2019) (voir figure 34).

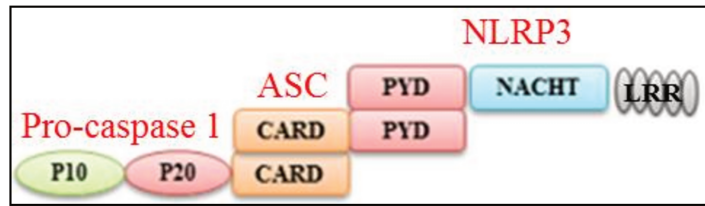


Figure 34: Structure de l'inflammasome NLRP3. Adapté selon (Parsamanesh et al., 2019).

Les mécanismes moléculaires permettant l'assemblage et l'activation de l'inflammasome (appelés second signal) restent encore imprécis. Ils pourraient impliquer 1) l'ATP extracellulaire qui active le récepteur purinergique P2X₇R et cause un efflux de K⁺, 2) la rupture lysosomale après internalisation de particules cristallines telle que la silice et 3) les ERO. Lors d'une stimulation conduisant à l'activation de l'inflammasome, la protéine NLRP3 recrute la pro-caspase 1 via la protéine adaptatrice ASC. La pro-caspase 1 subit une dégradation auto-catalytique engendrant la formation de la caspase 1 activée. Cette dernière clive non seulement le précurseur pro-IL-1 β mais également la pro-IL-18 en protéines actives matures (Swanson et al., 2019) (voir figure 35).

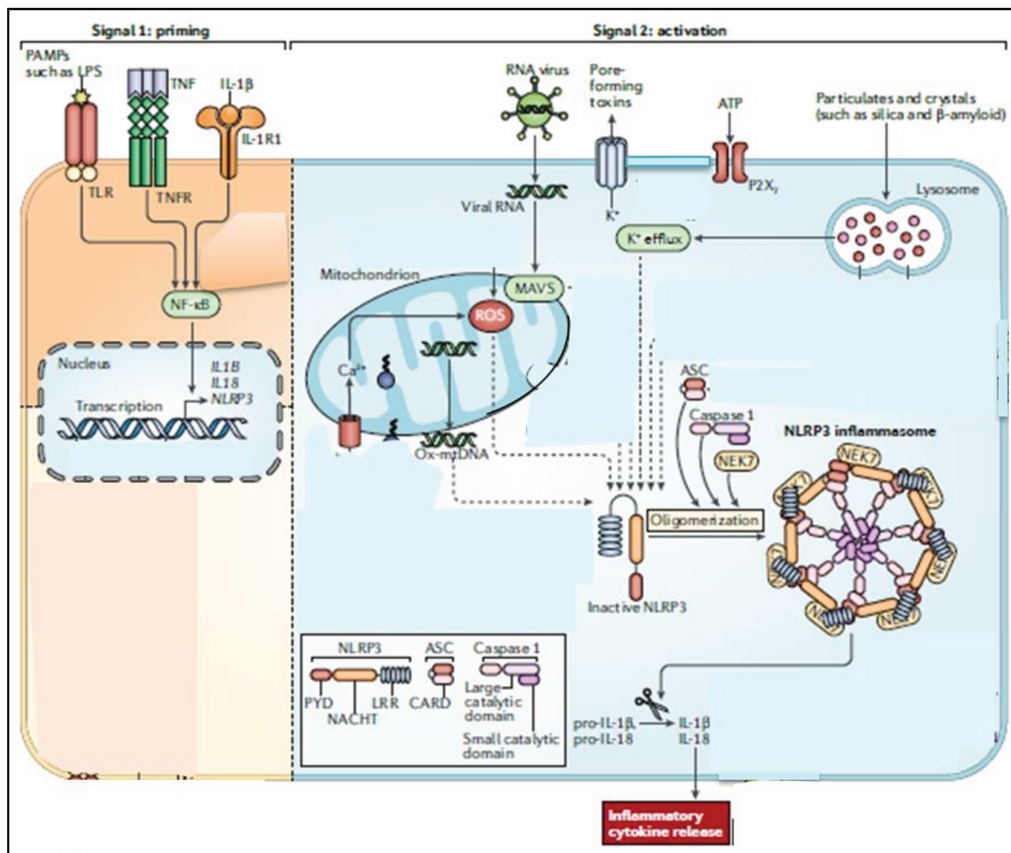


Figure 35: Activation de l'inflammasome et sécrétion de l'IL-1 β . Adapté selon (Swanson et al., 2019).

L'IL-1 β joue probablement un rôle important dans le développement de la fibrose pulmonaire. En effet, les concentrations pulmonaires d'ARNm IL-1 β au niveau tissulaire sont fortement augmentées au cours de la fibrose induite par la bléomycine chez la souris (Cavarra et al., 2004). *Gasse et coll* ont démontré que les souris invalidées pour MyD88 et IL-1R1 et traitées par la bléomycine ont des concentrations plus basses de cellules inflammatoires (neutrophiles, lymphocytes) dans les fluides de LBA (Gasse et al., 2007). Ces souris présentent moins de fibrose pulmonaire que les souris sauvages, notamment une réduction des dépôts de collagène au niveau tissulaire et des concentrations plus faibles de TGF- β 1 dans les liquides des LBA. Ces effets sont contrecarrés par l'administration d'IL-1 β chez les souris MyD88^{-/-} et IL-1R^{-/-} (Gasse et al., 2007). De même, la surexpression de l'IL-1 β dans le poumon de rat promeut la différenciation de myofibroblastes, l'apparition de foyers fibroblastiques et de dépôts des éléments de la MEC. Les concentrations de TGF- β sont également augmentées dans les fluides de LBA (Kolb et al., 2001). *In vitro*, *Tian et coll* ont démontré que l'inactivation génétique de NLRP3 dans les cellules épithéliales pulmonaires A549 prévient la production d'IL-1 β , la sécrétion de TGF- β 1 et la TEM induites par la bléomycine (Tian et al., 2017). Ces résultats suggèrent donc que la protéine NLRP3 pourrait contrôler la TEM via le TGF- β 1. Enfin, plusieurs études ont montré que les concentrations d'IL-1 β dans les fluides de LBA sont augmentées chez les patients atteints de FPI, par rapport à celles mesurées chez les sujets contrôles (Lasithiotaki et al., 2016; Wilson et al., 2010). Cependant, selon *Lasithiotaki et coll* (2016), *ex-vivo*, les macrophages isolés des liquides de LBA de patients atteints de FPI ne produisent pas plus d'IL-1 β que ceux isolés de sujets contrôles (Lasithiotaki et al., 2016). Cette augmentation de la concentration d'IL-1 β dans les liquides de LBA ne résulterait donc pas obligatoirement d'une sécrétion accrue de la cytokine à partir des MA.

1.3.c- L'interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 a été décrite pour la première fois par *Mosmann et coll* comme une cytokine produite par les lymphocytes Th2. Elle a été initialement nommée CSIF (Cytokine Synthesis Inhibitory Factor) (Sabat et al., 2010). Une fois sécrétée, l'IL-10 interagit avec son récepteur IL-10R, un complexe tétramérique constitué, d'une part, de deux chaînes polypeptidiques constituant la sous-unité IL-10R1 et, d'autre part, de deux autres chaînes polypeptidiques formant la sous-unité IL-10R2 (Donnelly et al., 1999). Alors que de très nombreux types cellulaires expriment IL-10R2, la sous-unité IL-10R1 est principalement détectée dans les

cellules immunitaires et notamment dans les monocytes et les macrophages. L'activation des monocytes par le LPS induit l'expression des gènes codant l'IL-10R1 et l'IL-10R2 alors qu'une stimulation par l'IFN- γ ou le TNF- α n'induit que l'expression du gène codant l'IL-10R2 (Sabat et al., 2010).

La liaison de l'IL-10 à son récepteur requière deux étapes. Premièrement, l'IL-10 se fixe sur la sous-unité IL-10R1, ce qui modifie la conformation de l'IL-10 et permet dans un second temps l'association du complexe IL-10/IL-10R1 avec IL-10R2. IL-10R2 seul ne peut se lier à l'IL-10 (Sabat et al., 2010). La liaison de l'IL-10 au domaine extracellulaire de son récepteur IL-10R1 active les tyrosines kinases JAK1 (associée à l'IL-10R1) et Tyk2 (associée à l'IL-10R2). Ces kinases vont à leur tour phosphoryler deux tyrosines spécifiques (Tyr446 et Tyr496) de la chaîne polypeptidique intracellulaire du récepteur IL-10R1. Une fois phosphorylés, ces résidus de tyrosine servent de plateforme de liaison du facteur de transcription STAT3. Ce dernier se lie à ses sites et va à son tour être phosphorylé par JAK1 (Donnelly et al., 1999). De plus, l'IL-10 peut également activer les protéines STAT1 et STAT5 (Sabat et al., 2010). La phosphorylation de STAT3 induit son homodimérisation, sa dissociation de son récepteur et sa translocation vers le noyau. Le dimère STAT3 se lie alors à ses éléments de réponse, appelés SBE (STAT Binding Element), localisés sur les promoteurs de différents gènes activés par l'IL-10 (Donnelly et al., 1999; Sabat et al., 2010) (voir figure 36).

L'IL-10 est une cytokine principalement anti-inflammatoire qui bloque l'expression de nombreuses cytokines. Cependant, l'IL-10 peut induire l'expression des gènes codant CD64, TIMP-1, CCL2, CCR5, IL1Ra, TNFR2, et SOCS3 (Supressor Of Cytokine Signaling-3). Les protéines SOCS, dont SOCS3, inhibent l'expression de gènes pro-inflammatoires induits par le LPS et l'IFN- γ tels que celle des gènes TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CD80, CD86, CMHII et iNOS (Donnelly et al., 1999). C'est principalement par ce mécanisme que l'IL-10 exerce ses effets anti-inflammatoires.

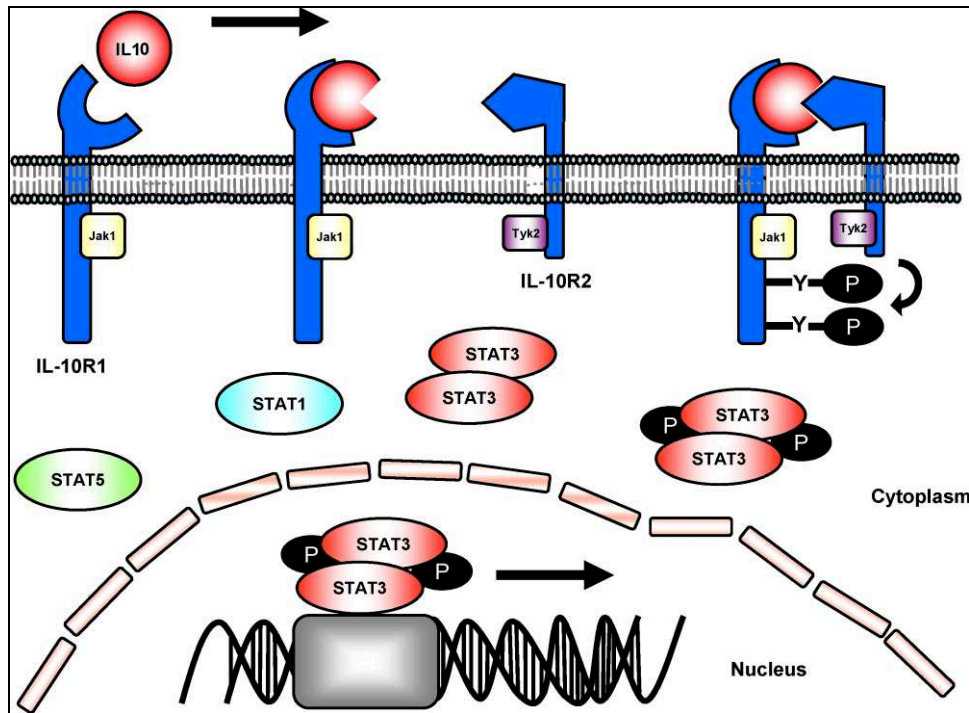


Figure 36: Activation du récepteur à l'IL-10 (Sabat et al., 2010).

Le rôle de l'IL-10 dans le développement de la fibrose pulmonaire reste encore indéci. D'une part, un ensemble de travaux démontrent que l'IL-10 a des effets pro-fibrosants. *In vivo*, l'exposition des souris à la silice par voie respiratoire augmente l'expression de l'IL-10 dans les tissus pulmonaires et accroît sa concentration dans les liquides de LBA. Les souris déficientes en IL-10 présentent une exacerbation de la réponse inflammatoires aiguë des tissus pulmonaires après l'instillation intratrachéale de silice, mais développent une fibrose pulmonaire moins intense que les souris sauvages (Arai et al., 2000; Nakagome, 2006) (Huaux et al., 1998). De plus, *Barbarin et coll* ont démontré que la surexpression d'IL-10 dans ce modèle de fibrose pulmonaire induite par la silice augmente les concentrations des cytokines pro-fibrosantes IL-4 et IL-13 dans les liquides de LBA et les niveaux de dépôt de collagène dans le tissu pulmonaire (Barbarin et al., 2005). De même, le maintien d'une surexpression de l'IL-10 chez la souris transgénique pendant plus d'un mois induit une fibrose pulmonaire impliquant une augmentation des concentrations de CCL2 et l'infiltration de fibrocytes dans les tissus pulmonaires (Sun et al., 2011). Enfin, *in vitro*, les MA isolés des souris exposées à l'IL-10 présentent une augmentation significative de l'expression des ARNm TGF- β 1 comparé aux MA issus de souris non traitées (Barbarin et al., 2004). Inversement, différentes études démontrent que la surexpression de l'IL-10 réduit la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Arai et al., 2000; Nakagome, 2006).

Notamment, l'administration d'IL-10 diminue significativement la production de TGF- β 1 dans le tissu pulmonaire, très probablement en inhibant l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ qui est essentielle à l'activation du TGF- β 1 (Nakagome, 2006). De plus, *in vitro*, le traitement par l'IL-10 prévient la différenciation des fibroblastes pulmonaires humains en myofibroblastes induite par le TGF- β 1 (Shamskhou et al., 2019). L'IL-10 réduit la formation des fibres de stress et la sécrétion de collagène. Chez les patients atteints de FPI, les concentrations d'IL-10 dans le sérum et l'expression de l'IL-10 dans le tissu pulmonaire sont augmentées par rapport à celles mesurées chez des sujets contrôles (Alhamad et al., 2013; Bergeron et al., 2003). Les MA isolés des liquides de LBA de ces patients présentent également une augmentation des concentrations d'ARNm IL-10 (Martinez et al., 1997). Au total, l'IL-10 présente des effets pro- et anti-fibrosant selon les modèles de fibrose pulmonaire et sa concentration pulmonaire semble augmentée chez les patients atteints de FPI. Des travaux complémentaires seraient donc nécessaires afin de mieux comprendre son rôle chez ces malades.

1.3.d- La chimiokine CXCL13

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques de faible poids moléculaire (8-10 kDa) classées en quatre groupes CXC, CC, C, et CX3C selon l'organisation de leurs résidus cystéines en position N-terminal. Ces ligands attirent et activent sélectivement différents types cellulaires. CXCL13, est une chimiokine connue sous le nom de BLC (B-Lymphocyte Chemoattractant) ou BCA-1 (B Cell Attracting Chemokine-1) (Hussain et al., 2019). En réponse à une stimulation par la lymphotoxine- β , et en dehors de tout contexte pathologique, CXCL13 est sécrétée de façon constitutive par les CD folliculaires et les cellules stromales localisées au niveau des zones B des organisations lymphoïdes secondaires (OLS) (Cyster et al., 2000; Hussain et al., 2019). Les OLS sont présents au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate, des amygdales et dans les muqueuses de différents tissus, notamment les intestins et les poumons (formations lymphoïdes associées aux bronche ou BALT) (Cyster et al., 2000; Hussain et al., 2019). CXCL13 joue un rôle physiologique majeur en orchestrant une migration cellulaire spécifique vers ces OLS. Il attire fortement les LB tout en assurant la migration d'un faible taux de LT et de macrophages. CXCL13 assure sa fonction via son récepteur CXCR5 nommé aussi BLR1 (Burkitt Lymphoma Receptor 1). Ce dernier est fortement exprimé par les LB matures et les lymphocytes Th folliculaire (Thf) (Hussain et al., 2019). Les OLS sont formés durant l'embryogenèse et contribuent à l'immuno-surveillance en assurant une interaction optimale entre les CPA (Cellules Présentatrice d'Antigène) et les

lymphocytes. Après la reconnaissance spécifique de l'antigène, les lymphocytes s'activent, prolifèrent, se différencient et migrent vers le site inflammatoire cible où ils exercent leur fonction effectrice spécifique (Moyron-Quiroz et al., 2007; Yadava et al., 2016). La signalisation induite par le complexe CXCL13/CXCR5 contribue également à d'autres réponses physiologiques telle que la survie et la prolifération cellulaire (Hussain et al., 2019).

Au niveau physio-pathologique, la dérégulation de l'expression de CXCL13 et/ou de CXCR5 contribue au développement de différentes maladies. En effet, l'augmentation de l'expression de CXCL13 au niveau des organes non-lymphoïdes promeut l'organisation de structures lymphoïdes ectopiques dite SLT (structure lymphoïde tertiaire) (Hussain et al., 2019). Comme les OLS, les SLT sont formées d'agrégats de LT et de LB mais ces structures sont non-encapsulées (Yadava et al., 2016). Des SLT se développent notamment au cours de maladies inflammatoires chroniques (Bronchopneumopathie chronique obstructive, BPCO), de maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) et de cancers (NSCLC, Non Small Lung Cancer). Sur le long terme, les SLT sont généralement impliquées dans la sévérité de la physiopathologie de ces maladies (Hussain et al., 2019). La neutralisation de CXCL13 semble être une cible thérapeutique pour ces pathologies (Finch et al., 2013).

Au niveau pulmonaire, l'organisation de SLT peut être induite par différents agents infectieux, bactériens (*P. aeruginosa*) ou viraux (virus *Influenzae*), ou par des agents chimiques (fumée de cigarette), et elle implique la production de CXCL13 (Fleige et al., 2014; Moyron-Quiroz et al., 2004; Yadava et al., 2016). Ces structures sont détectées chez les patients souffrant de BPCO sévères et elles expriment CXCL13 (Yadava et al., 2016). Expérimentalement, l'exposition de souris à des extraits de cigarette induit la formation de SLT au niveau bronchique et augmente l'expression pulmonaire de CXCL13. L'administration préventive ou curative d'un anticorps dirigé contre CXCL13 diminue la formation des SLT, atténue la destruction des parois alvéolaires et réduit les marqueurs inflammatoires dans les liquides de LBA (Bracke et al., 2013).

Chez les patients atteints de FPI, *Marchal-Sommé et coll* ont identifié la présence de SLT au niveau des tissus pulmonaires (Marchal-Sommé et al., 2006). Ces foyers ou agrégats lymphoïdes, riches en LB, sont généralement localisés à proximité de zones de tissus fibroblastiques. Ils comprennent également des lymphocytes CD3⁺, des CD et des cellules endothéliales (Marchal-Sommé et al., 2006). CXCL13 est détectée au niveau des SLT pulmonaires et serait exprimée par des cellules présentant le marqueur CD68 qui est caractéristique des cellules du lignage monocyte/macrophage (DePianto et al., 2015; Vuga et

al., 2014). Toutefois, l'origine cellulaire précise de CXCL13 au niveau pulmonaire, chez les patients souffrant de FPI, reste à démontrer. Différentes études récentes ont mis en évidence CXCL13 comme un biomarqueur pronostique de la FPI (DePianto et al., 2015; Vuga et al., 2014). En effet, les concentrations plasmatiques de CXCL13 sont plus élevées chez les patients atteints de FPI que celles mesurées chez des patients atteints de BPCO ou chez des sujets contrôles. Ces concentrations de CXCL13 sont plus fortes chez les malades présentant une hypertension artérielle pulmonaire ou une exacerbation aigue. Elles augmentent au cours du temps et les malades ayant les plus fortes concentrations plasmatiques de CXCL13 ont une survie à 6 mois qui est réduite (Vuga et al., 2014). Le rôle physiopathologique de CXCL13 et des SLT dans le développement de la FPI n'est cependant pas encore bien connu.

2- Le macrophage pro-fibrotique de type M2a

L'IL-4 et l'IL-13, secrétées principalement par les lymphocytes Th2, les mastocytes et les basophiles, inhibent la polarisation des macrophages en cellules de type M1 et induisent l'activation alternative du macrophage en cellule de type M2a (Martinez et al., 2008).

L'IL-4 se lie à deux types de récepteur hétérodimérique : i) le récepteur de haute affinité de type IL-4R α / γ C (type I) exprimé à différents degrés par les LT, LB, les mastocytes et les macrophages, et ii) le complexe récepteur de faible affinité IL-4R α /IL-13R α 1 (type II) exprimé par les LB, les cellules endothéliales, les monocytes et les fibroblastes. L'IL-13 interagit avec un récepteur leurre monomérique IL-13R α 2 et le récepteur hétérodimérique IL-4R α /IL-13R α 1 membranaire (Mueller et al., 2002; Roy et al., 2002).

L'activation des récepteurs par l'IL-4 et l'IL-13 induit différentes voies de signalisation dont la voie principale JAK/STAT. Le facteur de transcription STAT6, sous forme de dimère, contrôle les effets de l'IL-4 et de l'IL-13 sur la polarisation du macrophage (voir figure 37) (Tugal et al., 2013). STAT6 contribue à bloquer la polarisation M1 par différents mécanismes. D'une part, STAT6 coopère avec le facteur de transcription KLF4 (Kruppel Like Factor 4) afin de réprimer l'expression de différents gènes contribuant à l'activation du macrophage en cellules M1. De plus, STAT6 active le récepteur nucléaire PPAR γ qui s'associe alors avec le répresseur NCoR (Nuclear receptor corepressor) afin d'inhiber l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et d'AP-1. L'activation de STAT6 stimule également l'expression de gènes codant différentes protéines induisant le phénotype M2 du macrophage (Tugal et al., 2013).

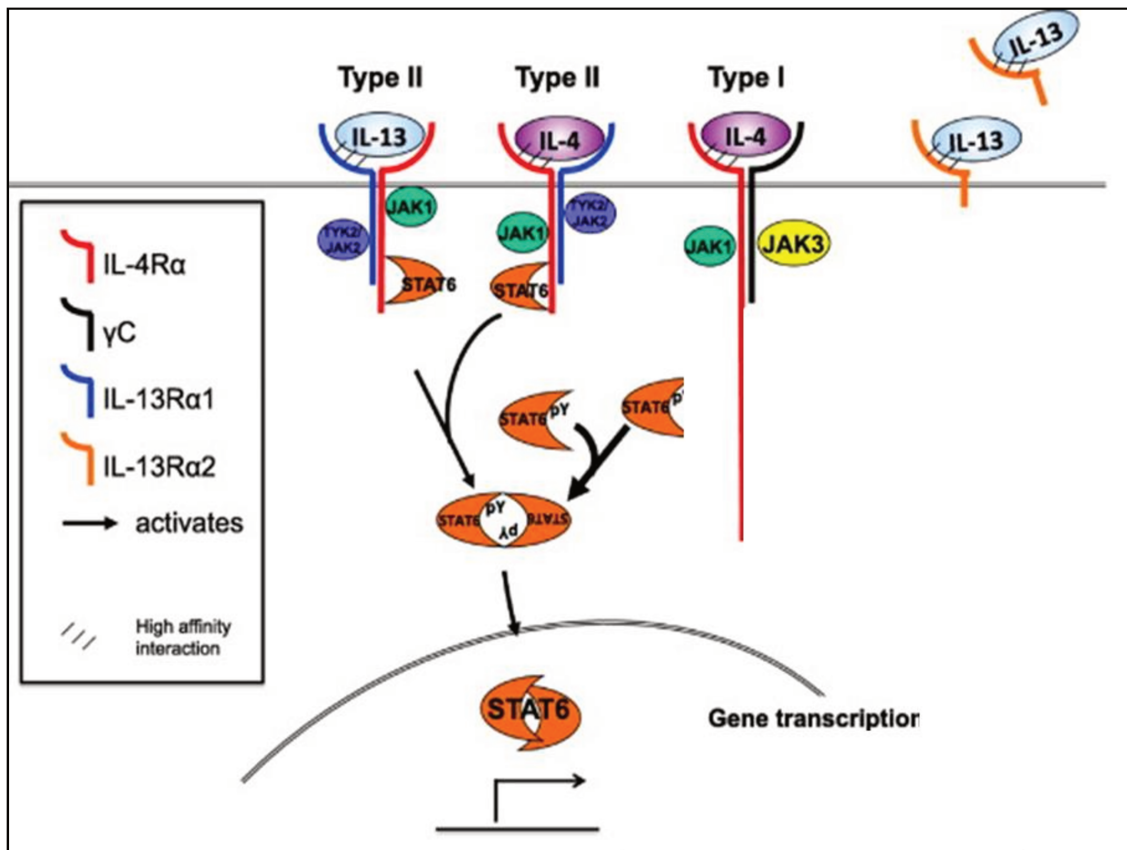


Figure 37: Récepteurs et voies de signalisation activées par IL-4 et/ou IL-13.

Adapté selon (McCormick and Heller, 2015).

Physiologiquement, l'IL-4 et l'IL-13 induisent des effets modulant la réponse inflammatoire et favorisant les mécanismes de réparation tissulaire. Elles diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires, notamment celle de l'IL-1 β en induisant l'expression de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 β (IL-1ra) (Hart et al., 1989; Mosser, 2003) et en réduisant l'expression de la caspase 1 qui est responsable du clivage protéolytique de la pro-IL-1 β en IL-1 β active (Martinez et al., 2008). En revanche, l'IL-4 et l'IL-13 stimulent l'expression des chimiokines CCL22 et CCL18 (Mantovani et al., 2004), des MMP 1 et 12 (Chizzolini et al., 2000; Kahnert et al., 2006), des cytokines pro-fibrosantes PDGF et TGF- β (Martinez et al., 2008) et de la fibronectine qui promeut la fibrogénèse (Gratchev et al., 2001). Ces différentes protéines sont généralement exprimées dans le macrophage M2 mature.

L'IL-4 et l'IL-13 induisent également l'expression de différentes protéines membranaires détectables sur le macrophage M2 par cytométrie en flux. Il s'agit de CMHII, de SR-A et B (Scavenger Receptor), du CD206 (Mannose Receptor encore appelé MRC1), du CD209 (DC-SIGN) et de CD163 (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006).

Au plan fonctionnel, l'action microbicide des M2a est peu efficace due à la faible production des ERO et des espèces réactives de l'azote. En particulier, l'IL-4 et l'IL-13 induisent l'expression du facteur de transcription HIF-2 α (Hypoxia Inducible Factors-2 α) qui limite la production de NO en activant l'enzyme Arg1 (arginase-1). Cette enzyme métabolise la L-arginine en polyamines et ornithine qui sont impliqués dans la fibrose et le remodelage tissulaire. En effet, elles promeuvent la prolifération du fibroblaste et la production du collagène (Wynn, 2004). Par conséquent, l'Arg1 réduit les concentrations de L-arginine utilisée par la NO synthase pour la production de NO (Tugal et al., 2013). L'ensemble des caractéristiques du macrophage M2a et des voies de signalisation impliquées dans cette polarisation est résumé dans la figure 38.

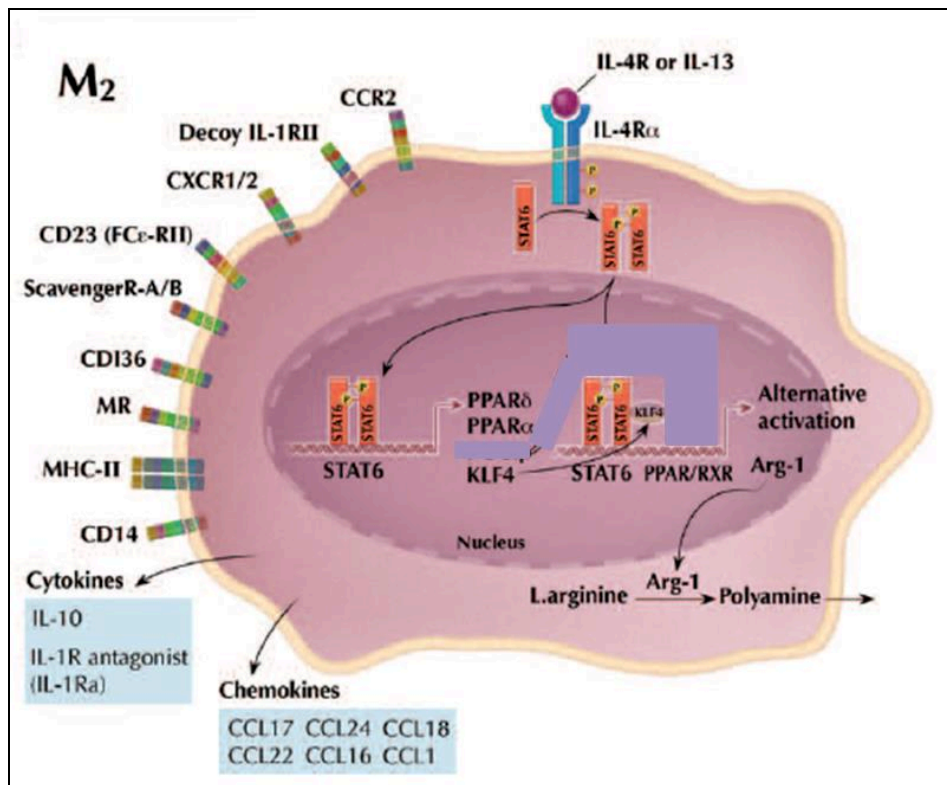


Figure 38: Caractéristiques et voie de signalisation impliquées dans le macrophage M2a.

Adapté selon (Tugal et al., 2013).

2.1- Rôle des cytokines pro-fibrosantes

Les cytokines pro-fibrosantes sont impliquées dans la physio-pathologie de la FPI. Comme le rôle du TGF- β , secrété par les macrophages M2a (Martinez et al., 2008), a été présenté dans la chapitre I, on étudiera dans cette partie le rôle de CCL18, CCL22 et du PDGF-BB.

2.1.a- La chimiokine CCL18

CCL18 est connue sous le nom de PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine), MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4), DC-CK1 (Dendritic Cell-Chemokine 1) et AMAC-1 (Alternative Macrophage Activation-associated CC-chemokine-1). C'est une chimiokine présente de façon constitutive au niveau pulmonaire, mais son expression est fortement augmentée au cours des processus inflammatoire et fibrotique (Chenivesse and Tsicopoulos, 2018). Les MA et les CD folliculaires sont les principales cellules produisant CCL18. Mais, *in vitro*, d'autres types cellulaires secrètent CCL18 : les CD dérivées de monocyte, le mastocyte, l'éosinophile et le macrophage M2 humain (Chenivesse and Tsicopoulos, 2018). L'expression de CCL18 est fortement augmentée par l'IL-4 et l'IL-13.

CCL18 induit des propriétés chimiotactiques chez des cellules portant le récepteur CCR8 fonctionnel auquel elle se lie (Islam et al., 2013). Le CCR8 est principalement exprimé par les lymphocytes Th2 et Treg. Cependant, CCR8 est absent chez LT naïfs qui ont pourtant une grande capacité à migrer en réponse à CCL18. Cela suggère donc que la chimiokine peut se fixer sur un autre récepteur sur les LT (Chenivesse and Tsicopoulos, 2018). En dehors des LTs, CCL18 exerce également des propriétés chimiotactique vis à vis des CD immatures, des cellules NK, des basophiles, de progéniteurs de la moelle osseuse, et des fibroblastes (Chenivesse and Tsicopoulos, 2018). En revanche, CCL18 n'est pas chimiotactique pour les CD matures et les éosinophiles. Les lymphocytes Th2 et Treg infiltrant les tissus, en réponse à CCL18, contribuent à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes Th1 CD4⁺CD25⁻, probablement par la sécrétion d'IL-10. Ces résultats suggèrent donc que CCL18 régule négativement le processus inflammatoire, particulièrement au niveau du poumon où cette chimiokine est fortement exprimée (Chenivesse and Tsicopoulos, 2018).

Dans le contexte de la fibrose pulmonaire, le CCL18 induit la production de collagène par les fibroblastes pulmonaires via les protéines ERK1/ERK2, PKC α ou Sp1 (Specificity protein1)/SMAD3 (Atamas et al., 2003; Luzina et al., 2006a, 2006b). Chez la souris, la surexpression de CCL18 induit une fibrose pulmonaire impliquant le recrutement de LT (Luzina et al., 2006c). Dans un modèle de co-culture *in vitro*, les LT (Jurkat) induisent l'expression de TGF- β et de collagène par les fibroblastes pulmonaires (Luzina et al., 2009).

Paradoxalement, le CCL18 diminue pourtant le dépôt de collagène et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Pochetuhen et al., 2007).

Les concentrations de CCL18 dans le sang et dans les liquides de LBA de patients atteints de PID sont plus élevées que celles mesurées chez des sujets contrôles (Cai et al., 2013). Ces concentrations sont corrélées avec le pourcentage de lymphocytes dans les liquides de LBA (Cai et al., 2013). Chez les patients atteints de FPI, les concentrations sériques de CCL18 sont corrélées avec le déclin de la fonction pulmonaire, l'apparition d'exacerbation aiguë et la mortalité (Prasse et al., 2009; Schupp et al., 2015). *In vitro*, le collagène de type I induit la sécrétion de CCL18 à partir de MA isolés de liquides de LBA de patients atteints de FPI (Stahl et al., 2013). Les surnageants de culture de ces macrophages stimulent la production de collagène par les fibroblastes pulmonaires humains, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Prasse et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que CCL18 contribue probablement au développement de la fibrose pulmonaire humaine.

2.1.b- La chimiokine CCL22

CCL22 est une chimiokine CC identifiée initialement dans le macrophage mature et ainsi nommée MDC (Macrophage-Derived Chemokine) ou STCP-1 (Stimulated T cell Chemotactic Protein-1). CCL22 est en fait très exprimée par le macrophage et les CD différenciées à partir de monocyte. Cette expression est induite par les cytokines de type Th2 dont l'IL-4 et l'IL-13 et est inhibée par différentes cytokines de type Th1 (IFN- γ , IFN- α et IL-12). CCL22 peut être dégradée par la sérine protéase CD26 produite par les Th1 (Mantovani et al., 2000). Après fixation sur son récepteur CCR4, CCL22 exerce une action chimiotactique vis à vis des lymphocytes Th2, les cellules NK, les macrophages et les CD immatures (Mantovani et al., 2000).

In vivo, l'irradiation thoracique du rat induit une fibrose pulmonaire associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm CCL22 (Inoue et al., 2004). De la même façon, chez la souris, la bléomycine accroît l'expression de CCL22 et de CCR4 au cours de la fibrose pulmonaire (Belperio et al., 2004). Les concentrations de CCL22 et de LT CD4⁺ CCR4⁺ dans les liquides de LBA de patients FPI sont plus élevées que celles mesurées chez les malades atteints de sarcoïdose ou chez des sujets contrôles (Inoue et al., 2004). Ces concentrations sont corrélées négativement avec les valeurs de DLco (Pignatti et al., 2006; Yogo et al., 2009). En dehors des LT CD4⁺ pulmonaires, CCR4 a été détecté sur les MA-CD68⁺. Les concentrations de CCL22 dans les liquides de LBA sont corrélées au pourcentage de MA-CD68⁺CCR4⁺, ce

qui suggère que CCL22 pourrait modifier la physiologie pulmonaire en recrutant des LT et des macrophages (Yogo et al., 2009). Enfin, selon *Shinoda et coll* (2009), les concentrations plasmatiques de CCL22 seraient significativement plus élevées chez les patients décédés d'une FPI que chez les survivants. Toutefois, ces résultats ont été obtenus sur une petite cohorte de seulement 39 patients (Shinoda et al., 2009).

2.1.c- *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*

Le PDGF a été identifié en 1970 comme un facteur de croissance libéré par les plaquettes d'où l'appellation de « Platelet-Derived Growth Factor ». Ce facteur de croissance d'action autocrine ou paracrine est composé de deux chaînes polypeptidiques A et B. Ces dernières se lient par un pont disulfure formant ainsi un homodimère ou un hétérodimère. On distingue le PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC et le PDGF-DD. Ces deux derniers sont exprimés sous forme inactive et requièrent un clivage protéolytique extracellulaire (Raica and Cimpean, 2010).

Au niveau pulmonaire, le PDGF est exprimé par les cellules épithéliales et le MA (Klinkhammer et al., 2018). Les cellules mésenchymateuses (fibroblaste et myofibroblaste) sont la cible de ces facteurs de croissance (Raica and Cimpean, 2010). Le récepteur au PDGF (PDGF-R) se présente aussi sous forme homodimérique ($\alpha\alpha$ et $\beta\beta$) ou hétérodimérique ($\alpha\beta$). Les PDGF-R sont des récepteurs à tyrosine kinase de classe III. Le PDGF-BB est le seul ligand interagissant facilement avec ces trois récepteurs (voir figure 39) et il constitue un médiateur clef de la cicatrisation et de la réparation tissulaire (Noskovičová et al., 2015).

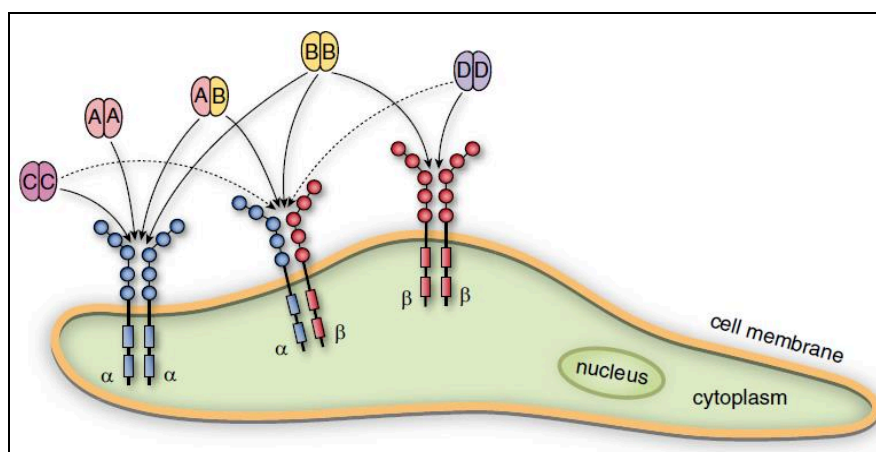


Figure 39: Les ligands PDGF et leur interaction avec le récepteur PDGF-R (Noskovičová et al., 2015).

La liaison du PDGF à son récepteur induit une autophosphorylation du récepteur au niveau de ses résidus tyrosine et entraîne l'activation des voies de signalisation ERK et PI3K. Le PDGF est un facteur de croissance puissant pour les fibroblastes. Son activité est régulée par différentes protéines extracellulaires et par des éléments de la MEC (Bonner, 2004).

Le PDGF joue un rôle essentiel dans l'expansion des foyers fibroblastiques en stimulant la prolifération, la migration et la survie des fibroblastes et des myofibroblastes (Wollin et al., 2015). Il induit aussi la synthèse de collagène par le myofibroblaste (Karakiulakis et al., 2007). *In vivo*, la surexpression de PDGF induit une fibrose pulmonaire chez le rat (Yoshida et al., 1995). Le PDGF contribue également à la fibrose pulmonaire produite par irradiation thoracique chez la souris. Le traitement par un antagoniste du récepteur au PDGF réduit l'inflammation et la fibrose pulmonaire induite par les radiations. Le blocage du PDGF-R entraîne en effet une diminution de l'infiltration de leucocytes dans le tissu pulmonaire et prévient les altérations de l'architecture tissulaire telles que la formation de foyers fibroblastiques et les dépôts de collagène (Dadrich et al., 2016). Le PDGF stimule la migration des fibrocytes humains et les inhibiteurs du PDGF-R préviennent l'infiltration des tissus pulmonaires par les fibrocytes au cours de la fibrose induite par la bléomycine chez la souris. (Aono et al., 2014).

Enfin, les MA isolés à partir de liquides de LBA de patients FPI expriment davantage le PDGF-BB que les MA de sujets contrôles (Martinet et al., 1987). La concentration sérique de PDGF-BB chez les patients atteints de FPI est également supérieure à celle mesurée chez les malades atteints de sarcoïdose (Ziora et al., 2015). L'ensemble de ces résultats démontre le rôle pro-fibrotique du PDGF durant la fibrose pulmonaire.

Chapitre III: Place du Nintedanib
dans la prise en charge thérapeutique
de la FPI

En 2015, l’American Thoracic Society (ATS)/ European Respiratory Society (ERS)/ Japanese Respiratory Society (JRS)/ Latin American Thoracic Society (ALAT) a publié les recommandations cliniques pour la prise en charge de la FPI. Le tableau 3 résume l’ensemble de ces lignes directrices et les compare à celles publiées en 2011 (Aryal and Nathan, 2018).

L’approche thérapeutique de la FPI intègre deux stratégies, l’une médicale non pharmacologique et une seconde fondée sur l’utilisation de médicaments à visée symptomatique ou plus spécifiquement anti-fibrosants. Le but de ces traitements est de stopper la progression de la maladie, de réduire les symptômes, de prévenir les exacerbations aiguës et de prolonger la survie des patients (Bonella et al., 2015; Cottin et al., 2017).

Agent	2015 guideline	2011 guideline
<i>New and revised recommendations</i>		
Anticoagulation (warfarin)	Strong recommendation against use ^a	Conditional recommendation against use ^c
Combination prednisone + azathioprine + N-acetylcysteine	Strong recommendation against use ^b	Conditional recommendation against use ^b
Selective endothelin receptor antagonist (ambrisentan)	Strong recommendation against use ^b	Not addressed
Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor with one target	Strong recommendation against use ^a	Not addressed
Nintedanib, a tyrosine kinase inhibitor with multiple targets	Conditional recommendation for use ^a	Not addressed
Pirfenidone	Conditional recommendation for use ^a	Conditional recommendation against use ^b
Dual endothelin receptor antagonists (macitentan, bosentan)	Conditional recommendation against use ^b	Strong recommendation against use ^a
Phosphodiesterase-5 inhibitor (sildenafil)	Conditional recommendation against use ^a	Not addressed
<i>Unchanged recommendations</i>		
Antiacid therapy	Conditional recommendation for use ^c	Conditional recommendation for use ^c
N-acetylcysteine monotherapy	Conditional recommendation against use ^b	Conditional recommendation against use ^b
Antipulmonary hypertension therapy for idiopathic pulmonary fibrosis-associated pulmonary hypertension	Reassessment of the previous recommendation was deferred	Conditional recommendation against use ^c
Lung transplantation: single vs. bilateral lung transplantation	Formulation of a recommendation for single vs. bilateral lung transplantation was deferred	Not addressed

^aⓂⓂⓂⓂ, moderate confidence in effect estimates.
^bⓂⓂⓂⓂ, low confidence in effect estimates.
^cⓂⓂⓂⓂ, very low confidence in effect estimates.

Tableau 3: Comparaison des recommandations de 2011 et de 2015 pour la prise en charge de la FPI (Aryal and Nathan, 2018).

I- La prise en charge non pharmacologique

1- La transplantation pulmonaire

Au cours des cinq dernières années, la FPI est devenue l’une des principales pathologies respiratoire pouvant être pris en charge par la transplantation pulmonaire (Yusen et al., 2014). Dans les lignes directrices de 2011, ce traitement était déjà fortement recommandé (Raghu et al., 2011). Selon le rapport d’OPTN (Organ Procurement and Transplantation Network), aux Etats-Unis, la proportion de patients atteints de FPI et bénéficiant d’une transplantation pulmonaire a constamment augmenté durant ces dernières années. Actuellement la fréquence des transplantations serait d’environ 4000 cas par an dans ce pays (Valapour et al., 2015). Des études montrent que la transplantation pulmonaire améliore la survie des patients atteints de

FPI au stade avancé (Cottin et al., 2017; Thabut et al., 2003). La médiane de survie après transplantation semble cependant plus courte que celle des patients transplantés pour d'autres maladies pulmonaires comme la BPCO (Spagnolo et al., 2018). De plus, seule une petite fraction de patients bénéficie de cette intervention. La relative rareté de cette intervention résulte de plusieurs facteurs. L'âge avancé des patients susceptibles d'être transplanté augmente notamment le risque de complications durant ou après cette opération. De plus, la disponibilité des transplants compatibles reste souvent très limitée.

Il est recommandé d'informer les patients de la possibilité de prendre en charge leur maladie par une transplantation pulmonaire dès que le diagnostic de FPI est confirmé. L'indication principale de la transplantation concerne les patients de moins de 65 ans présentant une forme sévère ou s'aggravant de la fibrose pulmonaire (Cottin et al., 2017). Au-delà de 65 ans, la transplantation reste exceptionnelle et doit être considérée en l'absence de comorbidité (Cottin et al., 2017). Le choix de pratiquer une transplantation mono ou bi-pulmonaire n'est pas définitivement tranché car les bénéfices et les risques associés à ces deux techniques ne semblent pas différer. La transplantation bi-pulmonaire pourrait accroître la durée de survie des patients par rapport à celle mesurée chez ceux ayant bénéficié d'une transplantation mono-pulmonaire (Spagnolo et al., 2018). Cet avantage est à prendre avec précaution car le délai avant la transplantation bi-pulmonaire est généralement plus long et le rétablissement de ces patients semble beaucoup plus lent (Aryal and Nathan, 2018; Nathan et al., 2010).

2- La réhabilitation respiratoire

La réhabilitation respiratoire dans la FPI associe généralement une activité physique telle que la marche avec des exercices favorisant la résistance et/ou la souplesse musculaire (Spagnolo et al., 2018). Une étude récente montre une amélioration de la distance au test de marche de six minutes (de 35 à 81 mètres), une augmentation de la capacité physique en général, une diminution de la dyspnée et une meilleure qualité de vie des patients atteints de FPI et ayant bénéficié d'une réhabilitation respiratoire (Vainshelboim et al., 2016). L'exercice physique semble également accroître la compliance pulmonaire. La réhabilitation respiratoire peut être proposée à n'importe quel stade d'évolution de la maladie et chez les patients en attente d'une transplantation pulmonaire (Kenn et al., 2015). Toutefois, le bénéfice de ces exercices ne semble pas varier selon la sévérité de la maladie et serait inférieur à celui observé chez les patients souffrant de BPCO (Cottin et al., 2017). L'impact de la réhabilitation respiratoire sur la qualité de vie du patient se maintient pendant plusieurs mois si une activité

physique contrôlée est maintenue. Son efficacité à plus long terme reste en revanche à étudier (Spagnolo et al., 2018).

3- L'oxygénothérapie

L'intérêt de prescrire une oxygénothérapie de déambulation dans le cadre de la prise charge de la FPI reste débattue. En effet, si l'oxygénothérapie améliore la capacité physique des malades, son impact sur les symptômes et la qualité de vie sont incertains et variables selon les patients (Fraser and Hoyles; Spagnolo et al., 2018). En France, il est recommandé de prescrire une oxygénothérapie de longue durée chez les patients souffrant de FPI et présentant une insuffisance respiratoire chronique sévère (Cottin et al., 2017).

II Les traitements médicamenteux à visée symptomatique

L'objectif de ces traitements est i) de réduire l'impact des symptômes sur la qualité de vie des patients et ii) de minimiser le stress et les conséquences psychologiques, principalement la dépression et l'anxiété, qui peuvent survenir lors de la progression naturelle de la maladie (Spagnolo et al., 2018).

1- Toux et dyspnée

La dyspnée et la toux apparaissent généralement au début de la maladie et sont fortement associés à une réduction de la qualité de vie du patient. Comme expliqué précédemment, la réhabilitation respiratoire et dans une moindre mesure l'oxygénothérapie, peuvent améliorer les symptômes associés à la dyspnée. De faibles doses de morphine (10 à 30 mg/j) peuvent être utiles chez des patients présentant une dyspnée sévère, mais ce traitement nécessite une surveillance stricte des effets secondaires (Kohberg et al., 2016).

La toux chronique est un autre symptôme majeur de la FPI. Une étude a montré l'effet bénéfique des corticostéroïdes dans la réduction du réflexe de toux chez les patients atteints de FPI (Hope-Gill et al., 2003). La thalidomide a aussi été étudiée comme traitement potentiel de la toux. Malgré son effet positif sur la qualité de vie des patients, seulement 20 % des sujets ont terminé l'étude en raison d'effets indésirables (Horton et al., 2012). Les fortes doses de thalidomide ou de corticostéroïdes ne sont pas recommandées du fait de leur faible tolérance (Cottin et al., 2017). Récemment, *Birring et coll* ont étudié l'efficacité et la tolérance du PA101, une nouvelle formulation du cromogliccate sodique dans le traitement de

la toux chez les patients atteints de FPI. Ce médicament diminuerait d'environ 30 % la fréquence de la toux chez ces patients (Birring et al., 2017).

2- Reflux gastro-œsophagien

Le reflux gastro-œsophagien est une complication fréquemment détectée chez les patients atteints de FPI. Il favorise les micro-aspirations chroniques qui contribuent à la physiopathologie et à la progression de la maladie (voir chapitre I). De ce fait, un traitement antiacide semble être bénéfique pour ces patients (Spagnolo et al., 2018).

Initialement, différentes études ont suggéré que des traitements antiacides menés avec des inhibiteurs de pompe à proton ou des antagonistes des récepteurs H2 stabilisent la fonction pulmonaire et accroissent la survie des patients souffrant de FPI (Lee et al., 2011, 2013). Ainsi en 2015, les lignes directrices recommandaient l'utilisation de la thérapie antiacide qui est généralement bien tolérée chez ces patients (Aryal and Nathan, 2018). Cependant, des études récentes ne confirment pas les résultats de ces études antérieures, et en particulier ne montrent pas d'impact des traitements antiacides sur la qualité de vie, le déclin de CVF et sur la mortalité des patients atteints de FPI (Kreuter et al., 2016). De plus, cette thérapie semble associée à une augmentation de la fréquence des infections pulmonaires (Johansson et al., 2017). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier l'intérêt du traitement antiacide dans la prise en charge de la FPI (Aryal and Nathan, 2018; Spagnolo et al., 2018). Enfin, une étude récente (WRAP-IPF) a démontré que l'utilisation de la technique chirurgicale de laparoscopie est bien tolérée chez les patients atteints de FPI et qui présentent des reflux gastro-œsophagiens (Raghu et al., 2018c).

3- Exacerbations aiguës

La prise en charge des exacerbations aiguës est une urgence médicale car le pronostic de ces complications est sombre. Etant donné le rôle probable de l'inflammation aiguë dans le développement des exacerbations, les lignes directrices recommandent l'utilisation de corticostéroïdes à fortes doses mais leur efficacité réelle reste à démontrer (Arai et al., 2017; Papiris et al., 2015). L'ajout de cyclophosphamide, un second médicament immunosuppresseur, au traitement par corticoïdes, pourrait réduire la mortalité induite par les exacerbations aiguës. L'efficacité de ce co-traitement est actuellement en cours d'évaluation (Naccache et al., 2019). Enfin, un traitement antibiotique à large spectre est généralement

proposé lors de l'hospitalisation du patient pour la prise en charge d'une exacerbation aiguë (Cottin et al., 2017).

III- Les médicaments antifibrosants

Deux traitements pharmacologiques à visée antifibrosante ont été approuvés par les lignes directrices de 2015 (Aryal and Nathan, 2018). Ces derniers sont (1) la pirféridone qui a bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2008 au Japon, en 2011 en Europe et en 2014 aux Etats-Unis (Varone et al., 2018) et (2) le nintedanib dont l'AMM été obtenu en 2014 aux Etats-Unis et en 2015 en Europe (Wind et al., 2019). Les paragraphes suivant présentent succinctement les effets antifibrosants de la pirféridone et plus en détail ceux du nintedanib puisque c'est ce second médicament que j'ai étudié au cours de mes travaux de thèse.

1- Pirféridone

La pirféridone est commercialisée en France sous le nom d'Esbriet (Cottin et al., 2017). Cette molécule non peptidique de petite taille a été initialement développée pour ces propriétés antipyrétique et analgésique (Heukels et al., 2019). En 1995, *Iyer et coll* ont démontrent l'effet antifibrotique de cette molécule dans un modèle murin de fibrose pulmonaire (Iyer et al., 1995). La figure 40 montre la structure chimique de la pirféridone.

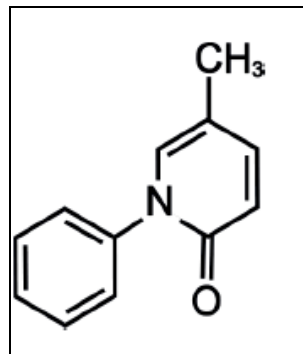


Figure 40: Structure chimique de la pirféridone (Macías-Barragán, 2010).

La cible moléculaire de la pirféridone reste inconnu, mais son effet antifibrosant a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Cottin et al., 2017). Cette molécule réduit la prolifération, la différenciation des fibroblastes et la synthèse du collagène induites par le TGF- β (Conte et al., 2014). En plus de cet effet antifibrosant, la pirféridone est dotée de propriétés anti-inflammatoires (Iyer et al., 2000) et anti-oxydantes (Pourgholamhossein et al., 2018).

Les essais cliniques CAPACITY-1 et -2 ont évalué l'efficacité de la pirfénidone par rapport à un placebo pour traiter le FPI (Cottin et al., 2017). Ces essais de phase III ont été menés sur 344 patients pour CAPACITY-1 et sur 435 patients pour CAPACITY-2. La posologie de pirfénidone commune à ces deux essais était de 2403 mg/j par voie orale (Noble et al., 2011). L'analyse statistique poolée de ces deux essais a montré un effet supérieur de la pirfénidone par rapport au placebo, notamment sur i) le déclin de la CVF après 72 semaines de traitement, ii) le % de patients présentant une dégradation de la CVF ≥ 10 % et iii) sur la réduction de la distance parcourue en 6 minutes (Noble et al., 2011). Ces résultats ont été confirmés par l'essai ASCEND, un autre essai de phase III qui a démontré en particulier une diminution du déclin annuel de la CVF qui était de 235 ml dans le groupe pirfénidone et de 428 ml dans le groupe de patients recevant le placebo (King et al., 2014).

Le profil de tolérance de la pirfénidone a été évalué au cours de plusieurs études cliniques chez les patients atteints de FPI (Valeyre et al., 2014). Les effets indésirables notés comprennent des symptômes gastro-intestinaux (nausée, diarrhée, anorexie, dyspepsie), cutanés (éruption, photosensibilité) ou neurologiques (vertige, fatigue) pouvant être associés à une atteinte hépatique (élévation des transaminases). Ces effets secondaires ont pu entraîner l'arrêt du traitement (Cottin et al., 2017). Cette molécule est aujourd'hui contre-indiquée chez les patients présentant une photosensibilité, une atteinte hépatique et rénale sévère (Cottin et al., 2017). Un co-traitement avec les inducteurs et les inhibiteurs des cytochromes CYP1A2 est déconseillé (Cottin et al., 2017).

2- Nintedanib

2.1- Présentation et mécanismes d'action du Nintedanib

Le nintedanib (NTD), ou BIBF1120, est commercialisé en France sous la forme d'éthanosulfonate de BIBF1120 avec le nom Ofev® (pour la FPI) et Vargatef® (pour les cancers). La figure 41 montre la structure chimique du NTD. Initialement, le NTD a été conçu comme une molécule anti-angiogénique pour la prise en charge de cancers. Mais actuellement son AMM ne concerne que la FPI.

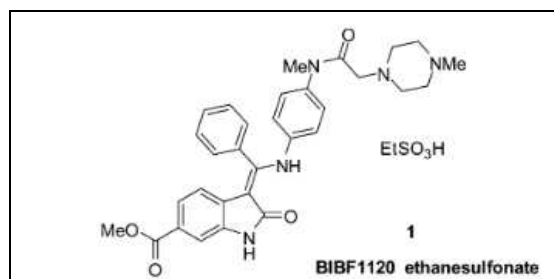


Figure 41: Structure chimique de l'éthanesulfonate du BIBF1120 (Roth et al., 2015).

A faibles concentrations (1 à 100 nM), le NTD est un inhibiteur de protéines à tyrosine kinase et notamment de différents récepteurs à tyrosine kinase (Varone et al., 2018). Ses propriétés inhibitrices ont été plus particulièrement décrites sur les récepteurs au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor receptor, VEGF-R), au FGF (Fibroblasts Growth Factor Receptor, FGRF-R) et au PDGF (PDGF-R) qui jouent un rôle essentiel dans le développement de la FPI (Wind et al., 2019; Wollin et al., 2015). Le NTD bloque le site de liaison à l'ATP des domaines kinases de ces récepteurs, ce qui inhibe leur autophosphorylation et prévient secondairement l'activation des voies de signalisation associées. Le niveau d'activation de ces récepteurs à tyrosines kinases est régulé par des tyrosines phosphatases, notamment par la protéine SHP2 (Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 2). L'expression de cette phosphatase est diminuée dans les fibroblastes isolés de patients atteints de FPI. À plus fortes concentrations (1 à 10 µM), le NTD agit comme un activateur de phosphatase. En particulier, il augmente l'expression de la protéine SHP2 (Varone et al., 2018). Il n'est actuellement pas connu si ces fortes concentrations de NTD peuvent être réellement atteintes dans les tissus pulmonaires de patients traités par ce médicament. La pertinence clinique de ce second mécanisme reste donc à clarifier. En interférant avec l'activité des récepteurs à tyrosine kinase, le NTD exerce des effets antifibrosants se manifestant par une inhibition de la migration, de la prolifération et de la différenciation des fibroblastes pulmonaires humains (Wollin et al., 2015) (voir figure 42).

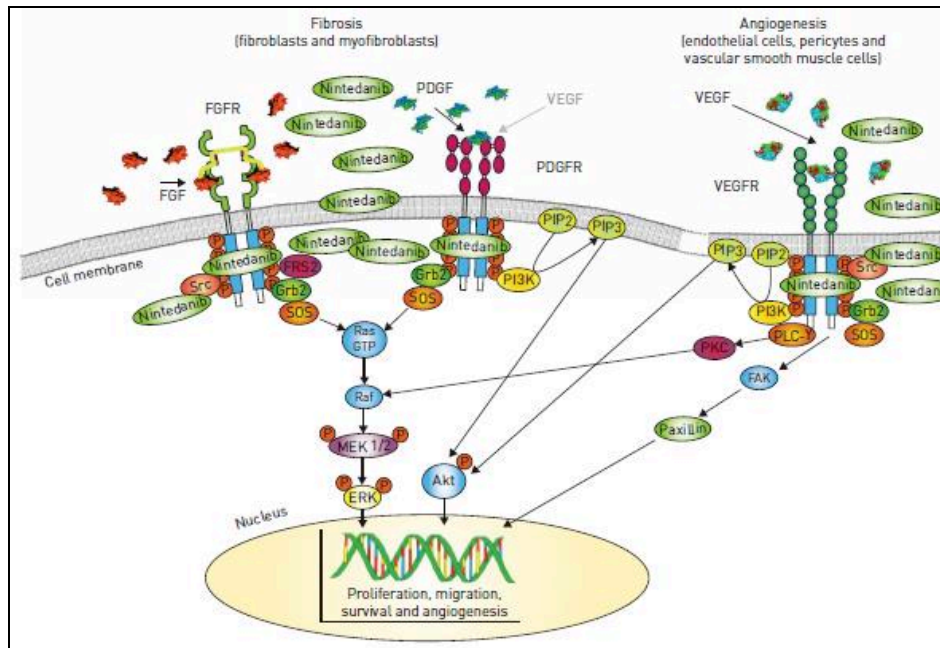


Figure 42: Mécanisme d'action du Nintedanib (Wollin et al., 2015).

Le NTD inhibe aussi des protéines à activité tyrosine kinase dont la kinase Flt-3 (Fms-like tyrosine-protein kinase-3). Cette dernière est exprimée à la surface des précurseurs hématopoïétiques et participe à l'hématopoïèse (Wollin et al., 2015). De plus, le NTD inhibe différents membres de la famille Src dont Lck (lymphocyte-specific tyrosineprotein kinase), Lyn (tyrosine-protein kinase lyn) et Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase src) (Wind et al., 2019). La kinase Lck est impliquée dans l'activation et la survie des LT alors que Lyn participe à la signalisation du récepteur BCR (B-cell antigen receptor) (Wollin et al., 2015). Les kinases Src sont fonctionnellement impliquées dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la mobilité et de l'adhérence cellulaire. L'inhibiteur de la famille Src (AZD0530) prévient *in vitro* l'activité des fibroblastes pulmonaires humains et réduit le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Wollin et al., 2015). Le tableau 4 résume les CI50 (Concentration Inhibitrice médiane) du NTD sur les différentes tyrosines kinases.

Kinase	IC ₅₀ (nM) ^a
VEGFR-1	34 ± 15
VEGFR-2	21 ± 13
VEGFR-2 (mouse)	13 ± 4
VEGFR-3	13 ± 10
FGFR-1	69 ± 70
FGFR-2	37 ± 2
FGFR-3	108 ± 41
FGFR-4	610 ± 117
PDGFR- α	59 ± 71
PDGFR- β	65 ± 7
Flt-3	26
Lck	16 ± 16
Lyn	195 ± 12
Src	156 ± 40

Tableau 4: Doses inhibitrices de NTD inhibant 50 % de l'activité (CI50) de différentes protéines kinases recombinantes humaines. Adapté selon (Roth et al., 2015).

2.2- Étude préclinique démontrant les effets antifibrosants

Les effets antifibrosants du NTD ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles expérimentaux. Les premières observations ont été rapportées avec le BIBF1000, un dérivé très proche du NTD au plan structural et fonctionnel. Chez le rat, l'administration orale du BIBF1000 diminue les dépôts de collagène et l'expression pulmonaire des protéines profibrosantes TGF- β et fibronectine induite par la bléomycine (Chaudhary et al., 2007). De plus, *in vitro*, le NTD inhibe la différenciation myofibroblastique de fibroblastes pulmonaires isolés de patients atteints de FPI puis stimulés par le TGF- β (Chaudhary et al., 2007). Les effets antifibrosants du BIBF 1000 ont été confirmés avec le NTD. *Wollin et coll* ont d'une part démontré *in vitro* l'activité inhibitrice du NTD sur la prolifération et la différenciation des fibroblastes pulmonaires issus de sujets sains (Wollin et al., 2014). D'autre part, ces auteurs ont démontré qu'*in vivo*, l'administration préventive ou curative du NTD réduit le score de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou la silice chez la souris. De plus, le NTD diminue également l'intensité de l'inflammation associée à la fibrose pulmonaire dans ces deux modèles expérimentaux. En particulier, cet inhibiteur réduit significativement le nombre de lymphocytes présents dans les liquides de LBA et le niveau d'expression de l'IL-1 β dans le tissu pulmonaire (Wollin et al., 2014). Durant la même année, *Hostettler et coll* ont publié une étude centrée sur les effets antifibrosants du NTD vis-à-vis de fibroblastes isolés de patients atteints de FPI et de sujets « contrôles » (Hostettler et al., 2014). Ces auteurs démontrent que

les fibroblastes de patients atteints de FPI présentent une expression basale de PDGF-R et de FGF-R plus élevée que celle des cellules de patients « contrôles » et que le NTD inhibe la prolifération de ces fibroblastes induite par le PDGF-BB, le FGF et le VEGF. Le NTD augmente aussi l'expression de la pro-MMP2, inhibe celle de TIMP2 et réduit la sécrétion du collagène induite par le TGF- β dans les fibroblastes pulmonaires (Hostettler et al., 2014). Plus récemment, *Sato et coll.* ont démontré que le NTD inhibe *in vitro* la migration et la différenciation de fibrocytes humains induites par le PDGF, le FGF ou le VEGF (Sato et al., 2017). Cet inhibiteur réduit également l'accumulation des fibrocytes dans le tissu pulmonaire dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine chez la souris (Sato et al., 2017). Enfin, le NTD réduit la fibrose pulmonaire et la TEM induites par la ventilation mécanique de souris traitées 5 jours auparavant par la bléomycine (Li et al., 2017b). A ce stade (5 jours), le traitement par la bléomycine induit essentiellement des lésions pulmonaires inflammatoires aiguës mais peu de fibrose. La ventilation mécanique de ces souris déclenche une réponse pro-fibrosante rapide. Dans ce modèle, le NTD prévient le développement de la fibrose pulmonaire secondaire à la ventilation mécanique, au moins en partie, en inhibant la production du TGF- β et l'activation de la kinase Src (Li et al., 2017b).

2.3- Études cliniques chez les patients souffrant de FPI

Les effets thérapeutiques du NTD chez les patients atteints de FPI ont été analysés dans trois études cliniques randomisées en double aveugle: l'étude clinique de phase II dite TOMORROW (To imprOve pulMonaRy fibROsis With BIBF1120) et les études cliniques de phase III dites INPULSIS-1 et-2 (Mazzei et al., 2015).

Dans l'étude TOMORROW, 432 patients atteints de FPI ont reçu un placebo ou du NTD par voie orale (50 mg/jour, 50 mg x2/jour, 100 mg x2/ jour ou 150 mg x2/jour) pendant 52 semaines. Les résultats montrent que les sujets traités par 150 mg de NTD deux fois par jour présentent une diminution significative du déclin de la CVF, une réduction de l'incidence des exacerbations aiguës et une légère amélioration de leur indice SGRQ (St George's Respiratory Questionnaire) de qualité de vie (Richeldi et al., 2011). Dans les études INPULSIS-1 et -2, 1066 patients souffrant de FPI, et provenant de 24 pays, ont reçu du NTD (150 mg x2/jour) ou un placebo pendant 52 semaines (Richeldi et al., 2014a, 2014b). Le premier critère de jugement était le déclin de la CVF. Les résultats ont confirmé un ralentissement significatif du déclin de la CVF chez les patients traités par le NTD. Dans l'étude INPULSIS-1, le déclin de la CVF était de 114,7 ml/ans dans le groupe NTD et de 239,9 ml/an dans le groupe placebo, soit une différence entre les deux groupes de 125,3 ml/an

($p < 0.0001$). Dans l'étude INPULSIS-2, la chute de CVF était de 113,6 ml/an et de 207,3 ml/an respectivement dans les groupes NTD et placebo, soit une différence de 93,7 ml/an ($p = 0.0002$) (Wollin et al., 2015). Ce ralentissement du déclin de la CVF est associé dans l'étude INPULSIS-2 à un allongement significatif du délai avant l'observation de la première exacerbation aiguë chez les patients atteints de FPI traités par le NTD.

En revanche, les études de TOMORROW et INPULSIS n'ont pas mis en évidence d'effet du NTD sur la mortalité des patients atteints de FPI. Cependant, une méta-analyse de l'ensemble des études cliniques, et les résultats d'études observationnelles, suggèrent que le traitement avec le NTD peut accroître l'espérance de vie de ces patients (Maher and Streck, 2019). A l'issue des trois études cliniques, une AMM a été délivrée en 2014 aux États-Unis et en 2015 en Europe pour le traitement de la FPI par le NTD (Wind et al., 2019). Actuellement, il est recommandé de prescrire du NTD (150 mg x2 / jour) chez les patients avec un diagnostic confirmé de FPI modérée, définie par une CVF ≥ 50 % de la valeur prédite et une valeur de DLco ≥ 30 % de la valeur prédite (Cottin et al., 2017).

2.4- La pharmacocinétique du NTD

Après une administration par voie orale, le NTD est rapidement absorbé au niveau intestinal, mais sa biodisponibilité est faible de l'ordre de 5 % seulement chez les humains (EMA, assessment report 2015). Cela résulte d'un premier passage intestinal et hépatique. Notamment, le NTD est un substrat de la P-gp (P-glycoprotéine), une protéine de transport d'efflux exprimée par les entérocytes, qui limite donc l'absorption intestinale du médicament. Une fois absorbé, le NTD se fixe fortement aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine, avec un pourcentage de l'ordre de 98 % chez les humains. La concentration plasmatique maximale (de 70 à 80 nM) est mesurée après 2 à 4 h, et l'équilibre est atteint après 6 jours (Wind et al., 2019). Le NTD se distribue dans l'ensemble de l'organisme et ne s'accumule pas. La demi-vie terminale du NTD est de 7 à 19 h (Varone et al., 2018). Au niveau hépatique, le NTD est principalement hydrolysé par des estérases (voie majeure, environ 60 %) ou déméthylé par le cytochrome CYP3A4 (voie mineure, environ 4 %) pour former respectivement les métabolites BIBF1202 et BIBF1053 (Wind et al., 2019) (voir figure 43). Une fraction du métabolite BIBF1202 est ensuite glucurono-conjugué par l'UGT1A1 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT). L'élimination rénale du NTD et de ses métabolites est très négligeable. L'excrétion fécale/biliaire est la voie principale d'élimination (93.4%) du NTD non métabolisé (environ 20 %) et de ses produits de biotransformation (Varone et al., 2018; Wind et al., 2019).

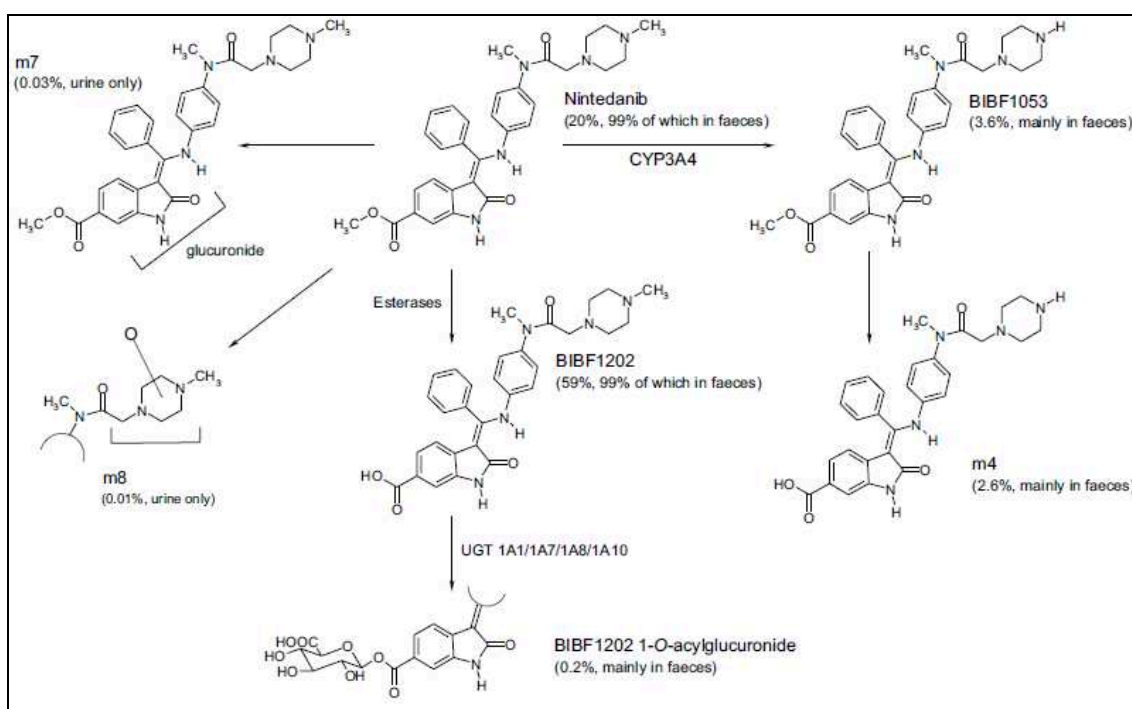


Figure 43: Métabolisme et excrétion du Nintedanib (Wind et al., 2019).

2.5- La tolérance du NTD chez les patients souffrant de FPI

Le profil de tolérance de NTD a été étudié au cours des essais cliniques TOMORROW et INPULSIS. Les effets secondaires les plus communs sont gastro-intestinaux, il s'agit principalement de diarrhées (60 %) (Cottin et al., 2017; Richeldi et al., 2014b). Cependant l'intensité de cet effet indésirable est généralement modérée et n'a conduit à un arrêt définitif du traitement que chez seulement 5 % des patients recevant du NTD au long terme (Crestani et al., 2019). D'autres effets indésirables sont notés telles que des nausées, une perte de poids et d'appétit. De plus, un traitement standard par du NTD peut augmenter les concentrations plasmatiques des enzymes hépatiques mais une toxicité hépatique est rarement à l'origine d'un arrêt du traitement. Toutefois, il est déconseillé de prescrire du NTD chez les patients présentant une atteinte sévère du foie. Il est intéressant de noter que la diminution de la posologie du NTD, en deçà des doses standards (150mg x2/jour), chez les patients présentant ces effets indésirables, n'a pas eu de conséquence sur le déclin de la CVF (Varone et al., 2018). Enfin théoriquement, le NTD peut induire des saignements étant donné son activité anti-angiogénique (anti-VEGFR), mais la fréquence de ces effets indésirables n'est pas augmentée chez les patients recevant du NTD. Toutefois, il est prudent de surveiller

étroitement les patients présentant un risque hémorragique ou cardiovasculaire et traités par le NTD. Enfin, les médicaments inhibant ou induisant le CYP3A4 ou la P-gp peuvent interférer avec le métabolisme hépatique du NTD, modifier ses concentrations plasmatiques et ainsi perturber ses effets thérapeutiques et/ou indésirables (Varone et al., 2018).

Objectifs de la thèse

La prise en charge pharmacologique de la FPI repose sur l'utilisation de deux médicaments antifibrosants, la pirfénidone et le nintédanib (NTD) qui ralentissent le déclin de la fonction respiratoire. Le NTD est un inhibiteur des protéines à tyrosine kinase, notamment des récepteurs à tyrosine kinase du PDGF, VEGF et FGF qui jouent un rôle essentiel dans le développement de la FPI. En interférant avec l'activité de ces récepteurs, le NTD inhibe *in vitro* l'activation, la prolifération et la différenciation des fibroblastes pulmonaires humains. Par ailleurs, le NTD diminue l'intensité de l'inflammation associée au processus de fibrose pulmonaire induite expérimentalement chez la souris. De plus, à de très faibles concentrations compatibles avec celles mesurées dans le plasma de patients traités par le NTD, cet antifibrosant inhibe l'activité kinase de la protéine recombinante du récepteur CSF-1R humain. L'activation du CSF-1R par son ligand CSF-1 contrôle différentes propriétés essentielles du macrophage humain, telles que la survie et l'adhérence.

Le macrophage pulmonaire est un acteur cellulaire majeur favorisant le développement de la FPI. Il sécrète des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes qui contribuent notamment à l'infiltration, à la prolifération et à l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. La répétition des agressions de l'épithélium alvéolaire stimule l'infiltration du tissu pulmonaire par des monocytes du sang périphérique puis leur différenciation en macrophage interstitiel et/ou alvéolaire. Selon leur microenvironnement, ces cellules immunitaires clés peuvent se polariser *in situ* en macrophages « pro-inflammatoires » M1 ou « pro-fibrosants » M2. Expérimentalement, la déplétion des monocytes circulants ou l'inactivation génétique du CSF-1 chez la souris réduit le pool de macrophages pulmonaires et diminue l'intensité de la fibrose pulmonaire induits par la bléomycine. Enfin, les concentrations de CSF-1 sont augmentées dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires de patients atteints de FPI. Il est donc probable que le CSF-1 puisse contribuer au développement de la fibrose pulmonaire humaine en contrôlant l'émergence et/ou le maintien d'un pool de macrophages pulmonaires matures. En bloquant l'activation du récepteur CSF-1R, le NTD pourrait donc interférer avec les propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrosantes du macrophage humain, notamment au niveau du tissu pulmonaire. Lorsque j'ai débuté mes travaux de thèse, l'impact de NTD sur les fonctions du macrophage humain différencié à partir du monocyte circulant n'était pas connu.

Le premier objectif de ma thèse a donc été de caractériser les effets de faibles concentrations de NTD i) sur les fonctions du macrophage humain différencié par le CSF-1 à

partir de monocyte circulant et ii) sur la polarisation du macrophage en cellule pro-inflammatoire M1 ou pro-fibrosante M2. Au cours de ce travail, j'ai étudié l'impact du NTD sur la viabilité et l'adhérence cellulaire, l'expression membranaire des marqueurs de différenciation et sur l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et/ou pro-fibrosantes.

Cette première étude a notamment mis en évidence la capacité du NTD à bloquer l'expression et la sécrétion de la chimiokine CXCL13 par le macrophage M1. CXCL13 contrôle la formation d'îlots lymphoïdes dans différents organes et au cours de maladies inflammatoires chroniques. C'est un biomarqueur pronostique de la FPI dont l'expression est augmentée dans le tissu pulmonaire des patients. Dans le tissu pulmonaire, CXCL13 est fortement détectée dans les agrégats lymphoïdes situés au niveau de zones de fibrose. Selon les résultats d'une étude, cette chimiokine serait exprimée par des cellules CD68⁺ du lignage monocyte/macrophage. Cependant, lors du démarrage de cette thèse, l'origine cellulaire précise de CXCL13 et les voies de signalisation contrôlant son expression restaient à démontrer. Le second objectif de ma thèse a donc été i) de caractériser l'expression de CXCL13 dans les macrophages de tissus pulmonaires sur des biopsies pulmonaires chirurgicales de patients atteints de FPI et ii) de décrire *in vitro* les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant l'expression de CXCL13 dans les macrophages humains différenciés à partir des monocytes sanguins ou isolés des liquides de lavages bronchoalvéolaires.

Chapitre IV:
RESULTATS

Article 1:

Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib

Nessrine Bellamri, Claudie Morzadec, Audrey Joannes, Valérie Lecreur, Lutz Wollin, Stéphane Jouneau, Laurent Vernhet.

Int Immunopharmacol. 72 (2019) 112-123.

Un résumé en français et sans figure est présenté ci-dessous. Il précède l'article original déjà publié.

I- Contexte et justification de l'étude

Le nintedanib (NTD), un médicament antifibrosant, ralentit le déclin de la fonction respiratoire et le taux d'exacerbations aiguës chez les patients atteints de FPI. Au niveau moléculaire, le NTD est un inhibiteur des protéines à tyrosines kinases tels que les récepteurs au PDGF, FGF et VEGF. *In vitro*, il exerce son effet antifibrotique sur des fibroblastes pulmonaires isolés de patients atteints de FPI très probablement en bloquant l'activité de ces trois récepteurs. En plus de ces propriétés, différentes études ont démontré que le NTD diminue les processus inflammatoires induits dans des modèles de fibrose pulmonaire, hépatique, rénale et cutanée. Le NTD réduit *in vivo* l'infiltration des lymphocytes et des neutrophiles dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la silice ou la bléomycine. Il prévient également l'infiltration des macrophages dans le modèle d'obstruction urétérale unilatérale. Enfin, le NTD diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans ces différents modèles de fibrose, dont celle de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-6.

Par ailleurs, le NTD inhibe l'activité kinase de la protéine recombinante du récepteur CSF-1R humain. Ce récepteur, activé par les ligands CSF-1 ou l'IL-34, est majoritairement exprimé par les cellules myéloïdes. Le complexe CSF-1/CSF-1R contrôle la différenciation, l'adhérence et la mobilité des macrophages via l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK/ERK. Il est aujourd'hui admis que le macrophage différencié à partir des monocytes sanguins joue un rôle prépondérant dans le développement de la fibrose pulmonaire. De plus, l'inactivation du gène codant le CSF-1 réduit fortement le pool des macrophages alvéolaires et l'intensité de la fibrose pulmonaire induits par la bléomycine chez la souris. Cette délétion diminue la production de la chimiokine CCL2 qui contribue également au processus fibrosant en stimulant l'infiltration des monocytes. En inhibant l'activité kinase du CSF-1R et en prévenant secondairement l'activation des voies de

signalisation induite par le complexe CSF-1/CSF-1R, le NTD pourrait donc moduler les fonctions pro-inflammatoires et/ou pro-fibrosante du macrophage humain.

Afin d'explorer cette hypothèse, des monocytes de sang périphérique humain ont été différenciés en macrophages matures M0 par du CSF-1 (50 ng/ml) pendant 6 à 7 jours. Ces macrophages ont ensuite été prétraités par des concentrations croissantes de NTD (10 nM-1000 nM), puis maintenues en culture en présence de CSF-1 (20 ng/ml), ou polarisés en macrophages M1 ou M2a, respectivement, par les combinaisons lipopolysaccharide (LPS)/Interféron-g (IFN- γ) (20 ng/ml) ou IL-4/IL-13 (20 ng/ml).

II- Résumé des principaux résultats

1- Le NTD inhibe la phosphorylation de CSF-1R et l'activation des voies de signalisation induites par le CSF-1

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'effet du NTD sur la cinétique de phosphorylation du CSF-1R induite par le CSF-1 dans le macrophage M0. Nos résultats montrent, comme attendu, que le niveau de phosphorylation de CSF-1R est maximal dès une minute de stimulation puis qu'il décroît progressivement avec le temps. Cette phosphorylation de CSF-1R est associée à l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK/ERK. Le GW2580 (GW), un antagoniste spécifique du CSF-1R, bloque totalement l'activation de ces deux voies alors que le LY294002 un inhibiteur de la voie PI3K (Ly294002, LY), bloque uniquement la voie PI3K/AKT. Le traitement des macrophages M0 par le NTD inhibe de façon dose-dépendante le niveau de phosphorylation de CSF-1R. En effet, à 10 nM, le NTD diminue de 50 % le niveau de phosphorylation de CSF-1R, et cette inhibition est totale à des concentrations > à 200 nM. Le NTD réduit aussi la phosphorylation d'AKT et d'ERK mais uniquement pour des concentrations supérieures à 100-200 nM.

2- Le NTD réduit l'adhérence des macrophages M0 et la sécrétion de CCL2

Afin de déterminer les conséquences de l'inhibition des voies de signalisation résultant du blocage du CSF-1R par le NTD, nous avons étudié l'adhérence des macrophages M0, leur phénotype et la sécrétion de la chimiokine CCL2 qui est normalement fortement induite par CSF-1. Comme le GW et le LY, le NTD diminue fortement l'adhérence des macrophages M0 induite par le CSF-1, avec un effet significatif pour des concentrations > 200 nM. Afin de déterminer si cette baisse de l'adhérence cellulaire résulte d'un effet cytotoxique du NTD, nous avons étudié son impact sur la viabilité des macrophages M0 en mesurant la mort cellulaire (marquage Annexin V/Iodure de propidium) par cytométrie en flux. Nos résultats

démontrent que, de manière similaire aux inhibiteurs GW et LY, le NTD n'induit pas de cytotoxicité pour des concentrations < 1 μ M. Le NTD ne modifie pas non plus l'expression membranaire des marqueurs de différenciation CD71 et CD206. En revanche, comme le GW et le LY, il bloque l'expression du gène codant CCL2 et réduit la sécrétion de CCL2 induite par CSF-1.

3- Le NTD diminue partiellement l'expression des marqueurs phénotypiques M2a mais ne modifie pas celle des marqueurs M1

L'inhibition de la voie CSF-1/CSF-1R par le GW ne modifie pas les expressions membranaires des marqueurs de polarisation M1 (CD80, CD86, CD40 et CD83) et M2a (CD11b, CD200R, CD206 et CD209), ce qui indique que ces expressions sont maintenues indépendamment de la voie CSF-1/CSF-1R dans le macrophage humain. Le NTD n'a aucun effet sur l'expression des marqueurs M1 mais il diminue partiellement l'expression des quatre marqueurs M2a. Les effets du NTD sur l'expression de ces marqueurs de polarisation seraient donc indépendants de l'inhibition de l'axe CSF-1/CSF-1R.

4- Le NTD diminue l'expression de différentes cytokines par le macrophage M1

Comme le GW, le NTD diminue significativement la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-8 par le macrophage M1. Cependant, contrairement au GW, le NTD réduit également les niveaux d'ARNm et de protéines de l'IL-10 et de CXCL13, donc très probablement d'une manière indépendante de la voie CSF-1/CSF-1R. Ce résultat suggère que le NTD bloque le CSF-1R mais qu'il interfère aussi avec une ou plusieurs autres cibles moléculaires dans le macrophage M1. En revanche, comme le GW, le NTD a très peu d'impact sur l'expression des cytokines pro-fibrosantes CCL22 et PDGF-BB dans les macrophages M2a, mais il augmente celle de la chimiokine pro-fibrotique CCL18 lorsqu'il est utilisé à sa plus forte concentration (1 μ M).

III- Conclusions

Nos résultats démontrent que le NTD exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant l'expression de l'IL-1 β , IL-8, IL-10, CCL2 et de CXCL13 qui jouent un rôle important dans le développement de la fibrose pulmonaire. Ces résultats sont en accord avec ceux démontrant l'effet anti-inflammatoire du NTD dans différents modèles murins de fibrose. La pertinence clinique de ces résultats reste toutefois incertaine car le NTD altère *in vitro* la fonction des macrophages à des concentrations supérieures à celles mesurées dans le plasma de patients

atteints de FPI. En effet, le NTD altère significativement le phénotype des macrophages seulement à des concentrations > 200 nM alors que les concentrations sanguines de NTD mesurées chez les patients atteints de FPI sont < 100 nM. Pour étudier les propriétés immunomodulatrices du NTD chez ces malades, il serait intéressant de mesurer les concentrations sanguines de diverses cytokines pro-inflammatoires (et/ou pro-fibrosantes) avant et après l'administration de ce médicament.



Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib

Nessrine Bellamri^a, Claudie Morzadec^a, Audrey Joannes^a, Valérie Lecureur^a, Lutz Wollin^b, Stéphane Jouneau^{c,d,1}, Laurent Vernhet^{a,*,1}

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

^b Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, KG, Biberach an der Riss, Germany

^c Department of Respiratory Diseases, Competence Centre for Rare Pulmonary Disease, Rennes University Hospital, 35033, Rennes, France

^d Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Nintedanib
Idiopathic pulmonary fibrosis
Inflammation
Macrophages
CSF1R
Polarization

ABSTRACT

The tyrosine kinase inhibitor, Nintedanib (NTD), has been approved for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In cell-free systems, NTD was recently shown to inhibit kinase activity of the human recombinant colony-stimulating factor 1 (CSF1) receptor (CSF1R) which mediates major functions of pulmonary macrophages. In the present study, we have investigated the effects of NTD on the phenotype of human monocyte-derived macrophages controlled by CSF1 in order to identify its anti-inflammatory properties via CSF1R inhibition. NTD (0.01 to 1 μ M) prevented the CSF1-induced phosphorylation of CSF1R and activation of the downstream signaling pathways. NTD, like the CSF1R inhibitor GW2580, significantly decreased the adhesion of macrophages and production of the chemokine ligand (CCL) 2. NTD also altered the polarization of macrophages to classical M1 and alternative M2a macrophages. It reduced the secretion of several pro-inflammatory and/or pro-fibrotic cytokines (IL-1 β , IL-8, IL-10 and CXCL13) by M1 macrophages but did not prevent the expression of M1 markers. While NTD (50–200 nM) partially blocked the synthesis of M2a markers (CD11b, CD200R, CD206, and CD209), it did not reduce synthesis of the M2a pro-fibrotic cytokines CCL22 and PDGF-BB, and increased CCL18 release when used at its highest concentration (1 μ M). The effects of NTD on macrophage polarization only was partially mimicked by GW2580, suggesting that the drug inhibits other molecules in addition to CSF1R. In conclusion, NTD alters the CSF1-controlled phenotype of human macrophages mainly by blocking the activation of CSF1R that thus constitutes a new molecular target of NTD, at least in vitro.

1. Introduction

The anti-fibrotic drug nintedanib (NTD) has been approved for the management of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [1]. It reduces the annual decrease in forced vital capacity and acute exacerbations in patients suffering from this progressive, irreversible lung disease [2]. This tyrosine kinase inhibitor blocks the ATP-binding sites within the kinase domains of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) receptors [3]. It also inhibits the PDGF, VEGF or bFGF-dependent proliferation of fibroblasts isolated from the lungs of IPF patients [4,5].

In addition, several studies have shown that NTD prevents the development of inflammatory processes during fibrosis in murine models of lung, liver, renal and skin fibrosis [4,6–8]. It reduces the infiltration of lymphocytes and neutrophils induced by silica or bleomycin in lungs [4] and it decreases the infiltration of macrophages induced by unilateral ureteral obstruction in kidney [7]. Moreover, NTD markedly prevents the expression of major pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-(IL-)1 β , IL-6 or chemokine ligand (CCL) 2 (CCL2), in fibrotic liver, lung and kidneys.

A recent screening of a wide range of kinases in cell-free systems demonstrated that low concentrations (IC₅₀ = 5 \pm 2 nM) of NTD

Abbreviations: NTD, nintedanib; CSF1, colony-stimulating factor 1; CSF1R, colony-stimulating factor 1 receptor; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; IL, interleukin; CCL, C-C motif chemokine ligand; INF, interferon- γ

* Corresponding author.

E-mail address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr (L. Vernhet).

¹ Stéphane Jouneau and Laurent Vernhet contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.061>

Received 1 February 2019; Received in revised form 18 March 2019; Accepted 28 March 2019

1567-5769/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

inhibit the kinase activity of human recombinant colony-stimulating factor 1 (CSF1) receptor (CSF1R) [9]. This receptor, activated by CSF1 (also called macrophage colony-stimulating factor) and IL-34, is mainly expressed in myeloid cells [10]. The CSF1R/CSF1 complex plays major roles in innate immunity and bone remodeling by osteoclasts, but it also possesses an oncogenic potential due to its aberrant expression in several human tumors cells [11]. Overall, CSF1 is a main hematopoietic growth factor for cells of the monocyte lineage. CSF1 bound to CSF1R activates several intracellular signal pathways, such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), inducing the differentiation of monocytes into mature macrophages and promoting their adhesion, spreading and motility [10]. CSF1 also stimulates the production of the chemokine CCL2 by macrophages, which contributes significantly to lung fibrosis [12]. The capacity of NTD to inhibit CSF1R activation and downstream signals in vitro has never been investigated although CSF1-activated macrophages are important in pulmonary inflammation and fibrosis [12,13]. Indeed, the pulmonary tissues of CSF1^{-/-} and CCL2^{-/-} mice have less macrophage infiltration, collagen deposition and fibrosis in response to bleomycin than do those of wild-type mice [12]. The accumulation of lung macrophages and subsequent pulmonary fibrosis suffered by mice after thorax irradiation is blocked by inhibiting CSF1R [13]. These pulmonary macrophages may differentiate from circulating monocytes that infiltrate the lungs in response to pro-fibrotic stimuli [14]. In fact, the genetic deletion of monocyte-derived macrophages or the depletion of circulating monocytes by liposomal clodronate potently reduces the number of alveolar macrophages and the development of lung fibrosis in different murine models [15,16]. In humans, the bronchoalveolar lavage fluids of patients with IPF contain higher concentrations of CSF1 and CCL2 than do those of healthy controls [12]. CSF1 specifically stimulates the production of the CD163 marker in human monocyte-derived macrophages [17], and above-normal numbers of CD163-positive macrophages have been detected in fibrotic areas of the lungs of IPF and irradiated patients [12,13]. Altogether, these results suggest that NTD may exert anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in the lungs by altering the phenotype of human CSF1-dependent macrophages through CSF1R inhibition.

We have investigated this relationship to obtain a clearer picture of the anti-inflammatory effects of the drug on human macrophages. To this goal, we exposed primary cultures of human monocyte-derived macrophages, differentiated with CSF1, to nanomolar concentrations of NTD that were in the range of the blood plasma drug concentrations measured in patients with IPF after a steady-state standard dosing of two times 150 mg per day [18]. In these patients, the highest NTD blood concentrations were about 70 nM. Our results demonstrate that NTD (10–1000 nM) inhibited the phosphorylation of CSF1R and the downstream signaling pathways induced by CSF1 in human macrophages. At 200–1000 nM, NTD reduced the adhesion of CSF1 macrophages, without inducing cytotoxicity, and repressed the expression of CCL2. In addition, NTD (200–1000 nM) altered the polarization of human macrophages by decreasing the production of pro-fibrotic cytokines and the membrane expression of markers in M1 and M2a macrophages, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

NTD [BIBF-1120, methyl (3Z)-3-[(4-[N-methyl-2-(4-methylpiperazin-1-yl)acetamido]phenyl)amino](phenyl)methylidene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylate ethane sulfonate salt] was provided by Boehringer Ingelheim Pharma GmbH (Biberach, Germany). CSF1 was purchased from Miltenyi Biotec (Paris, France). Lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O55:B5), the PI3K inhibitor LY294002, and GW2580, an ATP-competitive inhibitor of CSF1R, were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Interferon- γ (IFN), IL-4 and IL-13 were obtained from PeproTech (Neuilly-sur-seine, France).

Crystalline silica (DQ12, 100 μ g/mL) was from DMT GMBH, Germany. Primary antibodies (Ab) against phospho-CSF1R (Tyr723), CSF1R, phospho-AKT (Ser473), AKT, phospho-p44/42 extracellular regulated kinases (ERK) (Thr202/Tyr204), ERK, and GAPDH were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France).

2.2. Cell culture and treatments

Human macrophages were differentiated from peripheral human blood monocytes. Each donor gave his/her written consent for the use of blood samples for research (Etablissement Français du Sang). Briefly, peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were first isolated by a Ficoll (reference CMSMSL01, Eurobio, Les Ulis, France) gradient centrifugation, and then monocytes were selected by a 2 h adhesion step. These cells were cultured for 6–7 days in RPMI 1640 medium GlutaMAX (Gibco, Life technologies), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 20 IU/mL penicillin, 20 μ g/mL streptomycin and 50 ng/mL CSF1 to obtain mature M0 macrophages [19]. These M0 macrophages were cultured in complete RPMI-1640 medium with or without 10 ng/mL CSF1. They were polarized by culturing them for 24 h in RPMI medium containing 5% FBS, 10 ng/mL CSF1 and appropriate cytokines, as follows: incubation with 20 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN polarized them into classical M1 macrophages while incubation with 20 ng/mL IL-4 + 20 ng/mL IL-13 resulted in alternative M2a macrophages [20]. For each biological endpoint assessed in the present study, all biological replicates were performed with macrophages differentiated from blood monocytes collected from different donors. Overall, we isolated peripheral blood monocytes from 36 different donors.

For treatments, the M0 macrophages were incubated with NTD (0.1 to 1 μ M) for 2 h and then stimulated with CSF1 or polarized to M1 or M2a macrophages. In some experiments, M0 macrophages were first treated with LPS/IFN for 4 h and then cultured with 100 μ g/mL silica for 16 h to induce IL-1 β secretion and inflammasome activity. NTD remained in the culture medium during polarization. A 1 mM stock solution of NTD was prepared by dissolving it in water at 50 °C.

2.3. Cell viability

Cell viability was measured by flow cytometry using the FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, adherent and floating cells were harvested and centrifuged at 600g for 5 min at room temperature. Macrophages were detached with Accutase™ (Biolegends, London, UK), washed with cold PBS and suspended in binding buffer (PBS, 2% FBS). Cells (100,000) were placed in a flow cytometer tube and incubated with FITC Annexin-V (A5) and propidium iodide (PI) for 15 min. Stained cells were analyzed in an LSR II cytometer with FACSDiva software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Viable cells were defined as A5- and PI-negative cells.

2.4. Cell adhesion

Cell adhesion was determined by measuring the number of adherent cells using the CyQuant® GR Dyes, which generate intense fluorescence when bound to DNA (ThermoFisher Scientific, France). Briefly, macrophages (10,000 cells/cm²) were placed in 96-well culture plates, treated (or not) with NTD for 2 h, and cultured for up to 72 h with or without CSF1. The cells were then washed to eliminate floating cells and incubated with the CyQuant® GR Dyes for 1 h at room temperature. The number of adherent cells was directly proportional to the level of intracellular DNA and consequently to fluorescence intensity of the DNA-bound dye. Cell fluorescence was quantified on a POLARstar® Omega microplate reader (BMG Labtech, France), using excitation at 485 nm and emission at 530 nm. Each experiment was repeated three times and each result is the mean of the three replicates.

2.5. Western blotting

Treated cells were lysed with a RIPA buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% Na deoxycholate, 50 mM sodium fluoride (NaF), 5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Meylan, France) and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich). Whole cell lysates were centrifuged at 13000 rpm for 5 min and the supernatants collected and heated at 95 °C for 5 min to denature proteins. These lysates were placed onto 4% stacking gels and separated by SDS electrophoresis (8% or 10% gels). The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting overnight (30 V at 4 °C) and free binding sites were blocked by incubation in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 4% bovine serum albumin. The blocked membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary Abs (1/1000), then with horseradish peroxidase-conjugated secondary Abs (1/2000), and the visualised bands analyzed by densitometry (Image Lab™ Software for total protein normalization; BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The clone and reference of all Abs used for Western blot analysis are summarized in the Table S1.

2.6. Flow cytometry

Macrophage phenotypes were analyzed by direct immunofluorescence using flow cytometry. Washed, detached cells were stained with Fixable Viability Stain 450 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) for 10 min at room temperature to measure viability. Non-specific Ab binding sites on cells were blocked by incubating them in PBS containing 2% FBS and FcR blocking reagent (reference 130–059–901, Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) for 10 min at room temperature. Cells were next incubated with a specific Ab or its isotypic control for 20 min at 4 °C, washed in PBS and collected by centrifugation (2500 rpm for 5 min). Ab binding was analyzed in an LSR II cytometer and FACSDiva software. The M0, M1 and M2a macrophage phenotypes were characterized using three Ab panels. M0 panel: FITC anti-CD14, PE anti-CD206 and APC anti-CD71; M1 panel: FITC anti-CD86, PE anti-CD40, PeCya7 anti-CD80 and APC anti-CD83; M2a panel: APC anti-CD200R, PE anti-CD206, BB515 anti-CD11b and PEVio770 anti-CD209. The clone and reference of these Abs are summarized in the Table S2. Results are expressed as the ratio of median fluorescence intensity (MFI) calculated as: MFI (test Ab)/MFI (isotype control Ab).

2.7. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from cells with the Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, France) and was submitted to reverse transcription using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, France). Quantitative PCR were performed with the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (BioRad) [21]. Primers for gene expression analysis were purchased from Sigma-Aldrich. The specificity of gene amplification was checked at the end of PCR by analyzing amplification curves using the comparative cycle threshold method (CFX Manager™ Software). This software automatically sets the fluorescence baseline for each well and computes the optimal quantification cycle (Cq) with a multivariate, nonlinear regression model. These mean Cq values were used to normalize the steady-state target mRNA concentrations to those of the 18S ribosomal protein by the $2(-\Delta\Delta Cq)$ method.

2.8. Quantification of cytokines

The amounts of human IL-1 β , IL-8, IL-10, CXCL13, PDGF-BB, CCL18, and CCL22 secreted into the medium of macrophage cultures

were measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using appropriate Duoset ELISA development system kits (R&D Systems Europe, Lille, France).

2.9. Statistic analysis

The Gaussian distribution of values was first verified using D'Agostino & Pearson and Kolmogorov-Smirnov tests. Since values followed a normal distribution, the results were presented as mean \pm standard deviation (SD) of the indicated numbers of independent experiments. Significant differences were assessed using a Student *t*-test when only two variables were studied in a same experiment or ANOVA followed by the multi-range Dunnett's *t*-test when an experiment involved more than two variables. A paired Student *t*-test or a repeated ANOVA was used when the matching was effective. Differences between means were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Influence of NTD on CSF1R-dependent signaling pathways in human M0 macrophages

We first measured the kinetics of CSF1-dependent CSF1R phosphorylation in human M0 macrophages. The levels of phosphor-CSF1R was maximal after incubation for 1 min and then progressively decreased during 1 h (Fig. 1A). The binding of CSF1 to its receptor activates the PI3K and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, to ultimately trigger the phosphorylation of the serine/threonine kinases AKT (PI3K) and p42/p44 ERK (MAPK). Indeed, incubation with CSF1 for 1 to 5 min increased the phosphorylation of AKT and p42/p44 ERK in M0 macrophages. We used the PI3K inhibitor LY294002 and the CSF1R antagonist GW2580 to confirm the role of CSF1R in the phosphorylation of AKT and ERK. LY294002 totally blocked AKT phosphorylation but had no effect on the phosphorylation of CSF1R or p42/p44 ERK in macrophages incubated with CSF1 for 5 min (Fig. 1B). In contrast, GW2580 not only prevented the phosphorylation of CSF1R but also that of AKT and p42/p44 ERK. NTD inhibited, in a concentration-dependent manner, the phosphorylation of CSF1R in stimulated macrophages (Fig. 1C). NTD (10 nM) significantly decreased (approximately 50%) the levels of phosphorylated CSF1R, while higher NTD concentrations (> 200 nM) almost totally inhibited CSF1R phosphorylation in M0 macrophages. The drug also reduced the phosphorylation of AKT and p42/p44 ERK, but this effect was only significant for concentrations > 100 nM (AKT) or 200 nM (ERK). Fig. S1 shows uncropped images of the original Western blots.

3.2. NTD and adhesion of human M0 macrophages

We then determined cellular consequences of inhibiting the CSF1R-dependent signaling pathways in M0 macrophages. Human M0 macrophages cultured for 72 h with 50 ng/mL CSF1 remained spindle-shaped, adhered firmly and did not proliferate. Phase contrast microscopy shows that the number of adherent macrophages after culture without CSF1 for 72 h was much lower (Fig. 2A). Similarly, NTD caused the cells to round up and seemed to reduce adhesion in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). We verified these effects by staining the nuclei of adherent macrophages and measuring cell fluorescence. Those cultured without CSF1 for 72 h (CTR) or containing CSF1 plus GW2580 or LY294002, had significantly fewer adherent macrophages (Fig. 2B, left panel). NTD also caused a concentration-dependent reduction in macrophage adhesion (Fig. 2B, right panel). Its effect was detectable at 50 nM and became significant at concentrations > 200 nM. NTD (200 nM) reduced the number of adhering macrophages by 47.8%. We next determined whether the cells became detached due to cytotoxicity by analyzing the viability of floating and adherent cells cultured for 72 h under the same experimental conditions. The percentage of viable

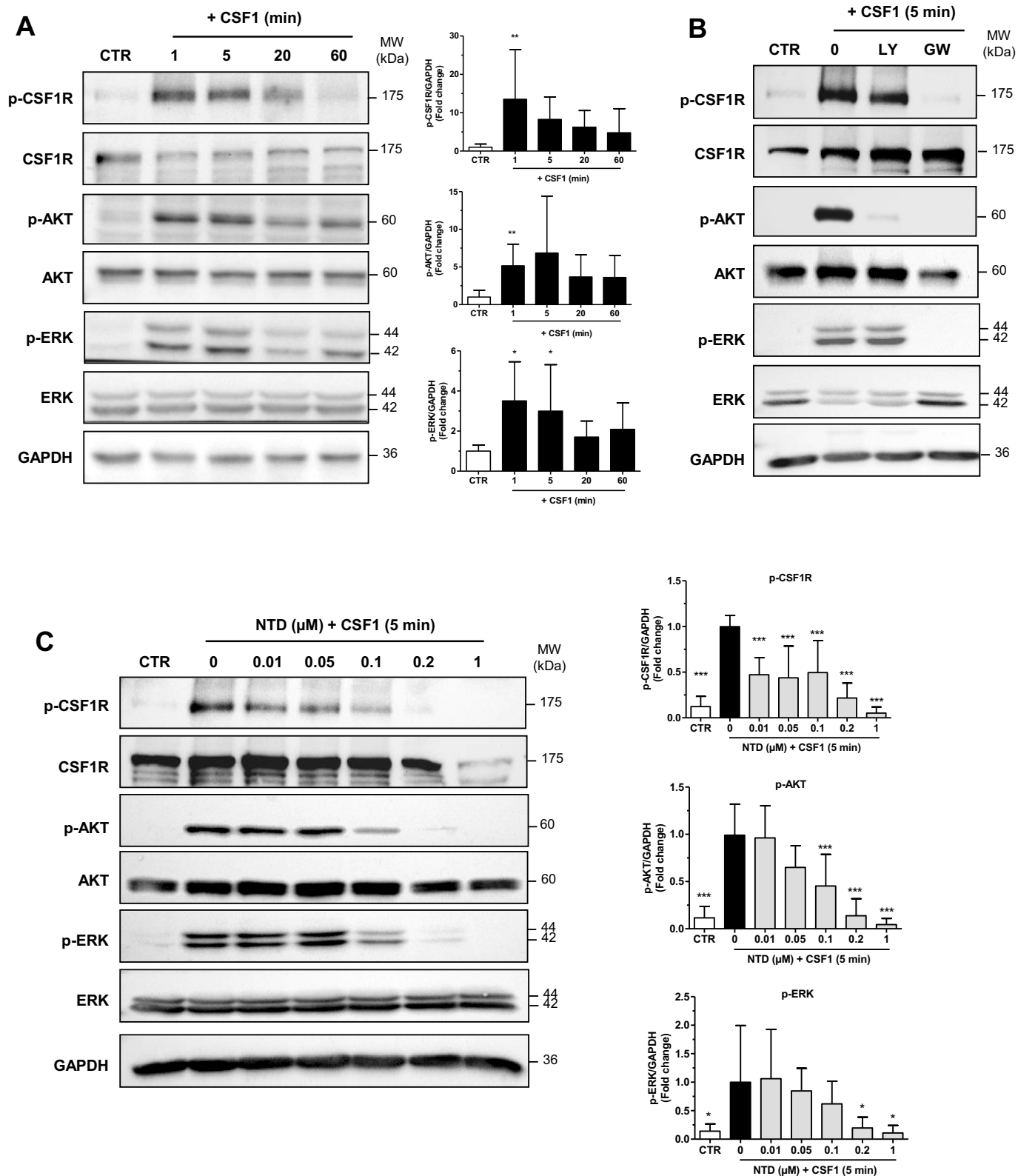


Fig. 1. NTD inhibits CSF1-induced CSF1R phosphorylation and downstream signaling pathways in human monocyte-derived macrophages. Macrophages were washed and left untreated (CTR, 0) (A-C), incubated with 10 μM LY294002 (LY) (B), 10 μM GW2580 (GW) (B) or NTD at 10–1000 nM (C), and then stimulated with 50 ng/mL CSF1. Cells were then lysed and analyzed by Western blotting. (A, C): right panel, the levels on phospho (p)-CSF-1R, p-AKT and p-ERK were measured by densitometry. The results are means ± SD of 5 (A) and 8 (C) independent experiments. (B): blots are representative of 4 independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus “0”.

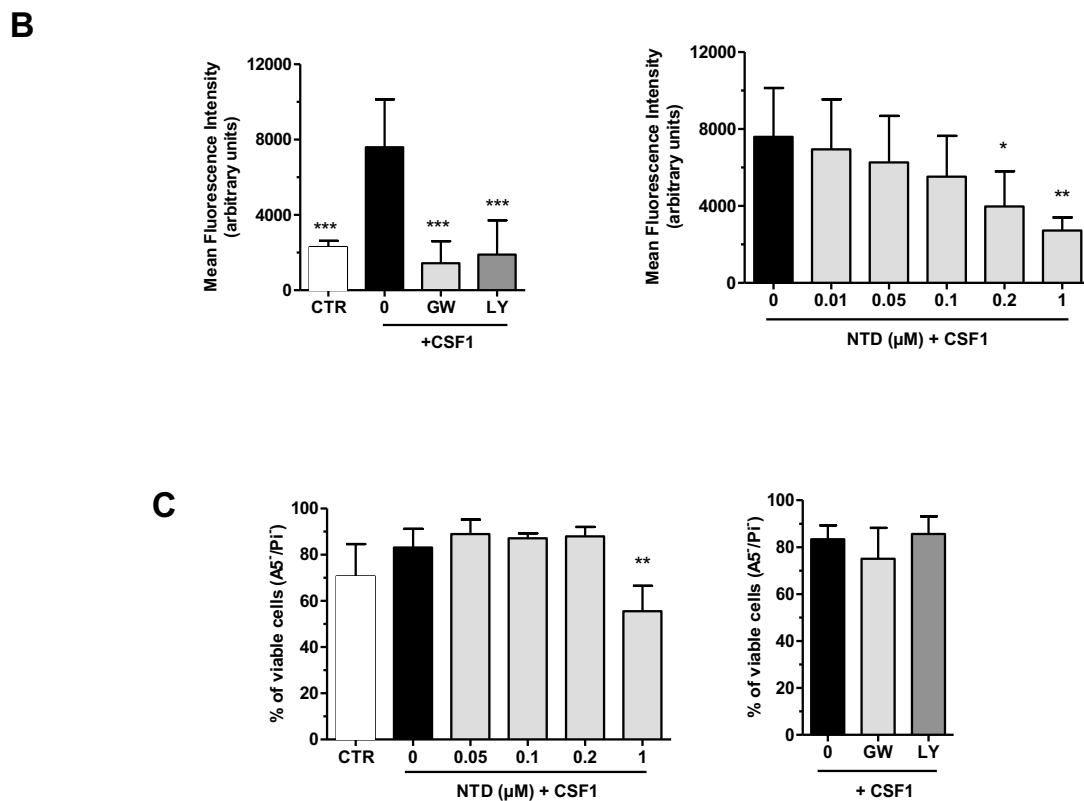
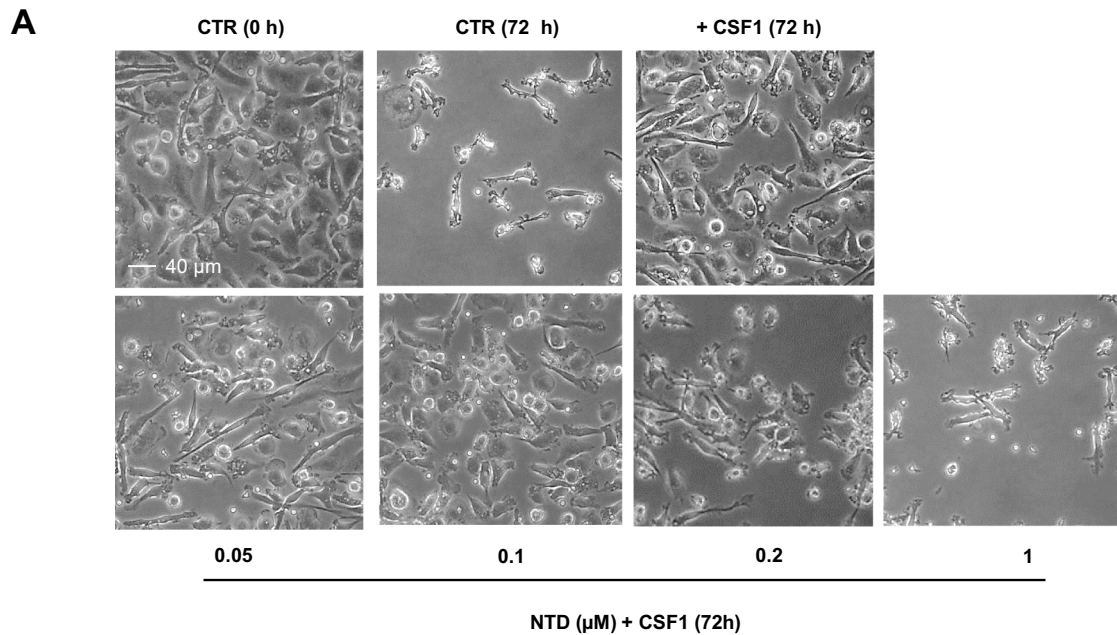


Fig. 2. NTD decreases the CSF1-dependent adhesion of macrophages. After washing, monocyte-derived macrophages (CTR, 0 h) were left untreated (CTR, 0), incubated with 10 μM GW2580, 10 μM LY294002 or NTD at 10–1000 nM, and then cultured without (CTR, 72 h) or with 50 μg/mL CSF1 for 72 h. (A): Phase contrast microscopy (representative of 5 independent experiments) × 40. (B): cell adhesion quantified using the Cyquant GR dyes. (C): cell viability measured by flow cytometry - apoptotic (annexin-V, A5) and/or necrotic (propidium iodide, PI) cells. Viable cells were defined as A5- and PI-negative macrophages. The results are means ± SD of 4 independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus “0”.

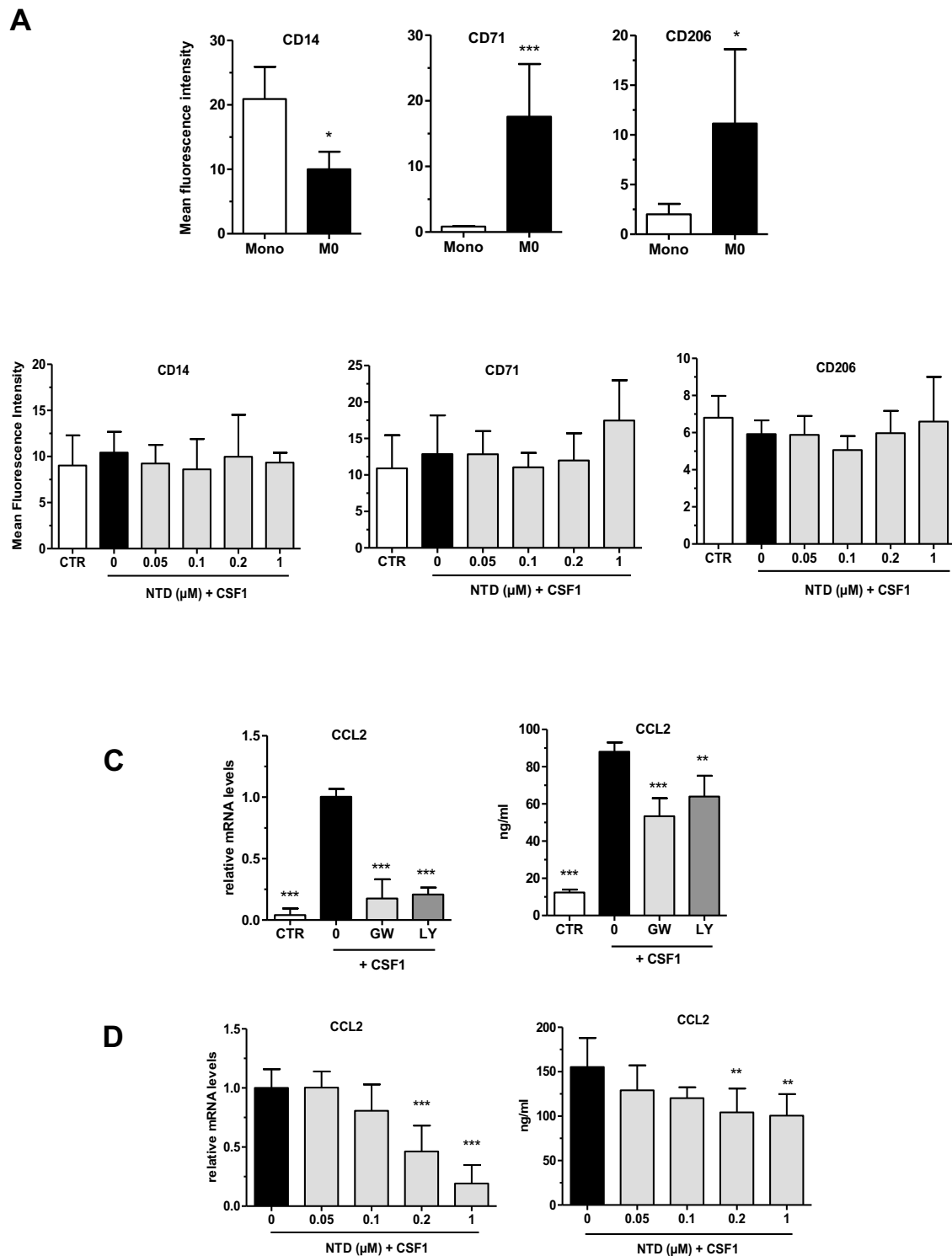


Fig. 3. Effect of NTD on membrane expression of M0 markers and CCL2 expression. Fresh peripheral blood monocytes (Mono) and monocyte-derived macrophages at day 6 (M0) (A), M0 macrophages untreated (CTR, 0) or incubated with NTD and then cultured in the absence (CTR) or presence of CSF1 for 24 h (B), were analyzed by flow cytometry to measure membrane expression of the CD14, CD71 and CD206 markers. In (C), M0 macrophages were left untreated (CTR, 0) or incubated with 10 μM GW2580 (GW), 10 μM LY294002 (LY) or NTD at 10–1000 nM, and then cultured without (CTR) or with CSF1 for 24 h. CCL2 mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in cells stimulated with CSF1 (“0”), arbitrarily set at 1. CCL2 in the culture media was quantified by ELISA. The results are means ± SD of 4 (A, B, C) and 6 (D) independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus “Mono” (A) and versus “0” (C, D).

cells cultured in the absence (CTR) or presence of CSF1 (“0”) remained similar, when measured by flow cytometry using A5 and PI labelling (Fig. 2C, left panel). NTD (10 to 200 nM) was not cytotoxic, but 1 μM NTD slightly (14.5%) reduced cell viability (Fig. 2C, left panel).

Similarly, neither GW2580 nor LY294002 significantly modified the percentage of viable macrophages (Fig. 2C, right panel). Thus, blocking CSF1R kinase activity promoted the detachment of M0 macrophages but did not affect their viability.

3.3. Effect of NTD on M0 marker production and CCL2 gene induction

Human M0 macrophages bear the monocyte marker and TLR4 co-receptor CD14, but its expression is lower than that on human monocytes (Fig. 3A). As expected, the expression of the transferrin receptor CD71 and the mannose receptor CD206 are higher on M0 macrophages than on monocytes (Fig. 3A) [8,22]. The gating strategy and representative graphs are presented on the Fig. S2A. The membrane expression of these M0 markers on cells cultured for 24 h in the absence of CSF1 (CTR) or with CSF1 in the presence of increasing concentrations of NTD were unchanged (Fig. 3B). Similarly, treating cells with CSF1 in the presence of GW2580 or LY294002 had no effect on their CD14, CD71 and CD206 membrane expression (data not shown). In contrast, M0 macrophages stimulated with CSF1 for 24 h significantly increased both CCL2 mRNA and protein levels (Fig. 3C). Blocking the CSF1R receptor with GW2580 and the PI3K/AKT pathway with LY294002 greatly reduced CCL2 gene expression (Fig. 3C). NTD, like GW2580 and LY294002, significantly blocked the production of both CCL2 mRNA and protein (Fig. 3D).

3.4. Influence of NTD on M1 and M2a markers

Human M0 macrophages can be polarized to form classical “pro-inflammatory” M1 macrophages or alternative “pro-fibrotic” M2a macrophages, depending on their microenvironment [20]. We first checked the induction of membrane markers by culturing macrophages for 24 h with CSF1 + LPS/INF (M1) or CSF1 + IL-4/IL-13 (M2a). CD80, CD86, CD40 and CD83 were specifically induced in M1 macrophages whereas CD11b, CD200R, CD206 and CD209 were selectively increased in M2a macrophages (Fig. 4A). The gating strategy and representative graphs are presented on the Fig. S2B–C. GW2580 had no effect on M1 or M2a markers (data not shown), indicating that inhibiting CSF1R does not interfere with the intracellular process controlling M1 and M2a polarization. We did not assess the effects of LY294002 as it inhibits the PI3K pathway induced by CSF1 and/or LPS/INF. NTD did not modify the LPS/INF-induced production of M1 markers but it did reduce the membrane concentrations of M2a markers (Fig. 4B). NTD (> 200 nM) significantly blocked the IL-4/IL-13-induced synthesis of CD11b, CD206 and CD209, indicating that NTD probably affects M2a polarization via a mechanism that is independent of CSF1R inhibition.

3.5. Influence of NTD on the synthesis of cytokines in M1 and M2a macrophages

We then investigated the influence of NTD on the synthesis of several specific M1 and M2a macrophage pro-inflammatory and/or pro-fibrotic genes. Inhibiting CSF1R with GW2580 did not prevent the induction of IL-1 β , IL-8 and IL-10 mRNA and increased by 50% the CXCL13 mRNA levels (Fig. 5A). However, GW2580 significantly reduced the IL-1 β and IL-8 secreted into the culture medium, without changing IL-10 or CXCL13 production (Fig. 5B). NTD (> 200 nM), like GW2580, did not inhibit the induction of IL-1 β and IL-8 mRNA but it did significantly reduce IL-1 β and IL-8 secretion (Fig. 5C and D). In contrast, unlike GW2580, NTD blocked, in a concentration-dependent manner, any increase in both mRNA and protein encoded by the IL-10 and CXCL13 genes. Consequently, this indicates that NTD does not alter IL-10 or CXCL13 gene expression by inhibiting CSF1R but rather by interacting with other targets.

Polarizing M2a macrophages with IL-4/IL-13 increased the expression of the CCL18, CCL22 and PDGF-BB genes; but its influence on mRNA or protein production was gene-dependent (Fig. 6A and B). IL-4/IL-13 significantly increased the concentrations of CCL18 mRNA and protein; they also increased CCL22 mRNA levels without significantly enhancing CCL22 secretion. Conversely, IL-4/IL-13 did not increase PDGF-BB mRNA levels, while significantly enhancing PDGF-BB release from macrophages. GW2580 significantly increased CCL18 gene

expression in M2a macrophages (Fig. 6A and B) and enhanced the production of CCL22 and PDGF-BB mRNAs but not secretion of the encoded proteins. Similarly, increasing concentrations of NTD enhanced CCL18 gene expression and protein secretion, resulting in significant effects at 1 μ M concentrations (Fig. 6C and D). Nevertheless, the effects of NTD on CCL22 and PDGF-BB gene expression were not significant.

4. Discussion

We find that NTD markedly alters the phenotype of human macrophages, mainly by inhibiting the activation of CSF1R and modulating other molecular targets. It blocked the phosphorylation of CSF1R and the subsequent activation of the PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways induced by CSF1 in a concentration-dependent manner. The binding of CSF1 to its receptor leads to the dimerization of CSF1R and the rapid autophosphorylation of several tyrosine residues, including tyrosine 723 (Tyr-721 in the mouse). The PI3K/AKT pathway is activated in mouse macrophages following the interaction of the p85 regulatory subunit of PI3K with the phosphorylated tyrosine 721 [23], whereas the binding of the Grb2 adaptor protein to phosphorylated tyrosine residues in CSF1R is thought to trigger ERK activation [10]. We found that 10 nM NTD reduces CSF1R phosphorylation by over 50%, in agreement with the recent demonstration that NTD inhibits the kinase activity of recombinant human CSF1R protein (IC₅₀: 5 \pm 2 nM) [9]. However, 10 nM NTD did not prevent the phosphorylation of AKT or ERK. The amount of phosphorylated AKT and ERK were only significantly decreased in macrophages treated with NTD concentrations above 100 nM. Since 10 nM NTD partially blocks CSF1R phosphorylation in CSF1-stimulated macrophages, the CSF1R activity detected in macrophages treated with 10 nM NTD is probably still sufficient to allow the binding of both p85-PI3K and Grb2, and thus to fully activate AKT (p85-PI3K) and ERK (Grb2). This evidence that CSF1R is a new molecular target of NTD should be taken into account when investigating effects of the drug on myeloid or tumor cells bearing this receptor.

The inhibition of CSF1R phosphorylation by NTD also influences the function of human macrophages. It markedly reduced cell adhesion and triggered macrophage rounding without being cytotoxic. These effects were concentration-dependent and significant at NTD concentrations above 200 nM. We obtained evidence suggesting that NTD decreases cell adhesion by preventing the activation of the CSF1R-dependent PI3K pathway. First, culturing macrophages in the absence of CSF1 or in the presence of the CSF1R inhibitor, GW2580, mimicked the effect of NTD on macrophage adhesion and morphology. Second, the PI3K inhibitor LY294002, like NTD, strongly inhibited the adhesion of human macrophages. And third, actin cytoskeleton remodeling, which controls cell adhesion and motility in mouse macrophages, is tightly regulated by the PI3K-dependent activation of paxillin, a major protein in macrophage focal complexes [24]. However, inhibiting CSF1R activity with NTD or GW2580 did not alter cell viability, suggesting that survival pathways induced by CSF1 during monocyte differentiation are not controlled by this receptor in mature macrophages. Similarly, NTD and GW2580 did not decrease the membrane expression of CD71 and CD206, two M0 markers absent from monocytes. The levels of CD71 and CD206 were unchanged and are thus independent of CSF1R activity in mature macrophages.

NTD, like GW2580, blocked any increases in CCL2 mRNA or protein, in agreement with the findings of Baran et al., who reported that CSF1 induced CCL2 gene expression in mouse bone marrow- and human monocyte-derived macrophages [12]. CCL2 plays a major role in murine lung fibrosis especially by promoting monocyte and phagocyte recruitment [12]. In their study, Bara et al. (2007) demonstrated that CCL2^{-/-} mice treated with bleomycin had less cell infiltration in pulmonary tissue, interstitial lung thickening and collagen deposition in lungs than wild-type mice. Moreover, they found that bronchoalveolar

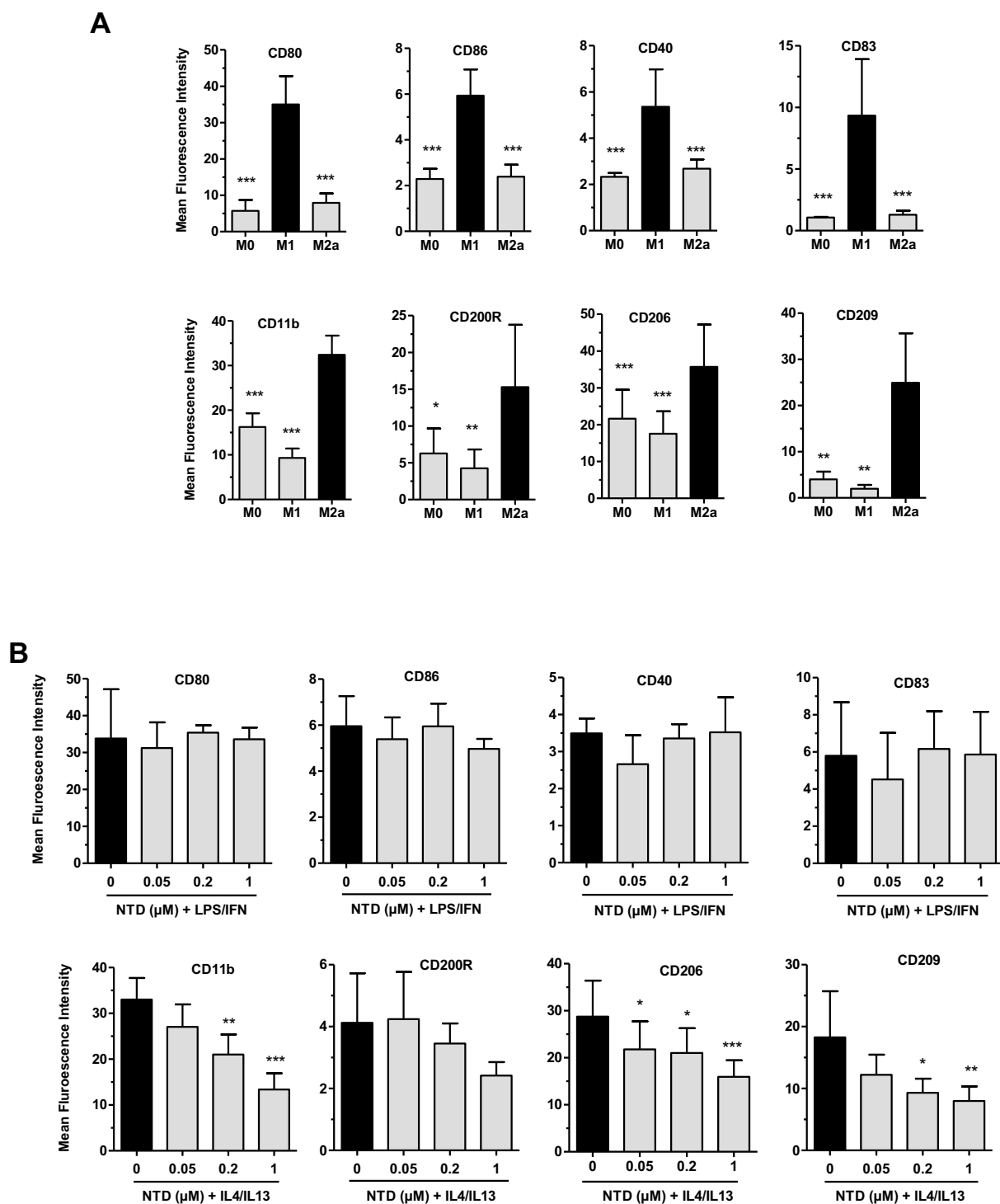


Fig. 4. NTD reduces expression of M2a macrophage membrane markers. M0 macrophages were untreated (A, B) or incubated with NTD at 50–1000 nM (B) and then polarized into classical M1 (LPS/INF) or alternative M2a (IL-4/IL-13) macrophages for 24 h. Membrane expression of the M1 and M2a markers was analyzed by flow cytometry. Results are the means ± SD of 6 (A) and 4 (B) independent experiments. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 versus “M1” (A, top panel), M2a (A, bottom panel) or “0” (B).

lavages of patients with IPF contain increased CCL2 concentrations, suggesting that this chemokine is involved in the development of lung fibrosis in humans. Finally, we found that LY294002 almost totally prevented the increase in CCL2 mRNA, indicating that the CSF1R-dependent expression of the CCL2 gene is positively regulated by the PI3K pathway in human macrophages.

Blocking CSF1R with NTD or GW2580 altered the cytokine profiles in M1 and M2a macrophages differently. They did not prevent the

induction of M1 markers, but they significantly reduced the secretion of IL-1β and IL-8 by M1 macrophages. As neither NTD nor GW2580 impaired IL-1β or IL-8 mRNA production, they probably interfere with protein synthesis. It is generally accepted that the maturation of IL-1β in macrophage is controlled mainly post-translationally, by the NOD-like receptor pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome, a cytoplasmic protein complex [25]. IL-1β gene induction by LPS results in pro-IL-1β, which is cleaved to give its mature form by the cysteine protease

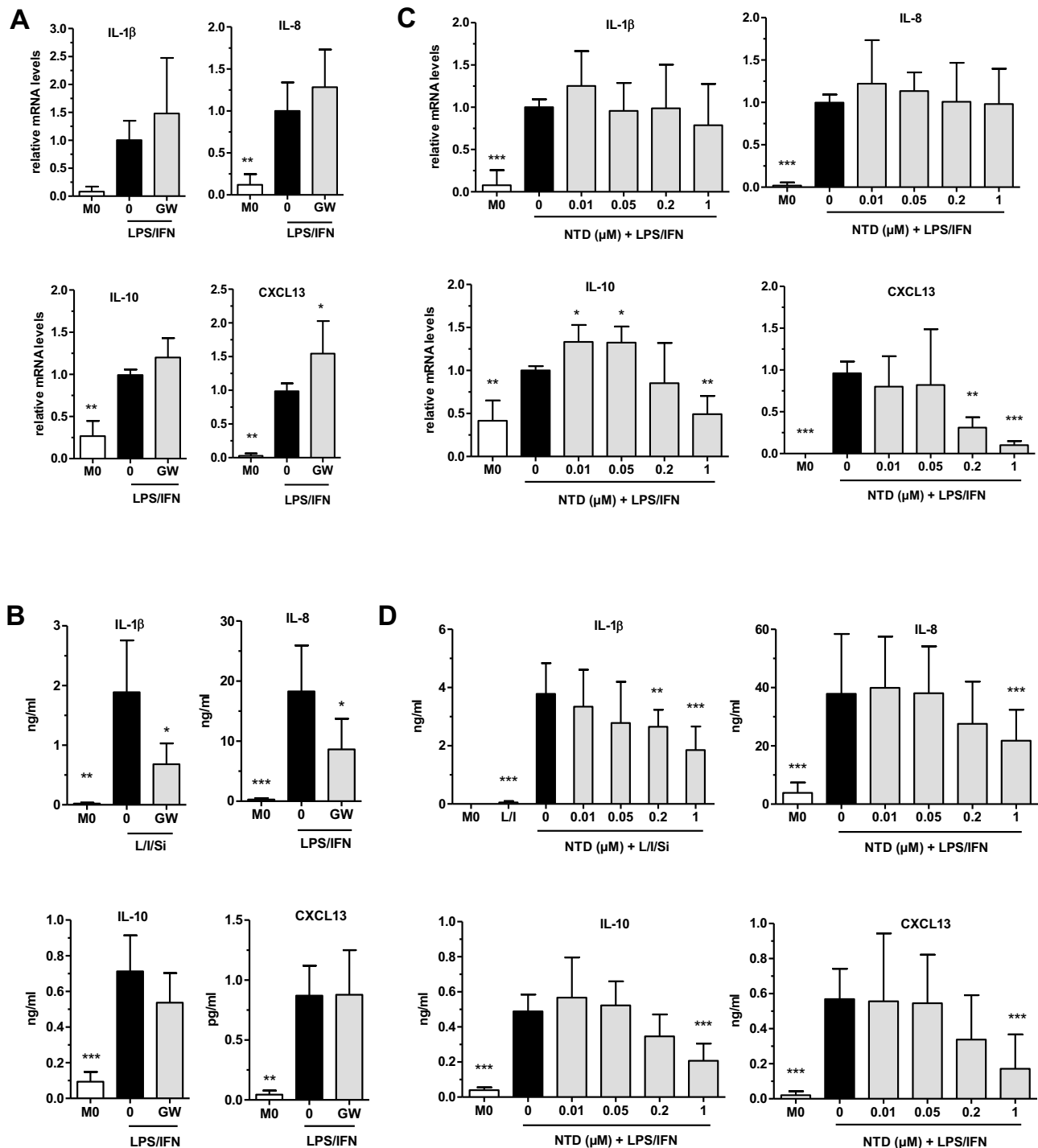


Fig. 5. Influence of NTD on the induction of pro-inflammatory and pro-fibrotic genes in M1 macrophages. Macrophages were untreated (M0, 0), treated with 10 μM GW2580 (GW) or NTD at 10–1000 nM, and then left unstimulated (M0) or polarized to M1 macrophages by incubation with LPS/IFN (L/I) for 24 h. IL-1β secretion was measured in cells stimulated with LPS/IFN (L/I) for 4 h and then with LPS/IFN + 100 μg/mL crystalline silica (L/I/Si) for 16 h. mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in LPS/IFN-stimulated cells (“0”) (A, C), arbitrarily set at 1. IL-1β secretion was quantified by ELISA. Results are expressed as means ± SD of 4 (A, B), 6 (C) and 5 to 8 (D) independent experiments. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 versus “0”.

caspase-1. This protease is the effector molecule of the inflammasome that also contains the sensor protein NLRP3 and the adaptor ASC [25]. Gaidt et al. recently reported that a caspase 8-dependent signaling system mediates the assembly of the NLRP3 inflammasome in human monocytes stimulated with LPS [26]. The differentiation of human monocytes induced by CSF1 also requires activation of caspase-8, which is essential for cell survival [27]. The fact that NTD and GW2580

specifically decreased the secretion of IL-1β suggests that stimulating CSF1R with CSF1 favors the assembly of the NLRP3 inflammasome, which was induced with silica in our study (Fig. 5D), perhaps by re-activating caspase 8 and triggering a caspase-8-dependent signaling pathway upstream of NLRP3. Yet, no evidence of caspase-8 function in CSF1-induced macrophages is reported. How NTD or GW2580 interferes with IL-8 production is also elusive, as the process controlling IL-8

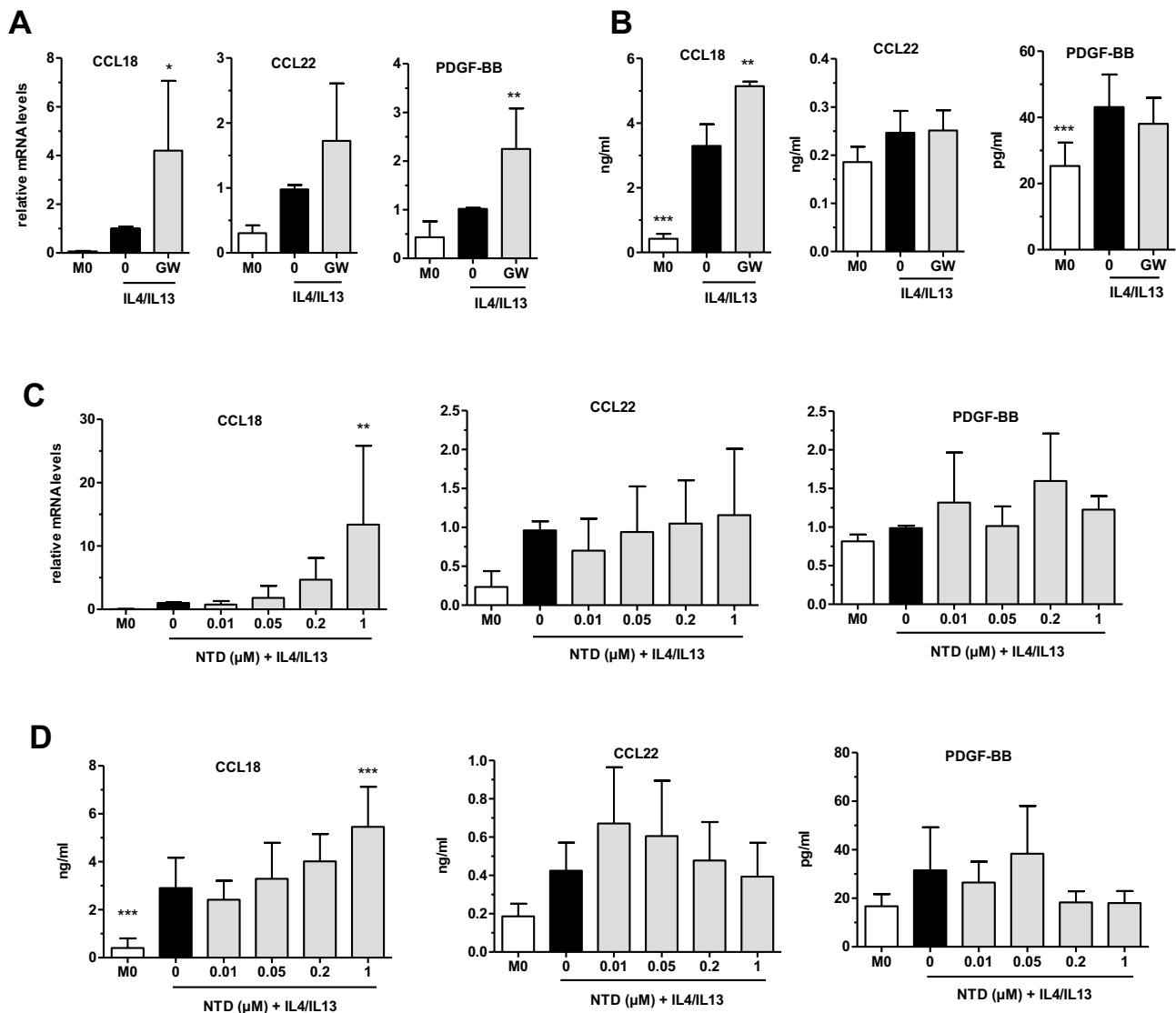


Fig. 6. Effects of NTD on CCL18, CCL22 and PDGF-BB expression in M2a macrophages. Macrophages were untreated (M0, 0), incubated with 10 μM GW2580 (GW), or NTD at 10–1000 nM, and then left unstimulated (M0) or polarized to M2a macrophages by incubation with IL-4/IL-13 (IL4/IL13) for 24 h. mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in IL4/IL13-stimulated cells (“0”) (A, C), arbitrarily set at 1. The CCL18, CCL22 and PDGF-BB in culture media were quantified by ELISA. Results are expressed as means ± SD of 4 (A, B), 5 (C) and 4 to 7 (D) independent experiments. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 versus “0”.

maturation is poorly understood. Nevertheless, treating rheumatoid arthritis synovial explants with an anti-human CSF1R monoclonal antibody greatly reduces the CSF1-induced release of IL-8 [28]. Hence, CSF1R may well play a positive role in the regulation of IL-8 production, at least in vitro.

While NTD and GW2580 seemed to have no effect on the secretion of CCL22 and PDGF-BB by M2a macrophages, they did increase the release of CCL18 from human macrophages polarized with IL-4/IL-13. They also significantly enhanced CCL18 mRNA production, suggesting that activating CSF1R probably blocks transcription of the CCL18 gene by altering a signaling pathway induced by IL-4/IL-13. Thus, CSF1 not only promotes adhesion, it also increases or represses the expression of genes that help define the overall phenotype of mature macrophages.

Besides inhibiting CSF1R activation, NTD also appeared to alter the polarization of M0 macrophages by interacting with other molecular targets. Specifically, NTD prevented the expression of the IL-10 and CXCL13 genes in M1 macrophages, whereas GW2580 had no significant effect. It may be possible that NTD prevented the production of these cytokines by blocking the Bruton's tyrosine kinase (Btk). Indeed, LPS

rapidly activates Btk in murine and human macrophages, and inhibiting Btk with the selective inhibitor, Ibrutinib, markedly reduces the increases in IL-10 and CXCL13 mRNAs induced by LPS [29,30]. However, it is not clear whether Btk stimulates the CXCL13 gene directly, since macrophage treatment with an Ab neutralizing IL-10 significantly reduces CXCL13 production [31]. In cell-free systems, NTD also inhibits the kinase activity of the human recombinant Btk protein (IC₅₀: 34 nM) [9]. Studies on human macrophages stimulated with LPS are thus needed to determine whether Btk is a new molecular target of NTD. Finally, 200 nM NTD significantly reduced the increases in the M2a markers CD11b, CD206 and CD209 independently of CSF1R inhibition. NTD concentrations as low as 50 nM significantly reduced the membrane expression of CD206 induced by IL-4/IL-13. It can be noted that Huang et al. (2017) previously reported that NTD partially prevents the expression of CD206 in human M2 macrophages, however without investigating the role of CSF1R [8]. NTD may prevent M2a polarization independently of Btk, since ibrutinib does not seem to alter signaling induced by IL-4 [32]. NTD might reduce the expression of M2a markers by inhibiting the Src kinase Hck that mediates the CD206 gene activity

induced by IL-13 in human monocytes [33]. NTD inhibit several Src kinases [9,34], but its effect on Hck kinase activity remains to be demonstrated. Altogether, our results strongly suggest that NTD likely altered the phenotype and the polarization of human macrophages, not only by inhibiting CSF1R activity, but also by repressing other kinases that remain to be characterized.

More generally, our results demonstrate that, in vitro, NTD exerts anti-inflammatory effects by blocking the expression of the IL-1 β , IL-8, IL-10, CCL2 and CXCL13 genes that contribute to lung fibrosis [35–37]. Therefore, these results support recent findings concerning the anti-inflammatory properties of NTD in murine models of fibrosis [4,6–8]. However, the clinical relevance of these effects should be further investigated since NTD alters macrophage functions in vitro at concentrations higher than those measured in patients with IPF after standard dosing [18]. Indeed, NTD significantly altered the phenotype of macrophages only when it was used at concentrations above 200 nM, whereas the highest blood concentrations measured in patients with IPF are about 70 nM. Future clinical trials may assess the immuno-modulatory properties of NTD by measuring blood concentrations of various cytokines before and after treatment.

5. Conclusion

NTD inhibits the activation of CSF1R, which is therefore a new molecular target of the drug. NTD has anti-inflammatory effects on human macrophages, mainly due to CSF1R inhibition, but also from interactions with other as-yet unidentified targets.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.061>.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Rennes 1 (Univ Rennes) and Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Nessrine Bellamri holds a fellowship funded by the University of Rennes 1. We thank the Rennes Biosit platform for flow cytometry and Professor Olivier Fardel for helpful comments and critically reading the manuscript. Dr. Owen Parkes edited the English text.

Conflict of interest

Dr. Stefan-Lutz Wollin is an employee of Boehringer Ingelheim the company who invented nintedanib, the drug used in this study. Pr Stéphane Jouneau has received fees, funding or reimbursement for national and international conferences, boards, expert or opinion groups, research projects over the past 5 years from Actelion, AIRB, Astra Zeneca, BMS, Boehringer, Chiesi, Gilead, GSK, LVL, Mundipharma, Novartis, Pfizer, Roche, Savara-Serendex. The other authors declare no competing interests.

References

- [1] G. Sgalla, B. Iovene, M. Calvello, M. Ori, F. Varone, L. Richeldi, Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management, *Respir. Res.* 19 (2018) 32, <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0730-2>.
- [2] L. Richeldi, R.M. du Bois, G. Raghu, A. Azuma, K.K. Brown, U. Costabel, V. Cottin, K.R. Flaherty, D.M. Hansell, Y. Inoue, D.S. Kim, M. Kolb, A.G. Nicholson, P.W. Noble, M. Selman, H. Taniguchi, M. Brun, F. Le Maulf, M. Girard, S. Stowasser, R. Schlenker-Herceg, B. Disse, H.R. Collard, INPULSIS Trial Investigators, Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 2071–2082, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402584>.
- [3] L. Wollin, E. Wex, A. Pautsch, G. Schnapp, K.E. Hostettler, S. Stowasser, M. Kolb, Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur. Respir. J.* 45 (2015) 1434–1445, <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>.
- [4] L. Wollin, I. Maillat, V. Quesniaux, A. Holweg, B. Ryffel, Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349 (2014) 209–220, <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>.
- [5] K.E. Hostettler, J. Zhong, E. Papakonstantinou, G. Karakioulakis, M. Tamm, P. Seidel, Q. Sun, J. Mandal, D. Lardinois, C. Lambers, R. Koth, Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Respir. Res.* 15 (2014) 157, <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3>.
- [6] B. Öztürk Akcora, G. Storm, J. Prakash, R. Bansal, Tyrosine kinase inhibitor BIBF1120 ameliorates inflammation, angiogenesis and fibrosis in CCL4-induced liver fibrogenesis mouse model, *Sci. Rep.* 7 (2017) 44545, <https://doi.org/10.1038/srep44545>.
- [7] F. Liu, L. Wang, H. Qi, J. Wang, Y. Wang, W. Jiang, L. Xu, N. Liu, S. Zhuang, Nintedanib, a triple tyrosine kinase inhibitor, attenuates renal fibrosis in chronic kidney disease, *Clin. Sci.* 131 (2017) 2125–2143, <https://doi.org/10.1042/CS20170134>.
- [8] J. Huang, C. Maier, Y. Zhang, A. Soare, C. Dees, C. Beyer, U. Harre, C.-W. Chen, O. Distler, G. Schett, L. Wollin, J.H.W. Distler, Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis, *Ann. Rheum. Dis.* 76 (2017) 1941–1948, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210823>.
- [9] F. Hilberg, U. Tontsch-Grunt, A. Baum, A.T. Le, R.C. Doebele, S. Lieb, D. Gianni, T. Voss, P. Garin-Chesa, C. Haslinger, N. Kraut, Triple angiokinase inhibitor nintedanib directly inhibits tumor cell growth and induces tumor shrinkage via blocking oncogenic receptor tyrosine kinases, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 364 (2018) 494–503, <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244129>.
- [10] F.J. Pixley, E.R. Stanley, CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 628–638, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.016>.
- [11] D. Achkova, J. Maher, Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 333–341, <https://doi.org/10.1042/BST20150245>.
- [12] C.P. Baran, J.M. Opalek, S. McMaken, C.A. Newland, J.M. O'Brien, M.G. Hunter, B.D. Bringardner, M.M. Monick, D.R. Brigstock, P.C. Stromberg, G.W. Hunninghake, C.B. Marsh, Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176 (2007) 78–89, <https://doi.org/10.1164/rccm.200609-1279OC>.
- [13] L. Meziani, M. Mondini, B. Petit, A. Boissonnas, V. Thomas de Montpreville, O. Mercier, M.-C. Vozenin, E. Deutsch, CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages, *Eur. Respir. J.* 51 (2018), <https://doi.org/10.1183/13993003.02120-2017>.
- [14] L. Morales-Nebreda, A.V. Misharin, H. Perlman, G.R.S. Budinger, The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease, *Eur. Respir. Rev.* 24 (2015) 505–509, <https://doi.org/10.1183/16000617.0031-2015>.
- [15] A.V. Misharin, L. Morales-Nebreda, P.A. Reyfman, C.M. Cuda, J.M. Walter, A.C. McQuattie-Pimentel, C.-I. Chen, K.R. Anekalla, N. Joshi, K.J.N. Williams, H. Abdala-Valencia, T.J. Yacoub, M. Chi, S. Chiu, F.J. Gonzalez-Gonzalez, K. Gates, A.P. Lam, T.T. Nicholson, P.J. Homan, S. Soberanes, S. Dominguez, V.K. Morgan, R. Saber, A. Shaffer, M. Hinchcliff, S.A. Marshall, A. Bharat, S. Berndnikovs, S.M. Bhorade, E.T. Bartom, R.I. Morimoto, W.E. Balch, J.I. Sznajder, N.S. Chandel, G.M. Mutlu, M. Jain, C.J. Gottardi, B.D. Singer, K.M. Ridge, N. Bagheri, A. Shilatfard, G.R.S. Budinger, H. Perlman, Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span, *J. Exp. Med.* 214 (2017) 2387–2404, <https://doi.org/10.1084/jem.20162152>.
- [16] M.A. Gibbons, A.C. MacKinnon, P. Ramachandran, K. Dhaliwal, R. Duffin, A.T. Phythian-Adams, N. van Rooijen, C. Haslett, S.E. Howie, A.J. Simpson, N. Hirani, J. Gaudie, J.P. Iredale, T. Sethi, S.J. Forbes, Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2011) 569–581, <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1719OC>.
- [17] C.A. Ambarus, S. Krausz, M. van Eijk, J. Hamann, T.R.D.J. Radstake, K.A. Reedquist, P.P. Tak, D.L.P. Baeten, Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages, *J. Immunol. Methods* 375 (2012) 196–206, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.10.013>.
- [18] T. Ogura, H. Taniguchi, A. Azuma, Y. Inoue, Y. Kondoh, Y. Hasegawa, M. Bando, S. Abe, Y. Mochizuki, K. Chida, M. Klüglich, T. Fujimoto, K. Okazaki, Y. Tadayasu, W. Sakamoto, Y. Sugiyama, Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur. Respir. J.* 45 (2015) 1382–1392, <https://doi.org/10.1183/09031936.00198013>.
- [19] A. Lescoat, A. Balleier, Y. Augagneur, C. Morzadec, L. Vernhet, O. Fardel, P. Jégo, S. Jouneau, V. Lecreur, Distinct properties of human M-CSF and GM-CSF monocyte-derived macrophages to simulate pathological lung conditions in vitro: application to systemic and inflammatory disorders with pulmonary involvement, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018), <https://doi.org/10.3390/ijms19030894>.
- [20] M. Jaguin, N. Houlbert, O. Fardel, V. Lecreur, Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin, *Cell. Immunol.* 281 (2013) 51–61, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>.
- [21] H. Pfister, C. Morzadec, P. Le Cann, L. Madec, V. Lecreur, M. Chouvet, S. Jouneau, L. Vernhet, Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms, *Environ. Res.* 158 (2017) 691–702, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.025>.
- [22] S. Boulakirba, A. Pfeifer, R. Mhaidly, S. Obba, M. Goulard, T. Schmitt, P. Chaintreuil, A. Calleja, N. Furstoss, F. Orange, S. Lacas-Gervais, L. Boyer, S. Marchetti, E. Verhoeyen, F. Luciano, G. Robert, P. Auberger, A. Jaquet, IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential, *Sci. Rep.* 8 (2018) 256, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18433-4>.
- [23] N.G. Sampaio, W. Yu, D. Cox, J. Wyckoff, J. Condeelis, E.R. Stanley, F.J. Pixley,

- Phosphorylation of CSF-1R Y721 mediates its association with PI3K to regulate macrophage motility and enhancement of tumor cell invasion, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 2021–2031, <https://doi.org/10.1242/jcs.075309>.
- [24] E.R. Stanley, V. Chitu, CSF-1 receptor signaling in myeloid cells, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021857>.
- [25] Y. He, H. Hara, G. Núñez, Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation, *Trends Biochem. Sci.* 41 (2016) 1012–1021, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>.
- [26] M.M. Gaidt, T.S. Ebert, D. Chauhan, T. Schmidt, J.L. Schmid-Burgk, F. Rapino, A.A.B. Robertson, M.A. Cooper, T. Graf, V. Hornung, Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway, *Immunity* 44 (2016) 833–846, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>.
- [27] C. Rébé, S. Cathelin, S. Launay, R. Filomenko, L. Prévotat, C. L'Ollivier, E. Gyan, O. Micheau, S. Grant, A. Dubart-Kupperschmitt, M. Fontenay, E. Solary, Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation, *Blood*. 109 (2007) 1442–1450, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-011585>.
- [28] S. Garcia, L.M. Hartkamp, B. Malvar-Fernandez, I.E. van Es, H. Lin, J. Wong, L. Long, J.A. Zanghi, A.L. Rankin, E.L. Masteller, B.R. Wong, T.R.D.J. Radstake, P.P. Tak, K.A. Reedquist, Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 18 (2016) 75, <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0973-6>.
- [29] N.W. Schmidt, V.T. Thieu, B.A. Mann, A.-N.N. Ahyi, M.H. Kaplan, Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production, *J. Immunol.* 177 (2006) 7203–7210.
- [30] L. Ping, N. Ding, Y. Shi, L. Feng, J. Li, Y. Liu, Y. Lin, C. Shi, X. Wang, Z. Pan, Y. Song, J. Zhu, The Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib exerts immunomodulatory effects through regulation of tumor-infiltrating macrophages, *Oncotarget* 8 (2017) 39218–39229, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16836>.
- [31] P. Perrier, F.O. Martinez, M. Locati, G. Bianchi, M. Nebuloni, G. Vago, F. Bazzoni, S. Sozzani, P. Allavena, A. Mantovani, Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13, *J. Immunol.* 172 (2004) 7031–7042.
- [32] S. Fiorcari, R. Maffei, V. Audrito, S. Martinelli, E. Ten Hacken, P. Zucchini, G. Grisendi, L. Potenza, M. Luppi, J.A. Burger, S. Deaglio, R. Marasca, Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia, *Oncotarget* 7 (2016) 65968–65981, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11782>.
- [33] A. Bhattacharjee, S. Pal, G.M. Feldman, M.K. Cathcart, Hck is a key regulator of gene expression in alternatively activated human monocytes, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 36709–36723, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291492>.
- [34] L.-F. Li, K.-C. Kao, Y.-Y. Liu, C.-W. Lin, N.-H. Chen, C.-S. Lee, C.-W. Wang, C.-T. Yang, Nintedanib reduces ventilation-augmented bleomycin-induced epithelial-mesenchymal transition and lung fibrosis through suppression of the Src pathway, *J. Cell. Mol. Med.* 21 (2017) 2937–2949, <https://doi.org/10.1111/jcmm.13206>.
- [35] S. Kolahian, I.E. Fernandez, O. Eickelberg, D. Hartl, Immune mechanisms in pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55 (2016) 309–322, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0121TR>.
- [36] T.J. Richards, N. Kaminski, F. Baribaud, S. Flavin, C. Brodmerkel, D. Horowitz, K. Li, J. Choi, L.J. Vuga, K.O. Lindell, M. Klesen, Y. Zhang, K.F. Gibson, Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185 (2012) 67–76, <https://doi.org/10.1164/rccm.201101-0058OC>.
- [37] L.J. Vuga, J.R. Tedrow, K.V. Pandit, J. Tan, D.J. Kass, J. Xue, D. Chandra, J.K. Leader, K.F. Gibson, N. Kaminski, F.C. Sciruba, S.R. Duncan, CXCL13 is a prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (2014) 966–974, <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1592OC> (C-X-C motif chemokine 13).

Article 2:

TNF- α and IL10 control CXCL13 expression in human macrophages

Nessrine Bellamri, Roselyne Viel, Claudie Morzadec, Valérie Lecureur, Audrey Joannes, Bertrand de Latour, Francisco Llamas-Gutierrez, Lutz Wollin, Stéphane Jouneau and Laurent Vernhet.

Actuellement en revision à Journal of Immunology.

Un résumé, en français et sans figure, est présenté ci-dessous. Il précède l'article original rédigé en anglais.

I- Contexte et justification de l'étude

La chimiokine CXCL13 joue un rôle physiologique majeur en orchestrant la migration cellulaire des lymphocytes B (LB) et T (LT) vers les organisations lymphoïdes secondaires. Cette chimiokine est majoritairement exprimée au niveau de ces structures par les cellules dendritiques folliculaires et les cellules stromales en réponse à la lymphotoxine β . La surexpression de CXCL13 contribue également au développement de structures lymphoïdes tertiaires au cours du développement de maladies inflammatoires chroniques et de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux.

Plusieurs études ont démontré que CXCL13 est un biomarqueur pronostique de la FPI. Les concentrations sériques de CXCL13 sont significativement augmentées chez ces malades et ces concentrations prédisent la sévérité et la progression de la maladie. Les concentrations en ARNm CXCL13 sont également fortement augmentées dans les tissus pulmonaires des malades. La protéine CXCL13 est massivement détectée autour des agrégats lymphoïdes riches se trouvant à proximité des lésions fibroprolifératives. Les résultats de l'étude de *Vuga et coll* suggèrent que CXCL13 est exprimée au sein de ces structures par des cellules CD68⁺ du lignage monocyte/macrophage. Toutefois, la possibilité que CXCL13 soit réellement produite par des macrophages interstitiels et/ou alvéolaires (MA) restent à démontrer. De même, les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression de CXCL13 dans le macrophage ne sont pas connus.

Lors du développement de la FPI, le pool des macrophages pulmonaires est enrichi par l'infiltration puis la différenciation de monocytes circulant. La déplétion de ces monocytes circulant prévient la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. Le facteur de croissance CSF-1 contrôle la différenciation du monocyte en macrophage (MDM) et joue un

rôle important dans le développement du processus fibrosant chez la souris. En effet, les souris déficientes en CSF-1 et exposées à la bléomycine présentent une diminution de l'infiltration pulmonaire de macrophage CD68⁺ et une réduction de l'intensité de la fibrose par rapport aux souris sauvages. Il est possible que CSF-1 contribue aussi au développement de la fibrose pulmonaire humaine. En effet, la concentration de CSF-1 dans les liquides de LBA et la densité des macrophages CD68⁺ dans les tissus pulmonaires sont augmentées chez les patients atteints de FPI. De plus, les MA issus de patients FPI expriment le marqueur CD206 dont l'expression est fortement induite par CSF-1. Par ailleurs, les MDM différenciés par le CSF-1 secrètent la chimiokine CXCL13 en réponse à une stimulation par le LPS. L'ensemble de ces études suggèrent donc que le macrophage pulmonaire, notamment chez les patients souffrant de FPI, produit CXCL13 de manière constitutive ou en réponse à une stimulation.

Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons caractérisé, par immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF), l'expression de CXCL13 dans les macrophages pulmonaires sur des coupes de tissus issus de biopsies pulmonaires chirurgicales de patients atteints de FPI. Nous avons également analysé *in vitro* la production de CXCL13 par les MA et les MDM humains, et recherché les voies de signalisation contrôlant son expression.

II- Résumé des principaux résultats

1- CXCL13 est exprimée dans les MA (CD68⁺/CD206⁺) de patients souffrant de FPI

Les résultats des expériences d'IHC montrent que l'intensité des marquages CXCL13 est maximale autour des agrégats lymphoïdes, riches en LB, mais qu'il est très difficile d'identifier un marquage cellulaire précis au niveau de ces structures. De plus, dans les agrégats lymphoïdes, nous n'observons pas de macrophages pulmonaires caractérisés par les marqueurs membranaires classiques CD68 et CD206. En revanche, l'analyse des tissus alvéolaires montre une forte expression de CXCL13 dans les MA qui co-localise avec les marqueurs CD68 et CD206. Le marquage de la chimiokine est localisé dans le cytoplasme et au niveau membranaire. L'ensemble de ces résultats a été confirmé par des expériences d'IF.

2- Le LPS induit l'expression de CXCL13 dans le MDM, via l'activation de la voie NF-κB canonique et non-canonique

Nous avons ensuite caractérisé l'expression de CXCL13 dans les MA isolés de liquides de LBA de patient atteints de FPI ou d'autre PID et dans les MDM humains stimulés par du LPS

(20 ng/ml). Les résultats montrent que l'expression de CXCL13 est détectable dans les MA et les MDM après 24 h de stimulation par le LPS. La cinétique d'expression de CXCL13 a été étudiée dans les MDM. L'expression des ARNm CXCL13 est tardive et seulement significative après 8 h d'exposition. La sécrétion de CXCL13 est détectable dès 8 h et maximale après 24 h de stimulation.

Il est bien établi que le LPS active la voie NF- κ B dans de nombreux types cellulaires. Nous montrons dans cette étude que le LPS active la voie canonique (phosphorylation et dégradation d'I κ B α), dès 2 h de stimulation, puis la voie non-canonique (expression de RelB et p52) après 8 à 24 h. Nos résultats indiquent que le BAY-117080, un inhibiteur chimique des voies NF- κ B, bloque en très grande partie l'induction de l'expression de CXCL13 dans les MDM. De plus, l'inactivation génétique de l'expression de RelB et de p100/p52, par la technologie SiRNA, prévient significativement l'augmentation des niveaux d'ARNm CXCL13 induit par le LPS. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le LPS contrôle l'expression de CXCL13 dans le MDM en activant les voies NF- κ B canonique et non-canonique.

3- Le TNF- α et l'IL-10 contrôlent l'expression du gène CXCL13 en activant respectivement les voies NF- κ B et JAK-STAT dans les MDM stimulés par le LPS

Nous avons ensuite déterminé les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des voies NF- κ B dans le MDM. Tout d'abord, nous avons analysé le rôle du TNF- α car i) son expression est très rapidement induite par le LPS dans le MDM, ii) il active les voies NF- κ B canonique et non canonique et iii) il module l'expression de CXCL13 dans d'autres modèles cellulaires.

Nos résultats indiquent que le pré-traitement par un anticorps neutralisant le TNF- α bloque totalement l'activation des voies NF- κ B et prévient en partie l'augmentation des concentrations en ARN et en protéine CXCL13 induites par le LPS. Inversement, comme le LPS, le TNF- α recombinant active les voies NF- κ B canonique et non-canonique et accroît les concentrations en ARN et en protéine de CXCL13 dans le MDM. Nous avons également étudié le rôle de l'IL-10 dont l'expression précède celle de CXCL13 dans le MDM stimulé par le LPS. Le pré-traitement des macrophages par un anticorps neutralisant l'IL-10 n'a aucun impact sur l'activation des voies NF- κ B, mais, comme l'anticorps anti-TNF- α , il réduit en partie l'expression de CXCL13 induite par le LPS. Le co-traitement par les deux anticorps inhibe plus fortement l'expression de CXCL13 que les traitements individuels par chaque anticorps. De plus, l'IL-10 recombinante n'active pas les voies NF- κ B et n'active que très

faiblement l'expression de CXCL13. En revanche, le co-traitement par le TNF- α et l'IL-10 induit plus fortement l'expression de CXCL13 que le TNF- α seul. Nos résultats suggèrent donc que, dans le MDM stimulé par le LPS, i) le TNF- α augmente la transcription du gène codant CXCL13 en stimulant les voies NF- κ B et ii) l'IL-10 renforce l'action du TNF- α et permet une expression optimale de CXCL13.

Dans le MDM, l'IL-10 active les voies JAK/STAT, et principalement celle de STAT3. Afin de déterminer le mécanisme moléculaire par lequel l'IL-10 peut augmenter l'expression de CXCL13 induite par le TNF- α , nous avons étudié les effets du Ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2. L'addition du Ruxolitinib dans le milieu de culture des MDM, préalablement stimulés par le LPS pendant 4 h, i) ne prévient pas l'expression du TNF- α ou de l'IL-10, ii) ne bloque pas l'activation de la voie NF- κ B non-canonique, mais iii) inhibe la phosphorylation de STAT3 induite par le LPS et l'IL-10 et iv) réduit très significativement l'expression de CXCL13. Ces derniers résultats suggèrent donc que l'IL-10 renforce l'activité du TNF- α sur le gène CXCL13 en activant une voie JAK/STAT.

4- Le TNF- α et l'IL-10 contrôlent l'expression de CXCL13 dans le MA humain

Comme dans le MDM, le LPS augmente significativement l'expression du TNF- α , de l'IL-10 et de CXCL13 dans les MA isolés des LBA de patients présentant une FPI ou une autre PID. Le LPS accroît également les niveaux d'ARN NF- κ B2 codant pour la protéine p100/p52, mais n'a aucun effet sur le gène codant RelB. Le co-traitement de ces macrophages par les anticorps neutralisant dirigés contre le TNF- α et l'IL-10 diminue significativement l'expression des ARN NF- κ B2 et des ARN CXCL13. Ce résultat indique donc que le TNF- α , seul ou en présence de l'IL-10, contrôlent l'expression de CXCL13 dans ces MA.

5- Les concentrations sériques de CXCL13, chez les patients atteints de FPI, sont corrélées positivement avec celles du TNF- α et de l'IL-10

Afin de déterminer si le TNF- α et l'IL-10 peuvent être impliqués dans la production de CXCL13 au cours de la FPI, nous avons analysé les concentrations sériques de ces trois molécules chez 70 patients atteints de FPI. Les prélèvements sanguins ont été réalisés à plus ou moins 100 jours du diagnostic de la FPI chez des individus non encore traités par le nintedanib ou la pirféridone. La moyenne arithmétique et la médiane des concentrations sériques de CXCL13 sont respectivement de 120,5 +/- 181,8 pg/ml et de 49,2 pg/ml. Le TNF- α et l'IL-10 sont indétectable dans une majorité des échantillons et seulement 22,8 % et 15,7 % de ces échantillons présentent des concentrations sériques respectives de TNF- α et

d'IL-10 supérieures à la limite de quantification (LOQ). Il est intéressant de noter que ces échantillons ayant des concentrations sériques de TNF- α ou d'IL-10 > LOQ ont généralement une concentration de CXCL13 supérieure à la médiane. En particulier, les deux tiers des échantillons, ayant des concentrations sériques de TNF- α ou d'IL-10 > LOQ, présentent une concentration de CXCL13 classée dans le dernier quartile (concentrations les plus élevées). Les concentrations sériques de TNF- α et d'IL-10 des 70 patients sont corrélées positivement et significativement à celles de CXCL13. Enfin, les concentrations sériques de TNF- α > LOQ sont corrélées avec celles de CXCL13.

III Conclusions

Notre étude indique que le CXCL13 est produit par les MA CD68+ CD206+ issus de patients atteints de FPI et que le TNF- α et l'IL-10 régulent cette production. Plus généralement nous avons identifié le rôle crucial de la voie NF- κ B et JAK/STAT dans l'expression du gène CXCL13 au niveau des MDM humains inflammatoires.

TNF- α and IL-10 control CXCL13 expression in human macrophages

Nessrine Bellamri¹, Roselyne Viel², Claudie Morzadec¹, Valérie Lecureur¹, Audrey Joannes¹, Bertrand de Latour³, Francisco Llamas-Gutierrez⁴, Lutz Wollin⁵, Stéphane Jouneau^{6,7,*} and Laurent Vernhet^{1, #,*}

¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

²H2P2, Histopathological platform, Univ Rennes, F-35000 Rennes, France

³Service de Chirurgie cardio-thoracique et vasculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes, France

⁴Service d'anatomopathologie, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes, France

⁵Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, KG, Biberach an der Riss, Germany

⁶Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

⁷Service de Pneumologie, Centre de compétences pour les maladies pulmonaires rares de Bretagne, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes, France

#LV and SJ contributed equally

***Corresponding author:** Laurent Vernhet, Univ. Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France. Phone: 33-2-23-23-48-07; Fax: 33-2-23-23-47-94. Email: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr

Abbreviations: ILD: interstitial lung disease, IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, IF: immunofluorescence, MoDM: blood monocyte-derived macrophages, AM: alveolar macrophages, M-CSF: macrophage colony-stimulating factor, BAL: bronchoalveolar lavages, LPS: lipopolysaccharide, IHC: immunohistochemistry, IF: Immunofluorescence,

TNF- α : tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL: interleukin, Ab: antibody; LOQ: limit of quantification, TNFR2: TNF- α receptor 2.

Abstract

The chemokine CXCL13 controls the normal organization of secondary lymphoid tissues and the neogenesis of ectopic lymphoid structures in non-lymphoid organs, particularly the lungs. The progression and severity of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a fatal and irreversible interstitial lung disease, is predicted by the circulating blood concentrations of CXCL13. While CXCL13 is produced by pulmonary tissues, it is not clear which cells are involved. This study examines CXCL13 production by lung tissue macrophages from patients with IPF and the signaling pathways controlling CXCL13 gene expression in human alveolar macrophages (AM) and monocyte-derived macrophages (MoDM). CXCL13 is found in CD68- and CD206-positive AM from patients with IPF and CXCL13 gene is induced in these macrophages and MoDM when they are stimulated with lipopolysaccharide. We find that TNF- α and IL-10 control optimal CXCL13 gene expression in MoDM, and possibly in AM, by activating the NF- κ B and JAK/STAT pathways, respectively. We also found that blood TNF- α , IL-10 and CXCL13 concentrations are significantly correlated in IPF patients, suggesting that these cytokines contribute to CXCL13 production in humans. In conclusion, we have demonstrated that AM from patients with IPF produce CXCL13 and that the NF- κ B and JAK/STAT pathways are required to induce the expression of this major chemokine.

Keywords: CXCL13, macrophage, idiopathic lung fibrosis, TNF- α , IL-10, NF- κ B

Introduction

The chemokine CXCL13, also known as B lymphocyte chemoattractant and B cell attracting chemokine-1, controls the normal organization of secondary lymphoid tissues by stimulating the homing of B and follicular T helper lymphocytes (1). CXCL13 is constitutively expressed in these structures and is mainly produced by follicular dendritic cells and stromal cells in response to lymphotoxin- β (1). CXCL13 also promotes the neogenesis of ectopic lymphoid structures in non-lymphoid organs (1), especially in chronic inflammatory diseases such as ulcerative colitis and chronic obstructive pulmonary disease, and in autoimmune diseases like rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (2–5). Follicular dendritic cells and stromal cells do not produce CXCL13 in ulcerative colitis and rheumatoid arthritis lesions, but macrophages within the lymphoid structures may do so (2).

Recent studies have demonstrated that CXCL13 is also a robust prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a progressive, fatal interstitial lung disease (ILD) (6–8). Blood CXCL13 concentrations of patients with IPF are significantly elevated and they predict the severity and progression of the disease (6). The concentrations of CXCL13 mRNA in pulmonary tissues from patients with IPF are significantly increased and CXCL13 protein is abundant around or within the B-cell aggregates near the fibrotic tissues (6, 7). However, the cellular source of CXCL13 in lung tissues remains unclear.

Pulmonary macrophages play a pivotal role in IPF by secreting a variety of pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators that promote the recruitment of immune cells and the activation and differentiation of lung fibroblasts (9, 10). Most alveolar macrophages (AM) of healthy subject come from self-renewing fetal monocytes (11). In contrast, chronic exposure to aggressive biological or chemical agents triggers the recruitment of circulating blood monocytes that differentiate into interstitial macrophages and/or AM in the lungs (10). Blood

monocyte-derived macrophages (MoDM) are intimately involved in the development of lung fibrosis in murine models. The genetic deletion of blood monocyte-derived AM and the selective depletion of Ly6C^{hi} circulating monocytes significantly inhibit the development of bleomycin-induced lung fibrosis in mice (12, 13). Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), which stimulates blood monocytes to differentiate into macrophages, favors the development of lung fibrosis in these mice (14). Bleomycin-treated M-CSF^{-/-} mice have fewer than normal AM and a lower fibrotic score than wild-type mice (14). Several indicators suggest that human blood MoDM, potentially differentiated by M-CSF, also contribute to the development of lung fibrosis. The concentration of M-CSF in bronchoalveolar lavages (BAL) and the density of CD68-positive cells (macrophage lineage) in the pulmonary tissues of patients with IPF are significantly higher than in control subjects (14, 15). Using flow cytometry, Yu et al. (2016) have demonstrated that most interstitial macrophages and AM from patients with IPF strongly bear CD206 mannose receptors whose expression is potently induced by M-CSF during human blood monocyte differentiation (16). Finally, human MoDM, differentiated *in vitro* with M-CSF, produce CXCL13 when stimulated with lipopolysaccharide (LPS) (2).

In the present study, in order to characterize the expression of CXCL13 in human pulmonary macrophages, we used immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) to determine CXCL13 production in lung tissues from patients with IPF. We identified the cytokines and signaling pathways regulating *in vitro* CXCL13 gene activity in human MoDM and AM. Lastly, we assessed the relationship between the circulating concentrations of these cytokines and CXCL13 in humans suffering from IPF.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

M-CSF was purchased from Miltenyi Biotec (Paris, France). Lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O55:B5) and BAY-117082 were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-10 were obtained from PeproTech (Neuilly-sur-Seine, France); anti-TNF- α and anti-IL-10 neutralizing antibodies (Abs) were provided by R&D System Europe (Biotechne, Lille, France); anti-phospho-I κ B α (ser32), anti-I κ B α , anti-p100/p52, anti-RelB, anti-phospho-STAT3 (Tyr705) and anti-GAPDH primary Abs were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Montigny-le Bretonneaux, France). Ruxolitinib was provided by Selleckchem (Houston, TX, USA). The Si-RNAs: ON-TARGETplus Control pool Nontargeting Pool (D-001810-10-05, Si-CTR), ON-TARGETplus Human RelB siRNA-SMARTpool (L-004767-00-0005, Si-BelB) and ON-TARGETplus Human NF κ B2 siRNA-SMARTpool (L-003918-00-0005, Si-p100/p52) were purchased from Dharmacon (Horizon discovery, UK).

Immunohistochemistry (IHC)

Lung biopsy samples were obtained from six patients with IPF. IPF was diagnosed according to the 2011 ATS/ERS/JRS/ALAT criteria, which include histopathological features of usual interstitial pneumonia (17). This study was approved by the Rennes University Hospital Ethics Committee (Comité d'éthique, avis n°16.123). Written informed consent was obtained from all subjects. Serial sections (4 μ m) were cut from paraffin-embedded tissue, mounted on positively charged slides and dried at 58°C for 60 min. They were immunostained in the Discovery Automated IHC stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, Ariz) using DABMap kits or CHROMOMap DAB kits to detect CD20, CD68 and CD206 or CXCL13, respectively. Briefly, paraffin was removed with EZ Prep solution (8 min / 75 °C)

and antigens were retrieved by incubation in CC1Tris-based buffer (95-100°C / 60 min). Endogenous peroxidase was blocked by incubation with Inhibitor-D 3% H₂O₂ (Ventana) (37°C / 4 min). Sections were then rinsed and incubated (37°C / 60 min) with primary Abs: mouse monoclonal anti-CD20 (Dako, M0755, clone L26, diluted 1/600), mouse monoclonal anti-CD68 (M0876, clone PG-M1, DAKO, diluted 1/1000), rabbit polyclonal anti-CD206 (Abcam, ab64693, diluted 1/2000), or mouse monoclonal anti-CXCL13 (R&D System, AF801, diluted 1/500). Signals were enhanced with compatible biotinylated goat secondary Abs for CD20, CD68 and CD206 or an Omni goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary Ab (Vector laboratory, Burlingame, CA, USA) for CXCL13. All sections were then counterstained with hematoxylin (4 min). Finally, slides were rinsed, manually dehydrated and coverslipped, and scanned with the Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu, Tokyo, Japan). Images of whole tissue areas were captured for analysis using NDPview2 software (Hamamatsu, Tokyo, Japan).

Immunofluorescence

IF analysis was performed on the samples from the same six IPF patients. Whole-slide sections (4 µm) were cut from lung tissue blocks with a microtome, transferred to charged slides, and immunostained for CD68, CD206 and CXCL13 (U DISCOVERY 4 plex IF; Roche Diagnostic, Meylan, France) using the Abs (at similar dilutions) described in the IHC section. Proteins were visualized by incubating sections with unmodified primary Ab, with the corresponding HRP-conjugated secondary Ab and then producing the HRP enzyme-mediated deposition of the tyramide-fluorophore that covalently binds to the tissue at the site of the reaction. The primary Ab and secondary Ab-HRP complexes were finally heat-inactivated. CD68 was detected with dicyclohexylcarbodiimide, CD206 with fluorescein isothiocyanate, and CXCL13 with cyanine 5. These sequential reactions were repeated three times. Sections were mounted in fluoromount (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

All manipulations were performed at the Rennes H2P2 Histopathology platform (SFR UMS CNRS 3480 - INSERM 018). Stained sections were examined by confocal microscopy (Zeiss LSM-880 microscope) at the Rennes Microscopy Rennes Imaging Center (SFR UMS CNRS 3480 - INSERM 018). The recorded images were analyzed on Image J software.

Bronchoalveolar lavage

BAL were obtained from 11 patients: 2 IPF patients and 9 patients with other ILD. This study was approved by the local Ethic committee of the Rennes University Hospital (Comité d'éthique, avis n°19.09) and all patients have signed a written informed consent. BAL were performed under local anesthesia with 2% lidocaine. A flexible fiberoptic bronchoscope was inserted into the segmental bronchus of the middle lobe or into the lingula. About 100 ml of sterile 0.9% saline was instilled and then collected into sterile propylene tubes. The average volume obtained for experimental researches was about 10 ml. The resulting BAL were then centrifuged at 150 rpm for 10 min, washed once with 5 ml PBS, and suspended in GlutaMAX RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific, France) containing 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 20 IU/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin for 3 h. The adherent cells (i.e. AM) were washed and cultured in complete medium in the presence or absence of 20 ng/ml LPS for 24 h. At the end of the treatment, the supernatants were collected and frozen at -20°C. Total RNA were extracted from AM as described below.

Human MoDM culture

Buffy coats were collected from healthy donors who gave their consent for the use of blood samples for research (Etablissement Français du Sang, Rennes, France). The peripheral blood mononuclear cells were collected by Ficoll gradient centrifugation and monocytes were isolated by adhesion (1 h). They were then allowed to differentiate into M0 macrophages by incubation (6-7 days) in GlutaMAX RPMI 1640 medium containing 10 % heat-inactivated

fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 20 IU/ml penicillin, 20 µg/ml streptomycin and 50 ng/ml M-CSF (16). These resting MoDM (M0 macrophages) were washed and cultured in fresh complete culture medium containing 10 ng/ml M-CSF. RNA interference technology was used for gene silencing in some experiments. MoDM were transfected with siRNAs (30 pmol) using Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific, France) according to the manufacturer's instruction, and then incubated for 24 h with 20 ng/ml M-CSF in complete culture medium before stimulation.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from cells with Trizol (Thermo Fisher Scientific, France) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, France). Quantitative PCR was performed (SYBR Green methodology) on a CFX384 real-time PCR system (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) (16). The primers were provided by Sigma-Aldrich (Kiqstart primers). The specificity of amplified genes was checked at the end of PCR using the comparative cycle threshold method (CFX Manager™ Software). These mean Cq values were used to normalize the target mRNA concentrations to those of the 18S ribosomal protein by the $2(-\Delta\Delta Cq)$ method.

Cytokine quantification

The concentrations of CXCL13, TNF- α and IL-10 were measured by ELISA, (Duoset ELISA development system kits, R&D Systems Europe, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The limits of quantification (LOQ) were: CXCL13 - 15.2 pg/ml, TNF- α - 13.4 pg/ml, and IL-10 - 31.3 pg/ml. The three cytokines were quantified in cell culture media and in blood serum samples taken from 70 patients when they were diagnosed with IPF. All these samples were taken before the patients were given antifibrotic treatment. This study was approved by the Ethic committee related to the Rennes University Hospital

(Comité de protection des personnes Ouest V, CHU Rennes, n°2014-A00268-39) and each patient signed a written informed consent. Serum samples were stored at -80°C at the Biobank, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes.

Western blotting

Cells were lysed with a RIPA buffer containing a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Meylan, France), and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and then centrifuged. After measuring protein concentrations by the Bio-Rad Protein Assay Kit, the lysates were diluted in loading buffer, heated at 95°C, loaded on a 4 % stacking gel and separated on a 10 % gel by SDS electrophoresis as previously described (16). The proteins were then transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting overnight (30 V at 4°C). After blocking, the membranes were then hybridized overnight at 4°C with appropriate primary Abs and incubated with HRP-conjugated secondary Abs before analysis by chemiluminescence on a ChemiDoc XRS+ System and the Image Lab software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Statistical analyses

All the cellular endpoints were obtained using AM or MoDM from different donors. The data were reported as means \pm standard deviation (SD). Significant differences were assessed using a two-way Student *t*-test or a one-way ANOVA followed by the multi-range Dunnett's *t*-test for multiple comparisons. Correlations between cytokine concentrations in MoDM supernatants were determined with the Pearson correlation coefficient. For cytokine concentrations in human blood samples, significant differences were assessed using the non-parametric Mann-Whitney test. Correlations between the cytokine blood concentrations were determined using the Spearman's rank correlation coefficient. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

CXCL13 is expressed in alveolar macrophages from patients with IPF

We first used IHC to detect CXCL13 in surgical lung biopsies from six patients with IPF. CXCL13 staining was intense around the lymphoid aggregates containing B cells (Figure S1A), in agreement with DePianto et al. (7). However, there was no staining within cells, suggesting that the chemokine was secreted. We studied the CD68 and CD206 expression that is abundant on pulmonary macrophages from patients with IPF (15) to determine whether CXCL13 was produced by macrophages that had infiltrated the lymphoid aggregates (Figure S1A). There was little CD68 or CD206 staining around or within the lymphoid structures, and any CD68/CD206 staining was not co-localized with the CXCL13 staining. We therefore looked for CXCL13 in alveolar tissues where macrophages are constitutively present. CD68- and CD206-positive cells (i.e. AM) were abundant in pulmonary alveoli (Figure 1A). These macrophages bore intense CD206 staining. There was CXCL13 staining on most AM but not on CD68- and CD206-negative cells. The intracellular CXCL13 staining was diffuse, mainly cytoplasmic but also at the cell membrane. The biopsies from all the patients provided similar images. We also stained sections with the CXCL13 isotype control Ab (mouse IgG, Vector, I-2000). The isotype control staining in AM was clearly less intense than the CXCL13 staining (Figure S1B), confirming the specificity of CXCL13 expression in lung biopsies.

Multiplex IF staining showed that CXCL13 was present in CD68- and CD206-positive AM (Figure 1B) while the CD68- and CD206-negative cells in the alveoli had no CXCL13 staining. This indicates that AM from patients with IPF produce CXCL13.

LPS induces CXCL13 expression by activating NF- κ B pathways

We then focused our study on the production of CXCL13 by AM and MoDM. AM were isolated from BAL collected from 11 patients with IPF or other ILD. AM stimulation with 20

ng/ml LPS for 24 h significantly increased both CXCL13 mRNA and protein levels (Figure 2A). CXCL13 mRNA expression was also strongly and stably increased in MoDM stimulated for 8-24h (Figure 2B, left panel). CXCL13 protein released into the culture medium was maximal after stimulation for 24 h (Figure 2B, right panel). We next examined the signaling pathways mediating CXCL13 gene expression in MoDM. The I κ B α kinase inhibitor BAY 11-7082 (BAY) nearly abrogated CXCL13 release from LPS-stimulated MoDM (Figure 2C), which suggests that the NF- κ B signaling pathways control CXCL13 gene expression. LPS is known to rapidly activate the canonical NF- κ B pathway by stimulating the phosphorylation and subsequent breakdown of the NF- κ B inhibitor I κ B α that sequesters NF- κ B subunits to the cytoplasm (18). This canonical pathway, activated by I κ B kinase β in most cells, leads to the translocation of the NF- κ B dimer RelA:p50 to the nucleus. These transcription factors increase the expression of several genes that regulate innate and adaptive immune responses. They also induce the gene encoding I κ B α and stimulate the synthesis of the NF- κ B subunits NF κ B2 (p100) and RelB that mediate the non-canonical NF- κ B pathway. The phosphorylation and subsequent processing of NF κ B2 (p100) catalyzed by I κ B kinase- α produce the active p52 subunit which interacts then with RelB (18).

Incubating MoDM with LPS for 2 h stimulated the phosphorylation and breakdown of I κ B α , followed by an increased I κ B α synthesis after 24 h (Figure 2D). As expected, pre-treating MoDM with BAY blocked the stimulation of I κ B α synthesis. Incubation with LPS for 24 h also increased the concentrations of NF κ B2 and RelB mRNA expressions (Figure S2A) and those of the proteins NF κ B2 (p100), p52 and RelB in MoDM (Figure S2B). Pre-treating cells with BAY totally blocked this late production of these three subunits that control the non-canonical NF- κ B pathway (Figure 2E). The fact that CXCL13 synthesis was also delayed in LPS-stimulated human MoDM suggests that the non-canonical NF- κ B pathway

activates CXCL13 gene transcription, as shown in murine cells (19). We tested this by transfecting MoDM with SiRNAs to block RelB mRNA (Si-RelB) and p100/p52 mRNA (Si-p100). Si-RelB completely blocked RelB protein synthesis in LPS-stimulated MoDM but did not affect p100/p52 proteins (Figure 2F). Si-p100 prevented any increase in p100 and p52 proteins and reduced the expression of RelB protein. This indicates that transcription of the RelB gene is activated by canonical NF- κ B pathways and regulated by non-canonical signaling (20). Blocking the synthesis of RelB or p100/p52 in LPS-stimulated MoDM significantly reduced their CXCL13 mRNA expression levels (Figure 2G). Thus, canonical and non-canonical NF- κ B signaling pathways play major roles in the regulation of CXCL13 production by MoDM.

TNF- α and IL-10 mediate CXCL13 gene induction in LPS-stimulated MoDM

We next determined the influence of early LPS-induced cytokines on CXCL13 synthesis by MoDM. We investigated the roles of TNF- α and IL-10 because they were reported to stimulate CXCL13 expression in activated murine stromal cells and LPS-stimulated dendritic cells, respectively (21, 22). LPS very rapidly increased the concentrations of both TNF- α and IL-10 mRNAs in MoDM (Figure 3A). Cells stimulated for 4 to 8 h secreted the highest concentration of TNF- α into the culture medium (Figure 3B, upper panel). In contrast, the amount of IL-10 released by cells activated for 24 h gradually increased (Figure 3B, lower panel). The early induction of both TNF- α and IL-10 genes was fully blocked by BAY (Figure 3C), suggesting that the cytokines are involved in CXCL13 synthesis.

To explore this hypothesis, we used Abs that neutralized TNF- α (aT) and IL-10 (aI) proteins. AT significantly decreased the amounts of NF κ B2 (p100) and RelB mRNAs in MoDM exposed to LPS for 24 h (Figure 3D) and blocked the synthesis of p100/p52 and RelB proteins (Figure 3E). In contrast, aI alone did not modify the amounts of the three non-

canonical NF- κ B subunits, or amplify the effects of AT. However, each Ab alone significantly inhibited the induction of CXCL13 mRNA in LPS-stimulated MoDM and the secretion of CXCL13 (Figures 3F-G). The Ab combination showed a trend to a stronger inhibition of the CXCL13 mRNA expression than the single Abs (Figure 3F) and a significantly stronger inhibition of the CXCL13 release than the aT alone (Figure 3G). These findings suggest that TNF- α mediates CXCL13 gene induction in LPS-stimulated MoDM by activating NF- κ B and that IL-10 enhances its effect, leading to maximal CXCL13 synthesis. This is further supported by the finding that the CXCL13 concentrations in culture media do not correlate with those of TNF- α but significantly correlate with those of IL-10 (Figure S2C).

IL-10 enhances TNF- α -induced CXCL13 expression by activating JAK/STAT signaling

If TNF- α and IL-10 control CXCL13 gene induction in LPS-stimulated MoDM, human recombinant TNF- α and IL-10 should mimic the effects of LPS in MoDM. Indeed, stimulating MoDM with TNF- α for 2 h increased the phosphorylation of I κ B α and its subsequent breakdown, just like LPS (Figure 4A). However, IL-10 did not alter the activation of the canonical NF- κ B pathway, either alone or combined with TNF- α . Moreover, TNF- α , but not IL-10, significantly increased NF κ B2 and RelB mRNA levels and p100, p52 and RelB protein expression (Figure 4B-C). The TNF- α /IL-10 combination did not further stimulate the synthesis of the three non-canonical NF- κ B subunits (Figure 4C). TNF- α increased both CXCL13 mRNA and protein concentrations and its effect was enhanced, although not significantly, by IL-10 (Figure 4D-E). Finally, cells stimulated with IL-10 alone contained slightly increased (12-fold) CXCL13 mRNA concentrations and released slightly more CXCL13 (Figures 4D-E). These findings confirm that TNF- α and IL-10 control CXCL13

expression in MoDM and highlight the fact that IL-10 enhances CXCL13 gene induction independently of any direct NF- κ B activation.

The binding of IL-10 to its cognate receptor activates JAK/STAT pathways rather than NF- κ B and especially stimulates STAT3-dependent signaling in human MoDM (23). We found that LPS stimulated STAT3 phosphorylation in cells treated for at least 2 h and that STAT3 remained activated for 24 h (Figure 4F). We looked at the effects of ruxolitinib, a potent Janus kinase (JAK) inhibitor (24), to see if JAK/STAT signaling pathways also mediates CXCL13 synthesis by MoDM. Ruxolitinib blocked the phosphorylation of STAT3 triggered by LPS or IL-10 (Figure S2D). We incubated MoDM with LPS for 4 h to stimulate TNF- α and IL-10 production and then added ruxolitinib for 20 h to block the JAK/STAT pathways. Ruxolitinib did not reduce the secretion of TNF- α or IL-10 (Figure 4G), and did not reduce NF κ B2 (p100) or RelB mRNA expression (Figure 4H), which demonstrates that it did not interfere with the NF- κ B pathways in MoDM stimulated in these experimental conditions. However, ruxolitinib blocked the increase in CXCL13 mRNA induced by IL-10 (Figure S2E) and LPS (Figure 4I). These results suggest that IL-10 enhances the TNF- α -induced CXCL13 expression by activating a JAK/STAT signaling pathway.

TNF- α and IL-10 are mediators of LPS-induced CXCL13 gene expression in human AM

We then examined human AM from patients with ILD, including IPF, to see if similar molecular mechanisms controlled CXCL13 synthesis in these macrophages. Incubating AM with LPS for 24 h increased the secretion of TNF- α and IL-10 (Figures 5A) and enhanced the levels of NF κ B2 (p100) mRNA, but not those of RelB, suggesting that the non-canonical NF- κ B pathway was not fully activated *in vitro* (Figure 5B). Nevertheless, AM treated with aT combined with aI had significantly reduced NF κ B2 and CXCL13 mRNA

levels (Figure 5B), indicating that TNF- α combined with IL-10, may also mediate CXCL13 gene expression in activated AM from patients with ILD.

Blood TNF- α and IL-10 concentrations correlate with CXCL13 in patients with IPF

To determine whether TNF- α and IL-10 modulate CXCL13 production in humans, we examined the CXCL13, TNF- α and IL-10 concentrations in blood samples taken from 70 patients suffering from IPF at the time of their diagnosis. The arithmetic and median mean concentrations of CXCL13 were 120.5 ± 181.8 pg/ml and 49.2 pg/ml, respectively. Most (75.7 %) blood samples had no detectable TNF- α levels and 58.6 % had no IL-10. Only 22.8 % (n=16) and 15.7 % (n=11) of total blood samples had TNF- α or IL-10 concentrations above their LOQ, respectively. Interestingly, almost all the blood samples with TNF- α or IL-10 concentrations above the LOQ had CXCL13 concentrations higher than the median concentration (Figure 6A; left panel). Moreover, among those samples with TNF- α or IL-10 concentrations above the LOQ, 11/16 (68 %) and 7/11 (63.3 %) had CXCL13 concentrations in the highest quartile (Figure 6A, right panel), respectively. The concentrations of TNF- α and IL-10 in the 70 blood samples were significantly correlated (Figure 6B, left panel) and also significantly correlated with CXCL13 (Figure 6B, right panels). Finally, the TNF- α concentrations of the 16 samples which were above the LOQ correlated strongly with their corresponding CXCL13 concentrations (Figure 6C). No significant correlation was detected between the eleven IL-10 > LOQ concentrations and the corresponding CXCL13 concentrations.

Discussion

In this study, we demonstrated that CXCL13 is expressed in AM from patients with IPF. CXCL13 expression was increased *in vitro* in LPS-stimulated AM and MoDM. Both canonical and non-canonical NF- κ B signaling regulate CXCL13 expression in LPS-activated MoDM. LPS rapidly stimulated the expression of TNF- α and IL-10 which then mediate CXCL13 gene induction by activating NF- κ B and JAK/STAT pathways, respectively. TNF- α and IL-10 are also mediators of LPS-induced CXCL13 gene expression in AM. The relevance of these findings in IPF patients was supported by demonstrating that TNF- α and IL-10 correlate with CXCL13 concentrations in blood samples of these patients.

IHC confirmed the finding of DePianto et al. (2015) that CXCL13 staining is intense around the B-cell aggregates in lung tissues from patients with IPF (7). The staining was not clearly inside the cells but rather indicated that the protein was secreted and then deposited on fibrillary structures. Carlsen et al. (2) demonstrated that released CXCL13 is indeed associated with extracellular fibrils such as fibronectin in ulcerative colitis lesions. Our studies also revealed only faint CD68 and CD206 staining around and within B cell aggregates and no co-localization of these markers with CXCL13, indicating that macrophages are probably not the source of CXCL13 in these lymphoid structures. In contrast, our results showed that CD68- and CD206-positive macrophages in pulmonary alveoli contain CXCL13, unlike other cells in these structures. Stimulating human AM from the BAL of patients with ILD, including IPF, induced CXCL13 gene expression and CXCL13 release. Thus, pulmonary macrophages are probably a source of CXCL13 in patients with IPF. Nevertheless, we have still to determine whether other pulmonary cells secrete CXCL13 in order to explain the very high concentration of CXCL13 around the B-cell aggregates.

Our RNA silencing experiments showed that blocking p100/p52 and RelB synthesis significantly reduced the CXCL13 mRNA expression in LPS-stimulated MoDM, confirming

that the non-canonical NF- κ B pathway contributes significantly to CXCL13 gene expression in human macrophages, as in other murine and human cells (19, 25). But we did find that optimal CXCL13 gene expression in macrophages required the coordinated activation of the NF- κ B pathway by TNF- α and the JAK/STAT pathway by IL-10.

TNF- α activated the canonical and non-canonical NF- κ B pathways in resting M0 MoDM, unlike IL-10, and only the neutralization of TNF- α blocked NF κ B2 and RelB gene induction in LPS-stimulated MoDM. TNF- α alone significantly increased CXCL13 gene expression and its neutralization prevented the LPS-dependent induction of CXCL13 mRNA. TNF- α activates the canonical NF- κ B pathway by binding to the ubiquitous TNF receptor 1. It also binds to TNF receptor 2 (TNFR2), which triggers p100 processing and activates the non-canonical pathway (26). Nonetheless, the distribution of TNFR2 is much more restricted and limited to a few cell types, including human MoDM (27). The processing of p100 is catalyzed by NF- κ B-inducing kinase (NIK); it activates I κ B kinase- α dimers that in turn phosphorylate p100 and trigger its partial breakdown by the proteasome to generate the p52 subunit (28). Basal p100 processing is low in most cells because the TRAF2/TRAF3/cIAP ubiquitin ligase complex constantly mediates ubiquitination and rapid proteosomal breakdown of NIK (28). Activating cells with lymphotoxin- β receptor agonists or TNF- α -induced TNFR2 stimulates TRAF2 breakdown, which in turn stabilizes NIK protein synthesis and promotes p100 processing. We did not measure NIK production by MoDM, but as the differentiation of monocytes into macrophages increases NIK synthesis (29), the constitutive concentration of stabilized NIK protein was probably sufficient to promote p100 processing.

Neutralizing IL-10 protein did not prevent activation of the non-canonical NF- κ B pathway, but it significantly reduced CXCL13 gene expression in LPS-stimulated MoDM. Conversely, IL-10 did not activate NF- κ B pathways, although it produced a small increase in the amounts

of CXCL13 mRNA in resting MoDM. We interpret these results as demonstrating that IL-10 activates CXCL13 gene expression by an alternative mechanism that is not dependent on NF- κ B. The selective JAK inhibitor, ruxolitinib, significantly reduced the increases in CXCL13 mRNA in both LPS- and IL-10-stimulated MoDM. It neither prevented the release of TNF- α and IL-10 nor reduced the production of p100/p52 and RelB in activated cells, suggesting that it specifically blocks CXCL13 gene expression by inhibiting a JAK/STAT pathway. We did not further examine this additional pathway but there is evidence that the transcription factor STAT3 is involved in the LPS and IL-10 effects. First, STAT3 enhances CXCL13 gene expression in other cell types (30); second, LPS and IL-10 activate STAT3 in macrophages (23, 31); and third, ruxolitinib fully blocked the activation of STAT3 induced by LPS and IL-10 in MoDM.

We also found evidence that IL-10 strongly enhanced TNF- α -induced CXCL13 gene expression in MoDM. Stimulating MoDM with TNF- α in combination with IL-10 enhanced the increase in CXCL13 mRNA triggered by TNF- α alone. Moreover, treating MoDM with Abs against both TNF- α and IL-10 reduced CXCL13 gene expression more than did incubation with TNF- α alone. This suggests that the IL-10-activated JAK/STAT pathway enhances the non-canonical NF- κ B-dependent CXCL13 gene expression induced by TNF- α . STAT3 appears to increase the activity of the non-canonical NF- κ B pathway by different mechanisms. STAT3 that has been acetylated by the cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300 can enhance p100 processing to p52 in several human cell types (32). But this is unlikely to occur in MoDM as IL-10 did not increase the p52 protein concentration induced by TNF- α and neutralizing IL-10 did not reduce the amount of p52 protein in LPS-stimulated cells. Blocking STAT3 production represses the RelB:p52-dependent induction of the cyclooxygenase 2 gene in human placenta cells (33). In this latter

study, Yu et al. (2015) showed that STAT3 was co-localized with RelB and p52 in the cytoplasm and nuclei of these cells, suggesting that STAT3 physically interacts with RelB/p52 to increase either their translocation to the nucleus or their transcriptional activity (33). Taken together, these results support the idea that STAT3 cooperates with non-canonical NF- κ B to induce maximal CXCL13 gene expression in MoDM. Additional experiments are now warranted to validate this. IL-10 may not be involved in the regulation of CXCL13 gene expression only in MoDM; it may also function in dendritic cells, since blocking IL-10 significantly reduced the production of CXCL13 by LPS-stimulated dendritic cells (22).

Finally, our data indicate that TNF- α , and possibly IL-10, contribute to CXCL13 production in patients with IPF. Stimulating AM with LPS *in vitro* increased the expression of the genes encoding TNF- α , IL-10, NF κ B2 and CXCL13 while blocking TNF- α and IL-10 production significantly reduced the increase of CXCL13 mRNA. However, the RelB mRNA concentration in LPS-stimulated AM was not increased. This reduced RelB synthesis may limit the formation of RelB:p52 dimers and consequently the expression of CXCL13 mRNA. Our results clearly show that the amounts of CXCL13 secreted by activated AM in response to LPS stimulation is much lower than those released from MoDM (see Figure 2). The concentrations of CXCL13 in the blood of patients with IPF also provides valuable information. Most blood samples that contained CXCL13 concentration below the median CXCL13 concentration contained no detectable TNF- α or IL-10. In contrast, 61.1 % of the blood samples with the highest CXCL13 concentrations (the fourth quartile) had TNF- α concentrations above their LOQ, and 38.8 % of these high-CXCL13 samples had similarly high IL-10 concentrations. Moreover, the highest TNF- α concentrations (> LOQ) were strongly correlated with those of CXCL13. This was not detected with the highest IL-10 concentrations, but only eleven samples were above their LOQ, a number which might be to

low to show a correlation between IL-10 (> LOQ) and CXCL13 concentrations. Nevertheless, the 70 IL-10 concentrations closely correlate with the CXCL13 concentrations. As TNF- α and IL-10 induced CXCL13 gene expression *in vitro*, these correlations suggest that both cytokines are involved in CXCL13 production in some IPF patients. TNF- α and IL-10 are present in human lung tissues and the concentrations of IL-10 mRNA in pulmonary biopsies from patients with IPF are higher than in those from controls (34). Bergeron et al (2003) also reported that hyperplastic alveolar epithelial cells were a prominent source of IL-10 in lung tissues from patients with IPF. TNF- α and IL-10 are also secreted by B and T cells, dendritic cells and macrophages present in lung tissues. We did not investigate why the blood TNF- α and IL-10 concentrations could be quantified in only a small number of IPF patients. However, since TNF- α and IL-10 are typically produced in response to pro-inflammatory stimuli, it seems likely that blood TNF- α , IL-10 and CXCL13 concentrations were especially increased in IPF patients who had inflammation prior to blood sampling. Further, clinical studies on large cohorts will be required to confirm that some patients with IPF have substantial blood TNF and/or IL-10 concentrations and to investigate the clinical consequences of these increased cytokine concentrations.

In conclusion, our results indicate that CXCL13 is produced by AM of patients with IPF and that TNF- α and IL-10 regulate its production. More generally, we have identified the crucial roles of the NF- κ B and JAK/STAT pathways in CXCL13 gene expression in human inflammatory MoDM.

Acknowledgements

We thank the Microscopy Rennes Imaging Center (MRic) of SFR UMS CNRS 3480 - INSERM 018 for confocal microscopy analyses, Cécile Daoudal (ILD nurse, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes), Mireille Désille (Biobank, Centre Hospitalier

Universitaire, Rennes) and Professor Olivier Fardel for helpful comments and critically reading the manuscript. Dr Owen Parkes edited the English text.

Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Rennes (Univ Rennes) and Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Nessrine Bellamri holds a fellowship from the University of Rennes.

References

1. Cyster, J. G., K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther, and V. N. Ngo. 2000. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* 176: 181–193.
2. Carlsen, H. S., E. S. Baekkevold, H. C. Morton, G. Haraldsen, and P. Brandtzaeg. 2004. Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood* 104: 3021–3027.
3. Litsiou, E., M. Semitekolou, I. E. Galani, I. Morianos, A. Tsoutsas, P. Kara, D. Rontogianni, I. Bellenis, M. Konstantinou, K. Potaris, E. Andreacos, P. Sideras, S. Zakyntinos, and M. Tsoumakidou. 2013. CXCL13 production in B cells via Toll-like receptor/lymphotoxin receptor signaling is involved in lymphoid neogenesis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187: 1194–1202.
4. Finch, D. K., R. Ettinger, J. L. Karnell, R. Herbst, and M. A. Sleeman. 2013. Effects of CXCL13 inhibition on lymphoid follicles in models of autoimmune disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 43: 501–509.
5. Klimatcheva, E., T. Pandina, C. Reilly, S. Torno, H. Bussler, M. Scrivens, A. Jonason, C. Mallow, M. Doherty, M. Paris, E. S. Smith, and M. Zauderer. 2015. CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders. *BMC Immunol.* 16: 6.
6. Vuga, L. J., J. R. Tedrow, K. V. Pandit, J. Tan, D. J. Kass, J. Xue, D. Chandra, J. K. Leader, K. F. Gibson, N. Kaminski, F. C. Sciurba, and S. R. Duncan. 2014. C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13) is a prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189: 966–974.
7. DePianto, D. J., S. Chandriani, A. R. Abbas, G. Jia, E. N. N'Diaye, P. Caplazi, S. E. Kauder, S. Biswas, S. K. Karnik, C. Ha, Z. Modrusan, M. A. Matthay, J. Kukreja, H. R. Collard, J. G. Egen, P. J. Wolters, and J. R. Arron. 2015. Heterogeneous gene expression

signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 70: 48–56.

8. Neighbors, M., C. R. Cabanski, T. R. Ramalingam, X. R. Sheng, G. W. Tew, C. Gu, G. Jia, K. Peng, J. M. Ray, B. Ley, P. J. Wolters, H. R. Collard, and J. R. Arron. 2018. Prognostic and predictive biomarkers for patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with pirfenidone: post-hoc assessment of the CAPACITY and ASCEND trials. *Lancet Respir Med* 6: 615–626.

9. Prasse, A., D. V. Pechkovsky, G. B. Toews, W. Jungraithmayr, F. Kollert, T. Goldmann, E. Vollmer, J. Müller-Quernheim, and G. Zissel. 2006. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173: 781–792.

10. Morales-Nebreda, L., A. V. Misharin, H. Perlman, and G. R. S. Budinger. 2015. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur Respir Rev* 24: 505–509.

11. van de Laar, L., W. Saelens, S. De Prijck, L. Martens, C. L. Scott, G. Van Isterdael, E. Hoffmann, R. Beyaert, Y. Saeys, B. N. Lambrecht, and M. Guilliams. 2016. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44: 755–768.

12. Gibbons, M. A., A. C. MacKinnon, P. Ramachandran, K. Dhaliwal, R. Duffin, A. T. Phythian-Adams, N. van Rooijen, C. Haslett, S. E. Howie, A. J. Simpson, N. Hirani, J. Gauldie, J. P. Iredale, T. Sethi, and S. J. Forbes. 2011. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184: 569–581.

13. Misharin, A. V., L. Morales-Nebreda, P. A. Reyfman, C. M. Cuda, J. M. Walter, A. C. McQuattie-Pimentel, C.-I. Chen, K. R. Anekalla, N. Joshi, K. J. N. Williams, H. Abdala-

Valencia, T. J. Yacoub, M. Chi, S. Chiu, F. J. Gonzalez-Gonzalez, K. Gates, A. P. Lam, T. T. Nicholson, P. J. Homan, S. Soberanes, S. Dominguez, V. K. Morgan, R. Saber, A. Shaffer, M. Hinchcliff, S. A. Marshall, A. Bharat, S. Berdnikovs, S. M. Bhorade, E. T. Bartom, R. I. Morimoto, W. E. Balch, J. I. Sznajder, N. S. Chandel, G. M. Mutlu, M. Jain, C. J. Gottardi, B. D. Singer, K. M. Ridge, N. Bagheri, A. Shilatifard, G. R. S. Budinger, and H. Perlman. 2017. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J. Exp. Med.* 214: 2387–2404.

14. Baran, C. P., J. M. Opalek, S. McMaken, C. A. Newland, J. M. O'Brien, M. G. Hunter, B. D. Bringardner, M. M. Monick, D. R. Brigstock, P. C. Stromberg, G. W. Hunninghake, and C. B. Marsh. 2007. Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176: 78–89.

15. Yamashita, M., R. Saito, S. Yasuhira, Y. Fukuda, H. Sasamo, T. Sugai, K. Yamauchi, and M. Maemondo. 2018. Distinct Profiles of CD163-Positive Macrophages in Idiopathic Interstitial Pneumonias. *J Immunol Res* 2018: 1436236.

16. Bellamri, N., C. Morzadec, A. Joannes, V. Lecureur, L. Wollin, S. Jouneau, and L. Vernhet. 2019. Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. *Int. Immunopharmacol.* 72: 112–123.

17. Raghu, G., H. R. Collard, J. J. Egan, F. J. Martinez, J. Behr, K. K. Brown, T. V. Colby, J.-F. Cordier, K. R. Flaherty, J. A. Lasky, D. A. Lynch, J. H. Ryu, J. J. Swigris, A. U. Wells, J. Ancochea, D. Bouros, C. Carvalho, U. Costabel, M. Ebina, D. M. Hansell, T. Johkoh, D. S. Kim, T. E. King, Y. Kondoh, J. Myers, N. L. Müller, A. G. Nicholson, L. Richeldi, M. Selman, R. F. Dudden, B. S. Griss, S. L. Protzko, H. J. Schünemann, and ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 2011. An official

ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183: 788–824.

18. Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25: 280–288.

19. Bonizzi, G., M. Bebien, D. C. Otero, K. E. Johnson-Vroom, Y. Cao, D. Vu, A. G. Jegga, B. J. Aronow, G. Ghosh, R. C. Rickert, and M. Karin. 2004. Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* 23: 4202–4210.

20. Bren, G. D., N. J. Solan, H. Miyoshi, K. N. Pennington, L. J. Pobst, and C. V. Paya. 2001. Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene* 20: 7722–7733.

21. Suto, H., T. Katakai, M. Sugai, T. Kinashi, and A. Shimizu. 2009. CXCL13 production by an established lymph node stromal cell line via lymphotoxin-beta receptor engagement involves the cooperation of multiple signaling pathways. *Int. Immunol.* 21: 467–476.

22. Perrier, P., F. O. Martinez, M. Locati, G. Bianchi, M. Nebuloni, G. Vago, F. Bazzoni, S. Sozzani, P. Allavena, and A. Mantovani. 2004. Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. *J. Immunol.* 172: 7031–7042.

23. Staples, K. J., T. Smallie, L. M. Williams, A. Foey, B. Burke, B. M. J. Foxwell, and L. Ziegler-Heitbrock. 2007. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J. Immunol.* 178: 4779–4785.

24. Febvre-James, M., V. Lecureur, Y. Augagneur, A. Mayati, and O. Fardel. 2018. Repression of interferon β -regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 54: 354–365.

25. Tando, T., A. Ishizaka, H. Watanabe, T. Ito, S. Iida, T. Haraguchi, T. Mizutani, T. Izumi, T. Isobe, T. Akiyama, J. Inoue, and H. Iba. 2010. Requiem protein links RelB/p52 and the

- Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF- κ B pathway. *J. Biol. Chem.* 285: 21951–21960.
26. Borghi, A., L. Verstrepen, and R. Beyaert. 2016. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. *Biochem. Pharmacol.* 116: 1–10.
27. Ruspi, G., E. M. Schmidt, F. McCann, M. Feldmann, R. O. Williams, A. A. Stoop, and J. L. E. Dean. 2014. TNFR2 increases the sensitivity of ligand-induced activation of the p38 MAPK and NF- κ B pathways and signals TRAF2 protein degradation in macrophages. *Cell. Signal.* 26: 683–690.
28. Sun, S.-C. 2011. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 21: 71–85.
29. Li, T., M. J. Morgan, S. Choksi, Y. Zhang, Y.-S. Kim, and Z. Liu. 2010. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF- κ B pathway by regulating expression of the kinase IKK α during macrophage differentiation. *Nat. Immunol.* 11: 799–805.
30. Eddens, T., W. Elsegeiny, M. de la L. Garcia-Hernandez, P. Castillo, G. Trevejo-Nunez, K. Serody, B. T. Campfield, S. A. Khader, K. Chen, J. Rangel-Moreno, and J. K. Kolls. 2017. Pneumocystis-Driven Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation Requires Th2 and Th17 Immunity. *Cell Rep* 18: 3078–3090.
31. Agbanoma, G., C. Li, D. Ennis, A. C. Palfreeman, L. M. Williams, and F. M. Brennan. 2012. Production of TNF- α in macrophages activated by T cells, compared with lipopolysaccharide, uses distinct IL-10-dependent regulatory mechanism. *J. Immunol.* 188: 1307–1317.
32. Nadiminty, N., W. Lou, S. O. Lee, X. Lin, D. L. Trump, and A. C. Gao. 2006. Stat3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 7264–7269.

33. Yu, L. J., B. Wang, N. Parobchak, N. Roche, and T. Rosen. 2015. STAT3 cooperates with the non-canonical NF- κ B signaling to regulate pro-labor genes in the human placenta. *Placenta* 36: 581–586.
34. Bergeron, A., P. Soler, M. Kambouchner, P. Loiseau, B. Milleron, D. Valeyre, A. J. Hance, and A. Tazi. 2003. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF-beta and IL-10. *Eur. Respir. J.* 22: 69–76.

Legends

Figure 1: CXCL13 is expressed in CD68- and CD206-positive AM. The lung tissue from a patient with IPF was explored for CD68, CD206 and CXCL13 by IHC (A) and IF (B). (B) upper panels: x 65. Red circles indicate the regions at higher magnifications. Red arrow heads indicate cells negative for CD68/CD206 and CXCL13. Similar images of CD68, CD206 and CXCL13 staining were obtained with lung tissues from six patients with IPF.

Figure 2: CXCL13 expression is induced in activated AM and MoDM and is controlled by NF- κ B. AM (A) and MoDM (B-G) were cultured without (M0) or with 20 ng/ml LPS for 24 h or other times. In some experiments, MoDM were first treated with 5 μ M Bay (C-E) or transiently transfected with control, RelB or p100/p52 SiRNA for 24 h (F-G). Relative CXCL13 mRNA were measured by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in cells stimulated with LPS (A), in M0 cells (B, left panel) or in cells transfected with control SiRNA and stimulated with LPS (G), arbitrarily set at 1. CXCL13 concentrations in cultured media were measured by ELISA. In (D-F), cells were lysed and protein expressions were analyzed by Western blotting. Each image is representative of at least three independent experiments. Results are means \pm SD of 11 (A, left panel), 8 (A, right panel), 4 (B, left panel), 5 (B, right panel), 3 (C) and 7 (G) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus LPS (A), M0 (B), “0” LPS (C) and “SiC” LPS (G)

Figure 3: CXCL13 expression is mediated by TNF- α and IL-10 in LPS-stimulated MoDM. MoDM were untreated (M0, 0) or treated with 5 μ M BAY or 2 μ g/ml neutralizing Abs directed against TNF- α (aT) or IL-10 (aI), and then stimulated with 20 ng/ml LPS for 1 h (C), 24 h (D-F) or the indicated times (A, B). Relative mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S mRNA levels. Data are

expressed relatively to mRNA levels found in M0 cells (A) or cells stimulated with “0” LPS (C, D, F), arbitrarily set at 1. Concentrations of TNF- α , IL10 and CXCL13 secreted in the culture media were quantified by ELISA. In (E), cells were lysed and protein expressions were analyzed by Western blotting. Images are representative of at least three independent experiments. Results are expressed as means \pm SD of 7 (A), 5 (B), 3 (C), 3 (D, upper panel), 8 (D, lower panel), 7 (F) and 5 (G) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus “M0” (A, B), “0” LPS (C, D, F, G).

Figure 4: IL-10 enhances CXCL13 expression induced by TNF- α through a JAK/STAT pathway. MoDM were untreated (M0) or stimulated with 20 ng/ml TNF- α (T) and/or IL10 (I) for 24 h, or with 20 ng/ml LPS for 24 h or the indicated times. In (A, C, F), cells were lysed and protein expressions were analyzed by Western blotting. Each images is representative of at least three independent experiments. Relative mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in M0 cells (B, D) or in cells stimulated with “0” LPS (G-I), arbitrarily set at 1. Concentrations of TNF- α , IL10 and CXCL13 secreted in the culture media were quantified by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of 6 (B, left panel), 4 (B, right panel), 6 (D), 5 (E), 4 (G, left panel), 7 (G, right panel) and 5 (H-I) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus M0 (B, D, E) or “0” LPS (G-I).

Figure 5: Effects of neutralizing Abs directed against TNF- α (aT) or IL-10 (aI) on AM. Human AM (M0) were untreated (0) or treated with 2 μ g/ml aT and/ or aI, and then stimulated with 20 ng/ml LPS for 24 h. Concentrations of TNF- α and IL-10 in the culture media were quantified by ELISA. Relative mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed

relative to mRNA levels found in cells stimulated with “0” LPS, arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SD of 4 (A, left panel), 8 (A, right panel) and 11 (B) independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus “M0” (A) or “0” LPS (B).

Figure 6: Correlations of blood TNF- α , IL-10 and CXCL13 concentrations in serum of patients with IPF. Concentrations of TNF- α , IL-10 and CXCL13 in blood serum of seventy patients with IPF were measured by ELISA. In (A), TNF- α and IL-10 concentrations were referred to CXCL13 median “M” (A, left panel) or quartiles “Q” (A, right panel). The numbers of values of TNF- α or IL-10 concentrations above their respective LOQ are indicated in italics. (B, C) Correlations between the values of the blood serum concentrations of TNF- α , IL10 and CXCL13. In (B), values of the seventy blood serum concentrations; in (C), values of the TNF- α and IL-10 concentrations above their respective LOQ. r_s : Spearman's rank correlation coefficient; ns: not significant. ** p <0.01, *** p <0.001

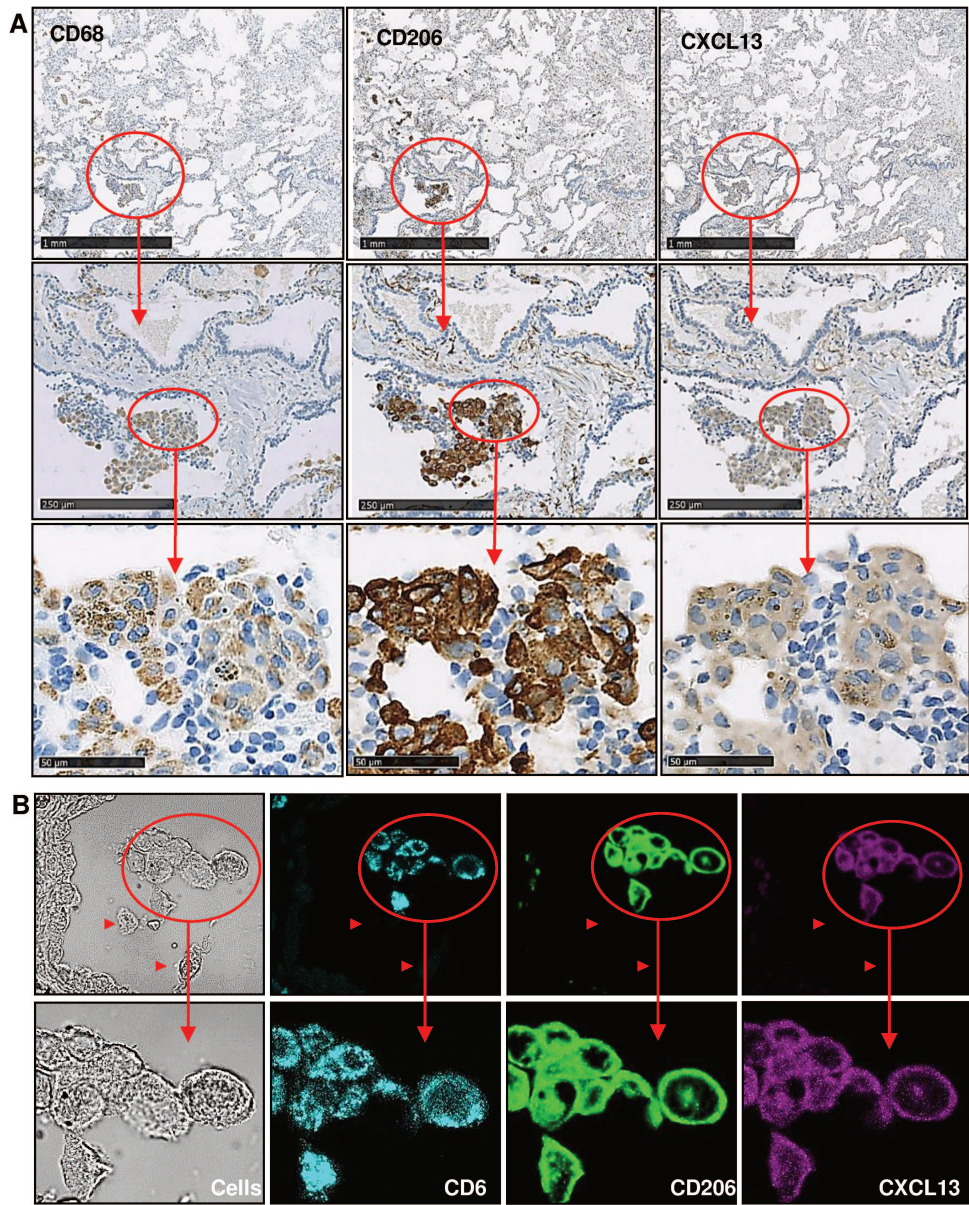


Figure 1

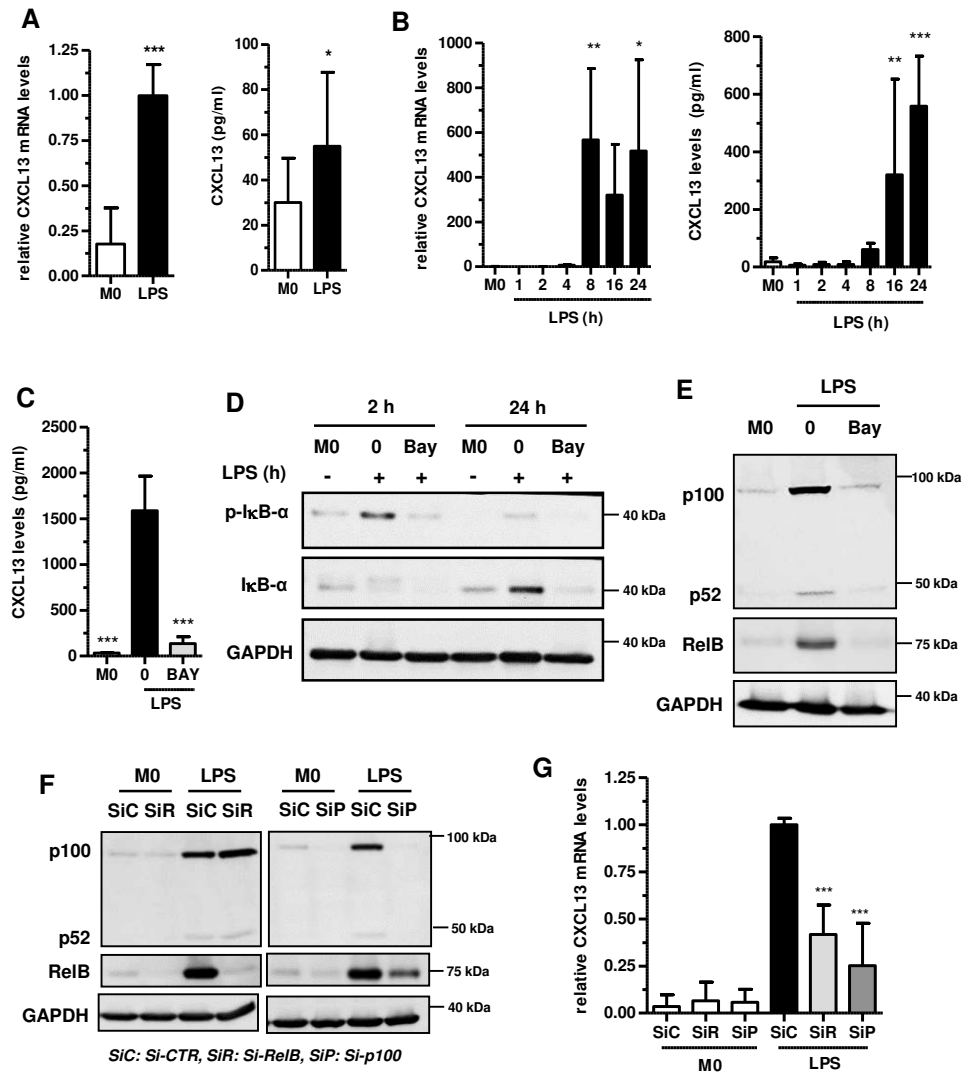


Figure 2

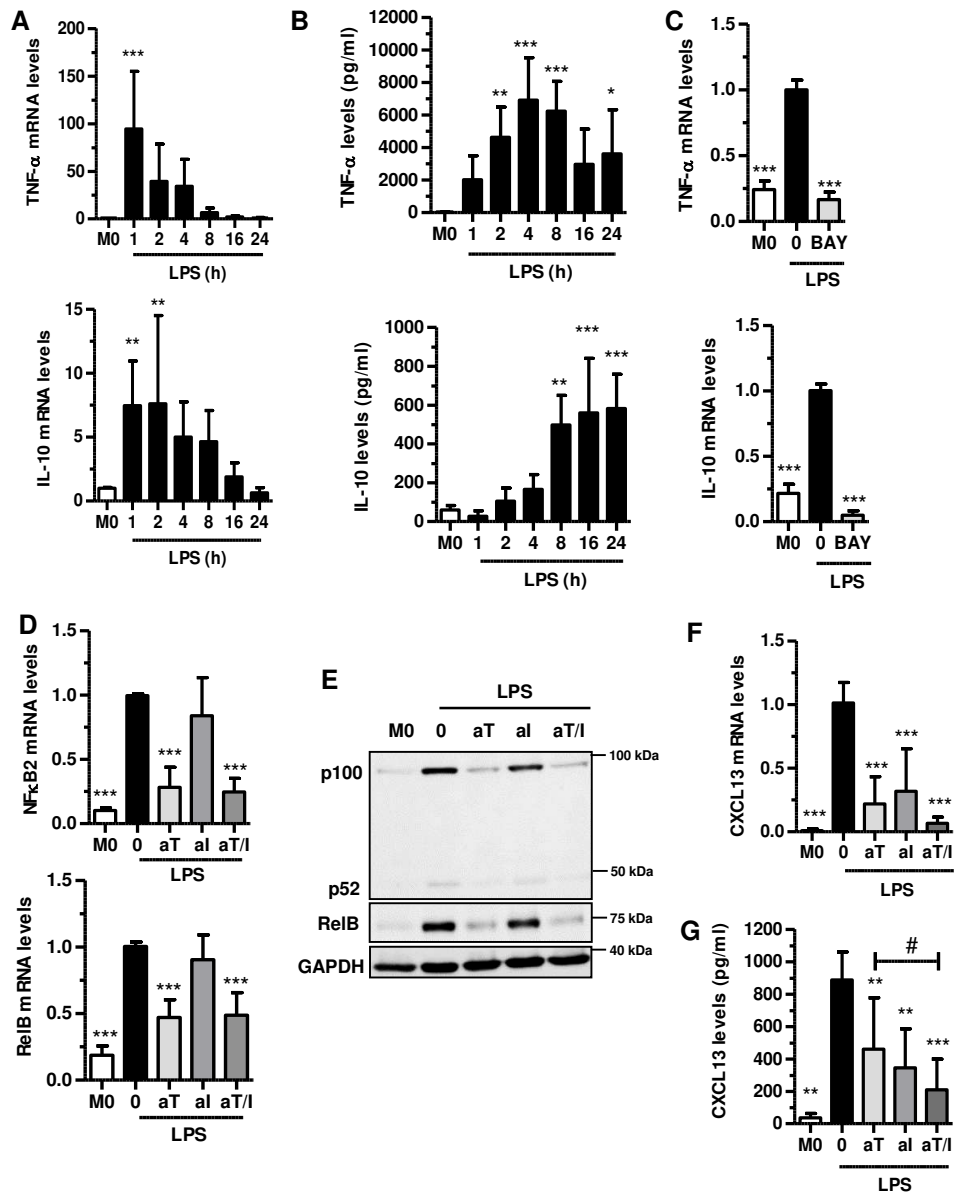


Figure 3

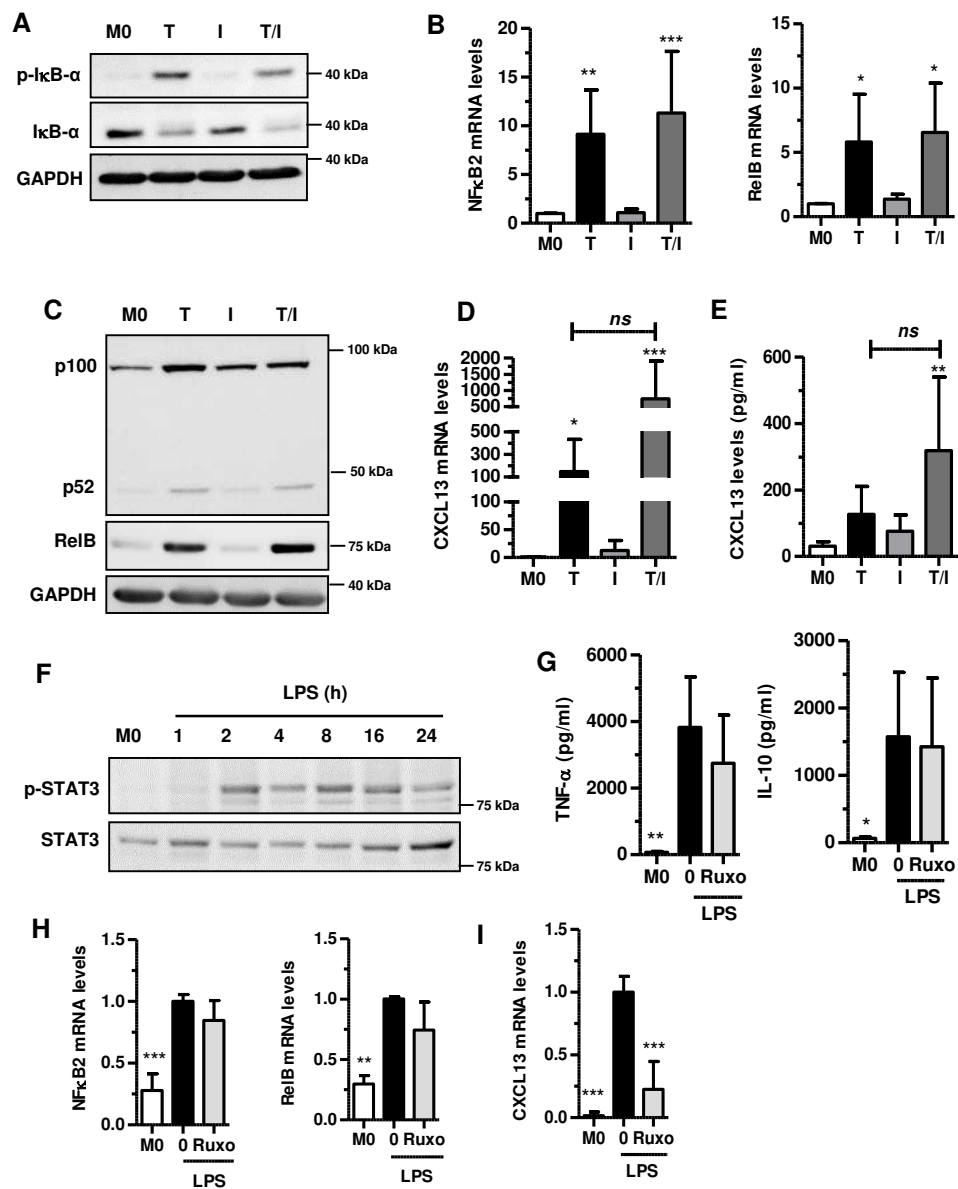


Figure 4

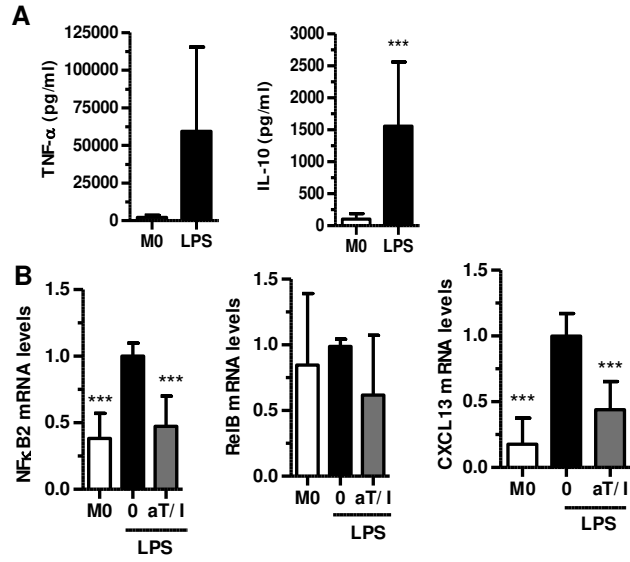


Figure 5

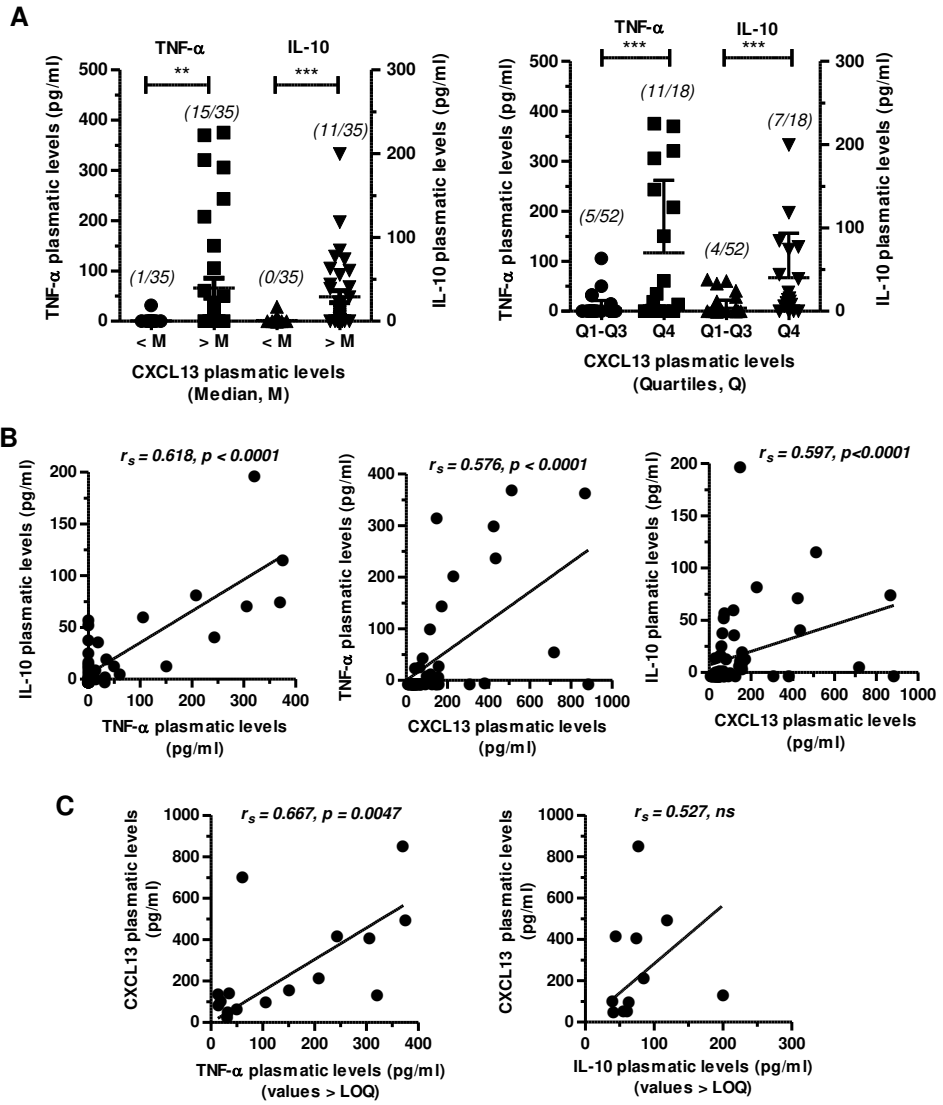


Figure 6

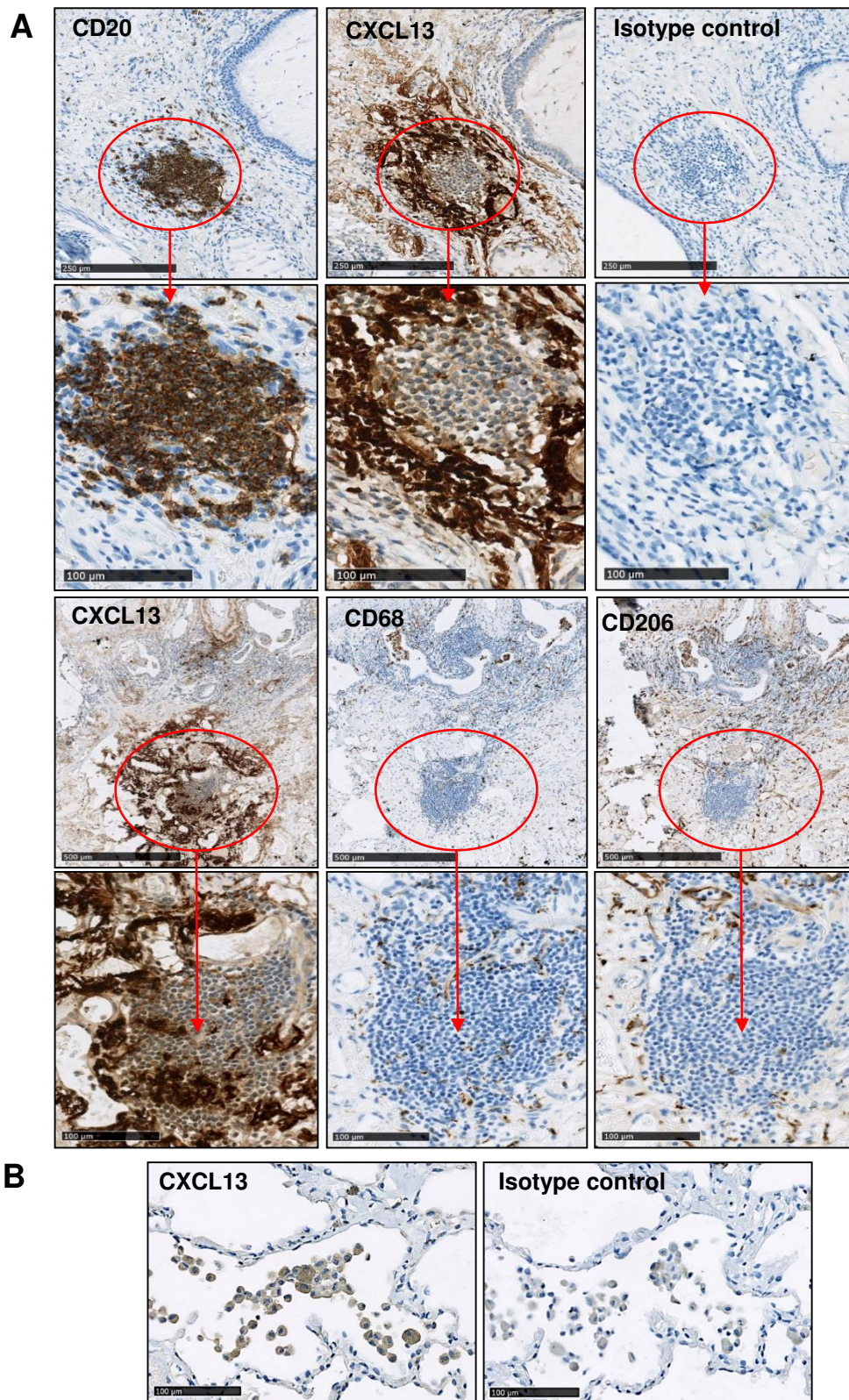


Figure S1: Expression of CXCL13, CD68 and CD206 around or within CD20-positive lymphoid aggregates (A) and expression of CXCL13 in alveolar tissues (B) isolated from a patient with IPF were analyzed by IHC as described in the “Materials and methods” section. Immunostaining was also performed using the CXCL13 isotype control Ab. Red circles indicate the region shown at a higher magnification in panel (A). Similar images of CXCL13, CD68 and CD206 staining were obtained with lung tissues isolated from six patients with IPF.

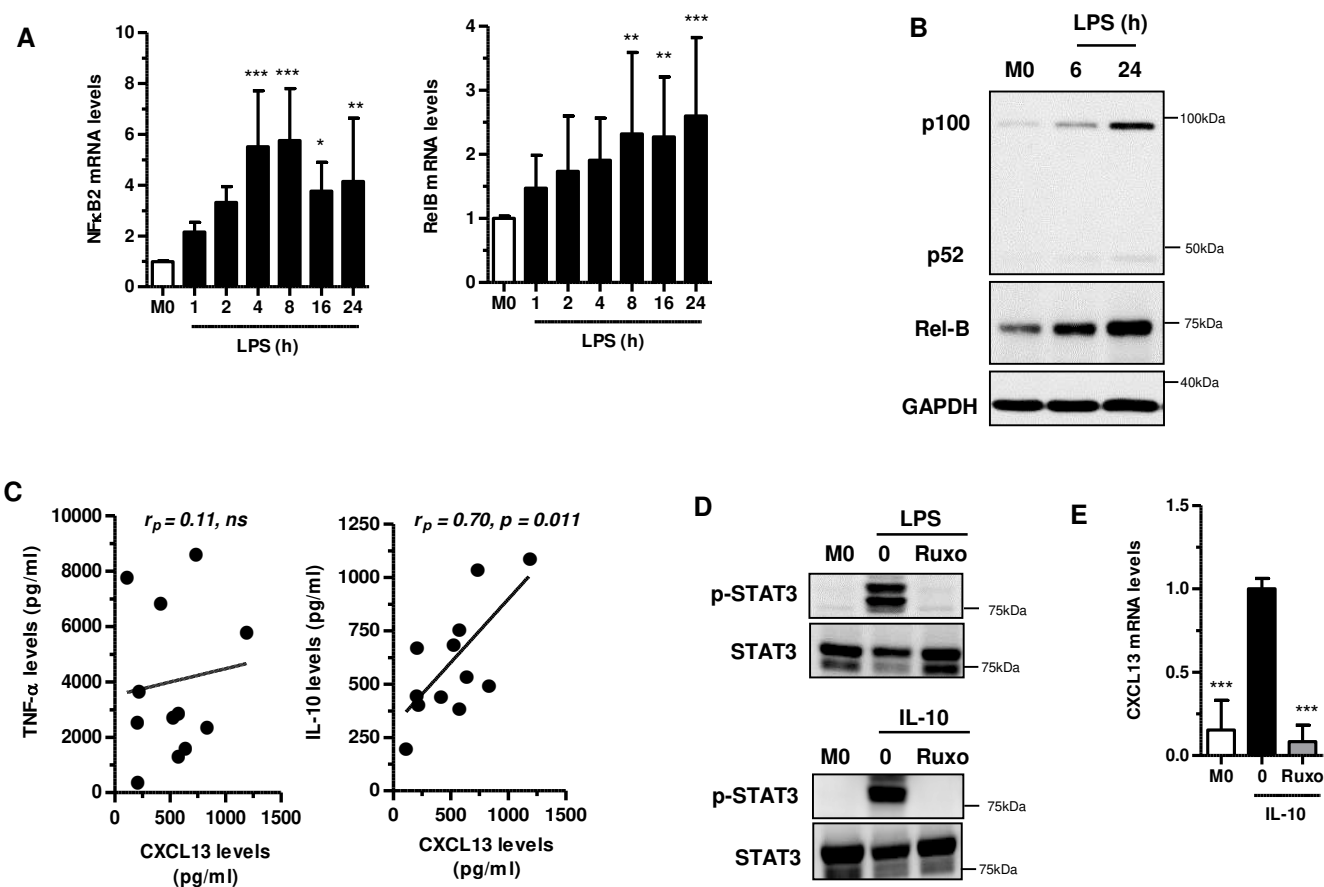


Figure S2: Human MoDM were left untreated (M0) or treated with 5 μ M ruxolitinib (Ruxo) and then stimulated either with 20 ng/ml LPS for 6 h (D, left panel), 24 h (C) or the indicated times (A), or with 20 ng/ml human recombinant IL-10 for 10 min (D, right panel) or 24 h (E). Relative mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relative to mRNA levels found in M0 cells (A) or “0” IL-10 (E), arbitrarily set at 1. In (B and D), cells were lysed and total proteins were extracted as described in Materials and Methods. Protein expressions were determined by Western blotting. Images are representative of at least three independent experiments. The concentrations of TNF- α , IL-10 and CXCL13 in culture media were quantified by ELISA. Correlation between the values of TNF- α , IL-10 and CXCL13 concentrations (r_p : Pearson correlation coefficient, ns: not significant). Results are expressed as means \pm SD of 6 (A), 12 (C) and 3 (E) independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus M01 (A) or “0” IL-10 (E).

Discussion et perspectives

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que le NTD module la physiologie *in vitro* du macrophage humain en inhibant l'activation de CSF-1R mais également en interférant avec d'autres cibles restant à identifier. Ces effets inhibiteurs du NTD préviennent l'expression de l'IL-10 et celle de CXCL13 qui est un facteur pronostic de la FPI. Le NTD pourrait bloquer indirectement l'induction du gène codant CXCL13 en inhibant la synthèse de l'IL-10. En effet, dans la seconde partie de mes travaux de recherche, nous avons caractérisé l'expression de CXCL13 dans les macrophages humains et nous avons démontré que le TNF- α et l'IL-10 contrôlent l'expression de CXCL13 en activant respectivement la voie NF- κ B non-canonique et une voie JAK/STAT.

Différentes études ont démontré que le NTD présente des effets anti-inflammatoires dans divers modèles de fibrose chez la souris, et notamment dans la fibrose pulmonaire (Wollin et al., 2014). Toutefois les bases moléculaires de ces effets anti-inflammatoires restent peu claires. Notre étude met en évidence que, *in vitro*, le NTD altère le phénotype des MDM en partie via l'inhibition du récepteur CSF-1R. Il inhibe de façon dose-dépendante la phosphorylation de CSF-1R puis l'activation secondaire des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK induites par le CSF-1. La liaison du CSF-1 à son récepteur induit la dimérisation de CSF-1R et l'autophosphorylation rapide de plusieurs tyrosines dont la Tyr-723 (Tyr-721 chez les souris). La voie PI3K/AKT est activée après interaction de sa sous-unité régulatrice p85 avec la tyrosine-721 phosphorylée (Sampaio et al., 2011). La liaison de la protéine adaptatrice Grb2 aux tyrosines phosphorylées du CSF-1R active la voie ERK (Pixley and Stanley, 2004). Notre étude démontre que de très faibles concentrations de NTD diminuent très fortement, mais pas totalement, la phosphorylation de CSF-1R (CI50 < 10 nM). Ce résultat est en accord avec les travaux récents de Hilberg *et coll* (2018) démontrant les effets inhibiteurs du NTD sur l'activité kinase de la protéine CSF-1R recombinante humaine (CI50=5 \pm 2 nM) (Hilberg et al., 2018). Toutefois, à la concentration de 10 nM, le NTD ne prévient pas l'activation des voies PI3K et ERK. L'activité résiduelle de CSF-1R détectée dans les macrophages exposés à 10 nM NTD est probablement suffisante pour induire les interactions p85-PI3K et Grb2-ERK puis activer les voies de signalisation PI3K et ERK. Des expériences d'immunoprécipitation permettraient d'évaluer l'impact du NTD sur ces interactions protéiques dans le macrophage humain. Cette capacité du NTD à inhiber l'activation de CSF-1R à de très faibles concentrations pourrait être intéressante pour inhiber la croissance de cellules tumorales induite par CSF-1, comme par exemple dans le cancer du sein (Achkova and Maher, 2016).

Ce blocage de CSF-1R pourrait aussi réduire l'inflammation tissulaire qui peut être induite par CSF-1 au cours de la polyarthrite rhumatoïde (Garcia et al., 2016).

Les résultats de nos travaux démontrent que le NTD influence différentes fonctions du macrophage humain en inhibant la phosphorylation de CSF-1R. Le NTD diminue l'adhérence cellulaire, sans induire de cytotoxicité à des concentrations < 200 nM, et très probablement en inhibant la voie PI3K qui est activée par la liaison de CSF-1 à son récepteur. En effet, la culture des macrophages humains en absence de CSF-1 ou en présence de l'inhibiteur de CSF-1R (GW2580, GW) ou de l'inhibiteur de la voie PI3K (LY 294000, LY) réduit l'adhérence cellulaire et induit un changement morphologique des macrophages similaire à celui provoqué par le NTD. Chez la souris, la voie PI3K-AKT favorise l'adhérence et la mobilité du macrophage en modulant l'organisation du cytosquelette d'actine via la paxilline. Cette protéine majeure des complexes focaux des macrophages est phosphorylée par la kinase Pyk-2 qui est elle-même activée par la voie PI3K-AKT (Stanley and Chitu, 2014). Afin de préciser les mécanismes par lesquels le NTD réduit l'adhérence cellulaire, il serait donc nécessaire de déterminer si le NTD peut diminuer l'interaction entre les protéines paxillin et Pyk-2 dans le macrophage humain. De plus, comme les souris déficientes en Pyk-2 présentent une altération de la mobilité des macrophages (Okigaki et al., 2003), il serait intéressant de rechercher l'impact du NTD sur la fonction de migration du macrophage humain.

Le NTD et le GW n'altèrent ni la survie du macrophage ni l'expression membranaire des protéines CD206 et CD71 qui sont des marqueurs majeurs du macrophage mature non polarisé (M0). Ces résultats montrent que la viabilité et le phénotype des macrophages M0 sont donc indépendants de la voie CSF-1/CSF-1R. En revanche, ces deux molécules diminuent significativement l'expression de CCL2 qui est induite par CSF-1 dans les macrophages (Baran et al., 2007). De plus, nous montrons que le LY diminue également l'expression de CCL2 qui est donc régulée positivement par la voie PI3K. Cet effet du NTD est important à prendre en compte puisque CCL2 contribue au développement de la fibrose pulmonaire chez la souris. En effet, les souris déficientes en CCL2 présentent moins d'infiltration de macrophages CD68⁺ au niveau pulmonaire et développent moins de fibrose pulmonaire en réponse à la bléomycine. La concentration de CCL2 est augmentée dans le sang et les liquides de LBA des patients atteints de FPI, ce qui suggère un rôle possible de cette chimiokine dans le développement de la fibrose pulmonaire chez les humains. Toutefois, le Carlumab, un anticorps monoclonal dirigé contre CCL2, n'améliore ni la fonction respiratoire ni la survie des patients souffrant de FPI (Raghu et al., 2015).

L'inhibition de la voie CSF-1/CSF-1R par le NTD et le GW altère différemment le profil de cytokines exprimées par les macrophages M1 et M2. Les deux molécules réduisent la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-8 par le macrophage M1. Comme les niveaux d'ARNm de l'IL-1 β et de l'IL-8 ne sont pas modifiés, le NTD et le GW interfèrent probablement avec la synthèse des protéines. Il est admis que la maturation de l'IL-1 β est principalement contrôlée par l'inflammasome NLRP3 dans le macrophage (He et al., 2016). Au sein de ce complexe protéique, le clivage de la pro-IL-1 β en protéine mature est assuré par la caspase 1. Cette protéase est un effecteur de l'inflammasome qui est constitué de la protéine NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC (He et al., 2016). *Gaidt et coll* ont rapporté que la caspase 8 favorise l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans le monocyte humain stimulé par le LPS (Gaidt et al., 2016). De plus, la différenciation du monocyte humain en macrophage, induite par le CSF-1, requière la caspase 8 qui semble essentielle à la survie de ces cellules (Rébé et al., 2007). En inhibant CSF-1R, le NTD et le GW pourraient donc bloquer l'activation d'une voie de signalisation impliquant la caspase 8 et contrôlant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Toutefois, aucune étude n'a pour le moment impliqué le rôle potentiel de cette caspase dans les mécanismes moléculaires régulant la production d'IL-1 β dans les macrophages humains différenciés par CSF-1. De façon similaire, le mécanisme réduisant la sécrétion d'IL-8 par le macrophage exposé au NTD ou au GW reste à démontrer. Un traitement par l'anticorps anti-CSF-1 diminue la production d'IL-8 par le tissu synovial de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Garcia et al., 2016), ce qui confirme toutefois la capacité de CSF-1 à réguler positivement l'expression de l'IL-8. Concernant le macrophage M2, le NTD et le GW ne modifient pas l'expression de PDGF-BB et de CCL22, mais augmentent significativement celle de CCL18. Contrairement à ce que nous avons observé dans le macrophage M1, ce résultat montre que la voie CSF-1/CSF-1R inhibe l'expression de CCL18 induite par l'IL-4 et l'IL-13 dans le macrophage humain. Les voies de signalisation contrôlant cette inhibition sont à élucider.

Le NTD altère également le phénotype du macrophage en interférant avec des cibles moléculaires indépendantes de CSF-1R. En effet, contrairement au GW, le NTD diminue significativement l'expression de l'IL-10 et de CXCL13 dans le macrophage M1. Le NTD pourrait prévenir la production de ces cytokines en inhibant la kinase Btk (Bruton tyrosine Kinase) qui est rapidement activée par le LPS dans les macrophages humains et de souris (Ping et al., 2017; Schmidt et al., 2006). L'inhibition de Btk par l'ibrutinib réduit l'expression des ARNm codant l'IL-10 et CXCL13 qui est induite par le LPS. Cependant, il n'est pas

clairement établi si BtK stimule directement l'expression du gène CXCL13 car le traitement des macrophages humains par un anticorps anti-IL-10 diminue significativement l'expression de cette chimiokine (Perrier et al., 2004). *In vitro*, le NTD inhibe l'activité kinase de la protéine recombinante humaine BtK (IC50= 34 nM) (Hilberg et al., 2018). Il serait donc nécessaire de déterminer si le NTD peut également bloquer l'activation de BtK dans le macrophage humain afin d'identifier cette kinase comme une nouvelle cible moléculaire du NTD. Enfin, le NTD ne modifie pas l'expression membranaire des marqueurs M1, mais à des concentrations ≥ 200 nM, il réduit significativement l'expression des marqueurs M2a (CD11b, CD206, CD209) indépendamment de l'inhibition du CSF-1R. À 50 nM, le NTD diminue également l'expression membranaire du CD206. *Huang et coll* ont déjà démontré que le NTD diminue partiellement l'expression de CD206 dans le macrophage humain M2, mais ils n'avaient pas analysé le rôle de CSF-1R dans cet effet du NTD (Huang et al., 2017a). Le NTD altère la polarisation des macrophages M2 indépendamment de la protéine BtK, car cette kinase ne semble pas altérer la signalisation induite par l'IL-4 (Fiorcari et al., 2016). En revanche, le NTD pourrait réduire l'expression des marqueurs M2a en inhibant la kinase Hck, qui fait partie de la famille Src. La kinase Hck contrôle en effet l'expression de CD206 induite par l'IL-13 dans le monocyte humain (Bhattacharjee et al., 2011). De plus, il est connu que le NTD inhibe l'activité kinase de plusieurs Src (Hilberg et al., 2018; Li et al., 2017b), mais son effet sur celle de la protéine HcK reste à démontrer. L'ensemble de ces résultats démontre que le NTD altère le phénotype et la polarisation des macrophages humains en inhibant l'activité du récepteur CSF-1R et en réprimant probablement l'activité d'autres kinases dont la nature devra être caractérisée. Un schéma récapitulant les effets du NTD sur le macrophage humain est présenté dans la figure 44.

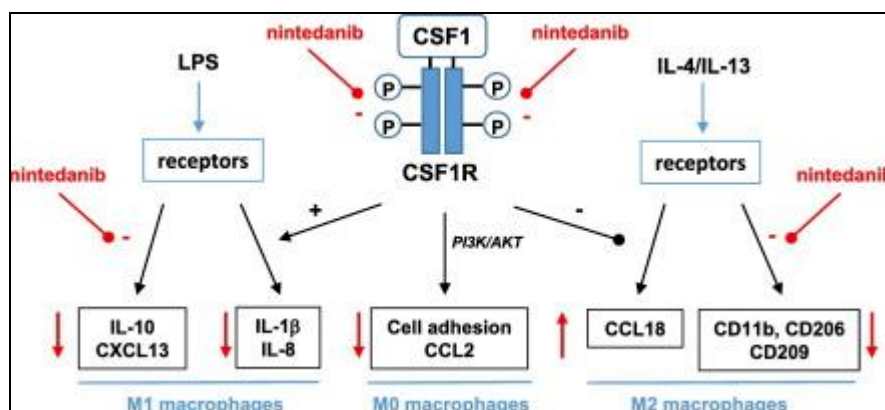


Figure 44: Résumé graphique de l'effet du NTD sur le MDM (Bellamri et al., 2019).

Plus généralement, ces travaux de thèse démontrent que le NTD peut altérer les réponses pro-inflammatoires du macrophage humain en prévenant l'expression de différentes cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-10, CCL2 et CXCL13 qui contribuent toutes à la fibrose pulmonaire (Kolahian et al., 2016; Richards et al., 2012; Vuga et al., 2014). Par exemple, l'IL-1 β et l'IL-10 favorisent la prolifération des fibroblastes (Kolb et al., 2001; Sun et al., 2011). Il serait donc intéressant de déterminer si la réduction de leurs concentrations dans les milieux de culture de macrophages humains traités par le NTD peut impacter la croissance de fibroblastes pulmonaires humains cultivés avec ces milieux conditionnés. La pertinence clinique de l'ensemble de ces premiers résultats reste cependant à démontrer car le NTD altère *in vitro* les fonctions du macrophage à des concentrations supérieures à celles mesurée dans le plasma de patients atteints de FPI et traités par ce médicament (Ogura et al., 2015). En effet, le NTD altère significativement le phénotype des macrophages seulement à des concentrations ≥ 200 nM alors que les concentrations plasmatiques maximales de NTD ne semblent < 100 nM chez les patients atteints de FPI. Cependant, les concentrations de NTD dans les tissus pulmonaires de ces patients ne sont pas connues. Il est donc difficile de prédire la capacité du NTD à induire des effets anti-inflammatoires au niveau du tissu pulmonaire humain. Des études cliniques supplémentaires pourraient évaluer les propriétés immuno-modulatrices du NTD chez les humains en mesurant les concentrations sanguines de différentes cytokines avant et après le traitement de patients par ce médicament. Ces résultats pourraient être comparés avec ceux obtenus chez les patients atteints de FPI et traités par la Pirfénidone.

Nous avons démontré dans la première partie de ma thèse que le NTD réprime l'expression de CXCL13, un biomarqueur pronostic de la FPI. Nos résultats indiquent que le NTD diminue également la sécrétion de l'IL-10 par le macrophage humain. Il est connu que l'IL-10 contribue à l'induction de l'expression de CXCL13 dans les CD humaines exposées au LPS (Perrier et al., 2004). Il est donc possible que le NTD puisse indirectement inhiber la transcription du gène CXCL13 en réprimant la production d'IL-10. Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons caractérisé l'expression de CXCL13 dans le macrophage pulmonaire et le MDM humains, puis nous avons analysé les voies de signalisation impliquées.

Les résultats des analyses par immunohistochimie confirme que le marquage de CXCL13 est massivement présent autour des agrégats de LB ayant infiltré le tissu pulmonaire des patients atteints de FPI (DePianto et al., 2015). Ce marquage est diffus et n'est pas clairement intracellulaire, ce qui suggère que la protéine CXCL13 est sécrétée au niveau de ces structures

lymphoïdes. CXCL13 pourrait être liée à des protéines fibrillaires de type fibronectine, comme l'ont démontré *Carlsen et coll* en utilisant des biopsies de tissu intestinal prélevé chez des patients atteints de colite ulcéreuse (Carlsen, 2004). Des expériences de co-marquages de CXCL13 avec des éléments de la MEC permettraient de valider, ou non, le dépôt de CXCL13 au niveau des lésions fibroprolifératives pulmonaires des patients atteints de FPI. Notre étude révèle aussi que le marquage CXCL13 ne co-localise pas avec ceux de CD68 et CD206 retrouvés autour des agrégats lymphoïdes, ce qui indique que les macrophages ne sont probablement pas la source de CXCL13 au niveau des agrégats lymphoïdes. En revanche, nos analyses par immunohistochimie montrent que les macrophages CD68⁺/CD206⁺ du compartiment alvéolaire expriment CXCL13. Ce résultat a été confirmé par des expériences en immunofluorescence sur les mêmes blocs tissulaires obtenus à partir de biopsies pulmonaires chirurgicales de patients atteints de FPI. De plus, le LPS induit l'expression de CXCL13 dans les MA isolés des liquides de LBA de patients atteints de PID incluant la FPI. Nous n'avons obtenu que deux cultures de MA isolés de patients souffrant de FPI car les LBA sont peu pratiqués chez ces patients afin d'éviter le déclenchement d'une exacerbation. Ces premiers résultats soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle les macrophages pulmonaires, en particulier alvéolaires, sont une source de CXCL13 chez les patients atteints de FPI. Cependant, étant donné la très forte expression de CXCL13 au niveau des agrégats lymphoïdes pulmonaires et la faible quantité de macrophages détectées dans ces structures, il est possible que d'autres types cellulaires soient à l'origine de la production pulmonaire de CXCL13. Certains sous-types de LT, de LB et de CD, mais aussi des fibroblastes pulmonaires, pourraient produire la protéine CXCL13. En effet, *Kobayashi et coll* ont démontré que le traitement des LT CD4⁺ naïf par le TGF- β induit l'expression de CXCL13 (Kobayashi et al., 2016). Dans le contexte de la BPCO, *Litsiou et coll* ont identifié que seuls les LB des follicules lymphoïdes pulmonaires expriment CXCL13. *In vitro*, le traitement de ces LB pulmonaires par des extraits de cigarette, H₂O₂ ou par le LPS induit l'expression de CXCL13 (Litsiou et al., 2013). De plus, comme indiqué précédemment, *Perrier et coll* ont démontré que le LPS induit l'expression de CXCL13 dans les CD qui sont présentes dans le tissu pulmonaire des patients atteints de FPI (Marchal-Sommé et al., 2007; Perrier et al., 2004). Enfin, dans le contexte de l'asthme, les fibroblastes pulmonaires traités par l'IL-17 produisent la protéine CXCL13 (Al-Kufaidy et al., 2017).

Nous avons ensuite identifié les voies de signalisation contrôlant l'expression de CXCL13 dans le macrophage humain. Nous montrons que l'inhibition de l'expression de p100/p52 et

de RelB, par la méthode d'ARN interférence, diminue significativement l'expression de CXCL13 dans les MDM stimulés par le LPS. Ce résultat indique que les voies canonique et non-canonique NF- κ B contribuent significativement à l'expression du gène CXCL13 dans le macrophage humain, comme cela a été observé dans différents types cellulaires humains ou de souris (Bonizzi and Karin, 2004; Bonizzi et al., 2004). De plus, notre étude démontre que l'expression optimale de CXCL13 dans le macrophage humain activé par le LPS requière, au moins *in vitro*, l'activation coordonnée de la voie NF- κ B par le TNF- α et de la voie JAK/STAT par l'IL-10.

Concernant le rôle du TNF- α , nos résultats démontrent i) que la neutralisation du TNF- α produit par le MDM exposé au LPS inhibe l'induction des gènes NF- κ B2, RelB et CXCL13 et ii) que le TNF- α active les voies canonique et non-canonique NF- κ B et stimule l'expression de CXCL13 dans les MDM. Le TNF- α active la voie canonique NF- κ B après liaison à son récepteur ubiquitaire TNF-R1. Il se lie également au TNF-R2, ce qui induit la dégradation de p100 et active ainsi la voie non-canonique NF- κ B (Borghi et al., 2016). L'expression du TNF-R2 est fortement restreinte et limitée à un certain nombre de types cellulaires incluant le MDM humain (Ruspi et al., 2014). Le clivage de p100 est catalysée par NIK qui active I κ B kinase- α . Cette kinase phosphoryle alors p100 qui sera clivé par le protéasome afin de générer la sous-unité active p52 (Sun, 2011). Le clivage constitutif de p100 est faible dans la plupart des cellules car le complexe TRAF2/TRAF3/cIAP induit constamment une ubiquitination et une dégradation rapide de NIK par le protéasome (Sun, 2011). L'activation des cellules avec un agoniste du LT β -R, ou avec du TNF- α , induit la dégradation de TRAF2, ce qui a pour conséquence de stabiliser la synthèse protéique de NIK et de promouvoir la dégradation de p100. Nous n'avons pas mesuré l'expression de NIK dans les cellules MDM mais la différenciation du monocyte en macrophage augmente et stabilise l'expression de NIK (Li et al., 2010). La concentration intracellulaire de NIK dans le MDM est probablement suffisante pour promouvoir la dégradation de p100.

Contrairement au TNF- α , la neutralisation de la production d'IL-10 ne diminue pas l'activation des voies canonique et non-canonique NF- κ B mais réduit significativement l'expression du gène CXCL13 dans le MDM stimulé par le LPS. De même, l'IL-10 n'active pas les voies NF- κ B mais induit pourtant une légère augmentation de l'expression des ARNm CXCL13 dans les MDM. Ce résultat suggère que l'expression du gène CXCL13 peut-être induite par un mécanisme alternatif non dépendant de la voie NF- κ B. En effet, le Ruxolitinib, un inhibiteur la voie JAK/STAT, ne prévient pas l'activation des voies NF- κ B par le LPS mais

il réduit significativement l'augmentation des ARNm CXCL13 dans les MDM traités par le LPS ou par l'IL-10. La voie JAK/STAT pourrait donc contribuer à l'expression de CXCL13. Plusieurs arguments soutiennent l'hypothèse selon laquelle le facteur de transcription STAT3 régule l'expression de CXCL13 dans le MDM : i) STA3 augmente l'expression de CXCL13 dans d'autres types cellulaires (Eddens et al., 2017), ii) l'IL10 et le LPS activent STAT3 dans le macrophage (Agbanoma et al., 2012; Staples et al., 2007) et iii) nous montrons que le Ruxolitinib bloque l'activation de STAT3 induite par le LPS et l'IL-10 dans le MDM.

Nos travaux soulignent que l'IL-10 impacte également l'induction du gène CXCL13 par le TNF- α . En effet, la stimulation des MDM par l'association TNF- α /IL-10 augmente l'expression des ARNm CXCL13 induite par le TNF- α seul. De plus, le co-traitement des MDM par les anticorps anti-TNF- α et anti-IL-10 réduit plus fortement l'expression de CXCL13 que l'anticorps anti-TNF- α seul. Ce résultat suggère que la voie JAK/STAT activée par l'IL-10 renforce l'expression du gène CXCL13 induite par le TNF- α . STAT3 peut augmenter l'activité de la voie non-canonique NF- κ B induite par le TNF- α en stimulant différents mécanismes. STAT3 acétylé par la protéine CBP (CREB: cAMP response element binding protein-Binding Protein)/p300 augmente le clivage de p100 en p52 dans différents types cellulaires (Nadiminty et al., 2006). Cependant ce mécanisme n'est probablement pas mis en jeu dans les MDM car l'IL-10 n'augmente pas l'expression cellulaire de p52 induite par le TNF- α et la neutralisation d'IL-10 ne réduit pas la concentration de la protéine p52 dans les MDM traités par LPS. L'inhibition de STAT3 réprime l'induction par RelB/p52 du gène codant la cyclooxygénase-2 dans les cellules placentaires humaines (Yu et al., 2015). Dans cette étude *Yu et coll* montrent que STAT3 co-localise avec RelB et p52 au niveau cytoplasmique et nucléaire. Cela suggère que STAT3 interagit physiquement avec RelB/p52 afin d'augmenter la translocation nucléaire ou l'activité transcriptionnelle de ce complexe (Yu et al., 2015). L'ensemble de ces résultats indique que STAT3 pourrait coopérer avec la voie non-canonique NF- κ B afin d'induire une expression maximale de CXCL13 dans les MDM. Des expériences supplémentaires de co-localisation protéique sont nécessaires pour valider cette hypothèse. Un schéma résumant les voies de signalisation contrôlant l'expression de CXCL13 dans le MDM activé est présenté dans la figure 45.

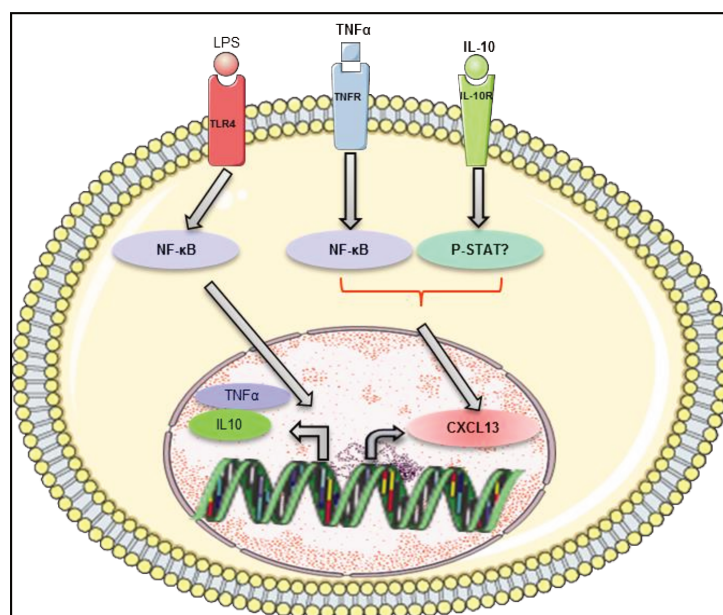


Figure 45: Les voies de signalisation contrôlant l'expression de CXCL13 dans le MDM activé.

Nos travaux démontrent que le TNF- α , et possiblement l'IL-10, contribuent à la production de CXCL13 dans les MA humains. La stimulation des MA par le LPS augmente l'expression des gènes codant le TNF- α , l'IL-10, NF- κ B2 et CXCL13. La neutralisation de la production de TNF- α et d'IL-10 induite par le LPS réduit significativement la concentration des ARNm NF- κ B2 et CXCL13. En revanche, le LPS n'augmente pas l'expression des ARNm RelB dans le MA humain. Une faible production de RelB doit limiter la formation du complexe RelB/p52 et probablement diminuer l'expression du gène CXCL13. Cette hypothèse pourrait expliquer les faibles concentrations de CXCL13 sécrétées par les MA comparées à celles produites par les MDM.

Enfin, les mesures des concentrations sériques de CXCL13, TNF- α et d'IL-10 suggèrent une possible coordination de l'expression de CXCL13 avec celle du TNF- α et de l'IL-10 chez les patients atteints de FPI. La grande majorité des échantillons de sérum, dont la concentration de CXCL13 est inférieure à la médiane, ne contiennent pas de concentrations détectables de TNF- α et d'IL-10. Au contraire, 61,1% des échantillons sériques présentant un taux élevé de CXCL13, classé dans le dernier quartile, ont une concentration de TNF- α supérieure à leur limite de quantification (LOQ). 38,8% de ces échantillons ont également une concentration élevée d'IL-10. De plus, les fortes concentrations de TNF- α (> LOQ) sont significativement corrélées avec celles de CXCL13. Cette corrélation n'est pas retrouvée entre les concentrations de CXCL13 et celles d'IL-10. Mais seulement onze échantillons ont une

concentration d'IL-10 > LOQ, un effectif sans doute trop faible pour mettre en évidence une potentielle corrélation. Les concentrations d'IL-10 de l'ensemble des échantillons sont en revanche corrélées avec celles de CXCL13. Comme le TNF- α et l'IL-10 induisent *in vitro* l'expression de CXCL13, ces corrélations suggèrent que les deux cytokines contribuent à la production de CXCL13 chez les patients atteints de FPI. Le TNF- α et l'IL-10 sont exprimés au niveau des tissus pulmonaires humains et la concentration des ARNm d'IL-10 mesurée dans les biopsies pulmonaires de patients atteints de FPI est supérieure à celle mesurée dans les tissus des sujets contrôles (Bergeron et al., 2003). *Bergeron et coll* ont aussi proposé que les CEA sont une source d'IL-10 au niveau des tissus pulmonaires des patients atteints de FPI (Bergeron et al., 2003). Le TNF- α et l'IL-10 sont aussi sécrétés par les CD, LT, LB et les macrophages présents au niveau pulmonaire. Il serait donc intéressant de préciser la contribution du TNF- α et de l'IL-10 dans l'expression de CXCL13 en effectuant des co-marquages de ces trois cytokines sur des coupes de tissus issues de biopsies pulmonaires chirurgicales. Nous n'avons pas recherché les raisons pour lesquelles les niveaux sériques du TNF- α et d'IL-10 sont seulement quantifiables dans une petite population de patients atteints de FPI. Comme le TNF- α et l'IL-10 sont fréquemment sécrétés en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, il est possible que les concentrations sériques de TNF- α , IL-10 et CXCL13 soient plus spécifiquement augmentées chez les patients présentant un processus inflammatoire. Une étude clinique sur des cohortes plus larges seraient nécessaires afin de confirmer une augmentation spécifique des concentrations sériques de TNF- α et d'IL-10 chez certains patients atteints de FPI. Il est intéressant de noter que le TNF- α est également impliqué dans la production de CXCL13 par un sous-type spécifique de LT CD4⁺ chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (Kobayashi et al., 2013). Un traitement par des médicaments anti-TNF (Adalimumab ou Etanercept) diminue les concentrations sanguines de CXCL13 chez ces patients (Han et al., 2016), ce qui confirme la capacité du TNF- α à réguler l'expression de CXCL13 chez les humains.

S'il est aujourd'hui admis que CXCL13 est un biomarqueur pronostic de la FPI, on ne connaît pas les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels CXCL13 pourrait contribuer au développement de cette maladie. Aucune étude expérimentale n'a pour le moment démontré le rôle de CXCL13 dans les modèles murins de fibrose pulmonaire. En particulier, on ne sait pas si la bléomycine induit une fibrose pulmonaire de plus forte ou de moindre intensité chez les souris KO pour le gène CXCL13. Différents arguments suggèrent toutefois que CXCL13 peut favoriser le développement de la FPI en stimulant l'infiltration

pulmonaire des LB. Localement, une fois activée, ces cellules peuvent produire des auto-anticorps mais également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , l'IL-4 ou la lymphotoxin- β . La FPI n'est pas une maladie auto-immune mais il est fréquent de détecter des auto-anticorps chez les patients développant cette maladie. Différents auto-anticorps ont été identifiés tels que les anticorps dirigés contre la périplakine, HSP70 ou la vimentine (Hoyne et al., 2017). Le complexe immunitaire formé entre l'anticorps et l'antigène du soi peut se déposer au niveau du tissu pulmonaire et promouvoir une réaction inflammatoire (Hoyne et al., 2017). Par exemple, l'auto-anticorps anti-HSP70 issu de patients atteints de FPI active les monocytes humains CD14⁺ et augmente leur production d'IL-8 (Kahloon et al., 2013). Cette production d'auto-anticorps pourrait être associée à la survenue d'exacerbations aiguës qui accélère fréquemment le déclin de la fonction respiratoire et précipite le décès des patients atteints de FPI. L'équipe de Duncan a démontré, au cours d'une étude pilote, que l'administration d'une thérapie dirigée contre les auto-anticorps, par plasmaphérese et injection de rituximab (anti-CD20), améliore le pronostic de patients présentant une exacerbation aiguë (Donahoe et al., 2015). Par ailleurs, CXCL13 joue un rôle important dans le développement de lésions tissulaires au cours des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux ou le syndrome de Sjogren (Finch et al., 2013). L'administration d'anticorps dirigés contre CXCL13 réduit les processus inflammatoires dans différents modèles expérimentaux de maladies autoimmunes incluant la polyarthrite rhumatoïde (Klimatcheva et al., 2015). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le rôle de CXCL13 dans la FPI et évaluer l'intérêt potentiel de traitements visant à réduire les concentrations pulmonaires de cette chimiokine.

Conclusion générale

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons démontré que le NTD, un médicament antifibrosant utilisé pour traiter la FPI, possède des propriétés anti-inflammatoires vis-à-vis des macrophages humains. En particulier, le NTD diminue la sécrétion de nombreuses cytokines contribuant au développement de la fibrose pulmonaire. Ces effets anti-inflammatoires résultent de la capacité du NTD à bloquer i) l'activation de CSF-1R et la signalisation induite par CSF-1 dans le macrophage humain, et ii) une ou plusieurs autres kinases dont la nature reste à préciser. Les effets du NTD sont observés *in vitro* uniquement pour des concentrations de NTD supérieures à celles mesurées dans le plasma des patients traités par ce médicament. La pertinence clinique des effets anti-inflammatoires du NTD sur

l'immunité innée nécessite donc des études complémentaires pour confirmer le potentiel anti-inflammatoire de ce médicament chez les humains.

Parmi les cytokines étudiées, le NTD réduit significativement l'expression de CXCL13, un biomarqueur pronostic de la FPI, très probablement en réprimant la sécrétion de l'IL-10. En effet, dans la seconde partie de ma thèse, nous avons caractérisé l'expression cellulaire de CXCL13 dans le tissu pulmonaire et identifié le macrophage comme étant une source possible de cette chimiokine. Nous avons confirmé *in vitro* l'expression de CXCL13 dans le MA et le MDM puis analysé les voies de signalisation contrôlant l'activation du gène codant CXCL13. Nos résultats démontrent que l'expression optimale de CXCL13 dans le macrophage humain nécessite les actions coordonnées du TNF- α et de l'IL-10 via l'activation respective de la voie non canonique NF- κ B et de la voie JAK/STAT. De plus, nous montrons que l'expression sérique de CXCL13 peut être corrélée à celle du TNF- α , et dans une moindre mesure à celle de l'IL-10, chez certains patients souffrant de FPI. Au final, ces résultats derniers soulignent l'intérêt de mieux connaître le rôle de CXCL13 dans le développement de la FPI et pour cela de développer de nouvelles études expérimentales et cliniques.

Mots Clef:

Fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), Macrophage, Nintedanib (NTD), Colony stimulation factor 1 receptor (CSF-1R), Colony stimulation factor 1(CSF1), CXCL13, TNF- α , IL-10, NF- κ B.

Annexes:



Arsenic and the immune system

Nessrine Bellamri¹, Claudie Morzadec¹, Olivier Fardel^{1,2} and Laurent Vernhet¹

Abstract

Arsenic is a metalloid to which millions of individuals are exposed worldwide, primarily through the consumption of contaminated drinking water or food items. Chronic arsenic exposure is associated with an increased incidence of several diseases, including lung infections and skin cancers. Epidemiological and experimental evidence demonstrates that the metalloid impairs the activity of both the innate and adaptive immune systems. Arsenic alters the differentiation, activation and/or proliferation of human macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. Arsenic immunotoxicity results from intracellular oxidative lesions modulating basal gene expression or leading to DNA damage. Arsenic also induces epigenetic effects by modulating DNA methylation and post-translational histone modifications. In addition, the metalloid has recently been found to inhibit *in vitro* and *in vivo* inflammasome activities. Arsenic immunotoxicity likely contributes to the systemic effects associated with arsenic exposure by limiting immune surveillance and/or promoting inflammation. Experimental studies also suggest that the immunosuppressive effects of arsenic efficiently prevent or treat severe immune-related diseases. The purpose of this review is to summarize the current knowledge of the impact of arsenic on the immune system.

Addresses

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

² Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 Rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

Corresponding author: Vernhet, Laurent, Inserm U1085, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France. Fax: +33 2 23 23 47 94. (laurent.vernhet@univ-rennes1.fr)

Current Opinion in Toxicology 2018, 10:60–68

This review comes from a themed issue on **Systems Toxicology: Immunotoxicity**

Available online 31 January 2018

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.003>

2468-2020/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords

Arsenic, Immunity, Cell stress, DNA damages, Epigenetic, Immunosuppression.

1. Introduction

Arsenic is a toxic metalloid naturally present at high levels in the earth's crust in many countries worldwide. Arsenic

is complexed to a sulfur atom in various mineral ores, such as arsenopyrite, orpiment and realgar. Physical, chemical and/or microbial changes in the soil can promote arsenic mobilization from minerals and its accumulation in groundwater. The consumption of contaminated drinking water is the first source of arsenic exposure for millions of individuals in several Asian and American countries [1]. Since contaminated groundwater can be used to irrigate and cook cereal crops and other food items, humans can also be exposed to arsenic through the ingestion of vegetables, fruits, grains and rice [2]. In addition, arsenic is used for various industrial activities, including the production of wood preservatives, electronics and pesticides, which can induce occupational exposures [3].

Arsenic speciation includes several inorganic and organic species in different oxidation states. Contaminated drinking water, for example, contains inorganic pentavalent and trivalent forms of arsenic, which are largely absorbed from the human gastrointestinal tract, likely through glucose, phosphate or organic anion transporters and aquaporins. In contrast to mercury or cadmium, arsenic is a metalloid that does not chronically accumulate in specific organs. This compound is rapidly metabolized in the liver through biological methylation, oxidation/reduction and glutathione conjugation. Arsenic biotransformation generates reactive mono- and -dimethylated metabolites that likely contribute to its systemic effects [2].

Arsenic toxicity has been extensively reviewed in several recent articles [1–3]. Chronic ingestion of low concentrations of arsenic initially induces skin lesions but can be toxic to many other organs [4]. Long term effects primarily include cutaneous, respiratory, neurodevelopmental, hepatic, endocrine and cardiovascular disorders [4]. This metalloid is classified by the IARC as a carcinogenic compound for humans (group 1), and epidemiological studies have clearly demonstrated that arsenic significantly increases the incidence of skin, bladder and lung cancers [3]. In addition, arsenic modulates the activity of both innate and adaptive immunity by various cellular and molecular mechanisms. Immunomodulation likely promotes arsenic systemic toxicity, which results from environmental or occupational exposure. However, specific immunosuppressive effects of arsenic may also be beneficial for the treatment of certain immune-related diseases. Thus, the purpose of this review is to summarize our current knowledge on arsenic immunotoxicity.

2. Effects of arsenic on immune cells

2.1. Macrophages and dendritic cells (DCs)

Macrophages and DCs are professional phagocytes that control innate immunity and regulate immune surveillance against infections and cancers. Monocytes constitute major precursors of both macrophages and DCs, especially during inflammatory states. Monocytes migrate in tissues where they differentiate into mature phagocytes. A primary function of macrophages is to engulf and digest microbes, cellular debris and cancer cells by phagocytosis. In response to infection or tissue damage, macrophages secrete a large spectrum of cytokines according to their local environment. Chronic exposure to arsenic significantly impairs the *ex-vivo* differentiation of peripheral blood monocytes into mature macrophages. Banerjee et al. [5] reported that monocyte-derived macrophages from arsenic-exposed individuals with skin lesions exhibited reduced cell adhesion capacity, F-actin expression, nitric oxide production and phagocytic activity. *In vitro*, 0.5–2 μM arsenic trioxide (ATO) was shown to block the differentiation of human peripheral blood monocytes into functional macrophages by repressing NF- κB -related survival pathways [6]. Short treatments of human mature macrophages with non-cytotoxic arsenic concentrations (1–5 μM , 6 h) was shown to inhibit the transcriptional activity of the liver X receptor, resulting in the decreased expression of its target genes, ABCA1 and SREBP-1c, and impaired cholesterol efflux [7]. Prolonged treatment (3–6 days) with ATO was shown to de-differentiate macrophages into CD14-expressing monocytic-like cells, notably through the reorganization of the actin cytoskeleton [8]. Metalloid-exposed macrophages display increased secretion of the pro-inflammatory chemokines CXCL2 and CCL18 and a decreased expression of several macrophage markers, including metalloproteinase 7, 9 and 12 [8,9]. Moreover, these macrophages exhibit an enhanced pro-inflammatory response to the lipopolysaccharide (LPS) endotoxin. Increased exposure to arsenic through contaminated drinking water is also positively correlated with high CD14 expression on monocytes and with elevated plasma levels of pro-inflammatory cytokines, including TNF α , and IL-8 [10,11].

Recent studies have shown that arsenic alters the functions of microglia, which are the resident macrophages found in the central nervous system [12,13]. The metalloid notably increased *ex-vivo* secretion of IL-6 and TNF- α from microglia isolated from mice exposed for 7 days to 0.38 mg/kg arsenite [12]. *In vitro*, the supernatant of arsenic-exposed-microglial cultures induced murine neuronal cell death [14]. The death process did not result from inflammation but was, rather, caused by a critical cystine/glutamate imbalance induced by arsenic in the microglia. These specific effects may contribute to the increased incidence of developmental neurotoxicity in children chronically exposed to arsenic [15].

DCs are primary antigen-presenting cells that link innate immunity to adaptive immunity. Once activated by infectious agents or tumor cell antigens, DCs migrate in the peripheral lymph nodes where they activate T cells and promote their polarization. At low concentrations (0.1–0.5 μM), arsenite does not block the ability of mature DCs to activate the proliferation of human T cells *in vitro*, but it significantly inhibits the secretion of IL-12p70 and IL-23, two interleukins that enhance T cell polarization [16]. At concentrations higher than 1 μM , arsenic blocks myeloid DC differentiation by inducing monocyte necrosis [16], and it decreases the phagocytic activity of immature DCs [17]. These *in vitro* experimental results need to be confirmed by investigating DC functions in chronically exposed individuals. Nevertheless, various reports have shown that quantitative losses and structural lesions of Langerhans cells, which are rather similar to dermal DCs, are specifically detected in the skin lesions of exposed individuals [18,19]. Although arsenic can clearly alter DC-induced T cell activation, a specific effect of the metalloid on antigen presentation by DCs remains to be demonstrated.

2.2. Lymphocytes

T and B lymphocytes mediate the cellular and humoral responses of adaptive immunity, respectively. The activation of T lymphocytes by DCs stimulates their proliferation and differentiation into various CD4+ T helper cell subtypes and CD8+ T cytotoxic cells. Numerous studies have demonstrated that arsenic markedly alters both the number and function of human T lymphocytes. Specifically, chronic arsenic exposure is correlated with decreased percentages of peripheral blood CD4+ T cells and CD4/CD8 ratios in children and adults and with reduced *ex-vivo* proliferation of activated T lymphocytes [20–22]. Wu et al. [10] reported that the expression of various pro-inflammatory cytokines, growth factors and chemokines were upregulated in non-stimulated blood lymphocytes isolated from high arsenic-exposed individuals. The transcript levels of IL-1 β , IL-6, chemokine C-C motif 2/monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1), chemokine C-X-C motif ligand 1/growth-related oncogene alpha (CXCL1/GRO1), CXCL2/GRO2 and matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) were significantly increased in lymphocytes from individuals with the highest arsenic blood concentrations (9.6–46.5 $\mu\text{g/L}$). Nevertheless, the *ex-vivo* secretion of IL-2 from lymphocytes activated with phytohemagglutinin or concanavalin-A was negatively correlated with urinary arsenic levels [20,21]. *In vitro* experiments have confirmed that low and non-cytotoxic arsenite concentrations significantly repress both the proliferation and IL-2 secretion of human activated T cells [23,24]. Moreover, studies have revealed that the metalloid selectively inhibits the differentiation of T helper 17 lymphocytes by specifically repressing IL-17 expression, a cytokine that increases anti-infectious defenses but also promotes inflammation in several auto-immune diseases

[25]. The *in vitro* inhibition of T cell proliferation is sex-dependent, i.e., the inhibition is more potent in peripheral blood lymphocytes isolated from females [26]. *In utero*, arsenic exposure also decreases the percentage of CD4+ T cells in the cord blood [27] and alters the thymic function in newborns [28]. In fact, recent studies carried out on murine models showed that chronic arsenic exposure affects the differentiation of T cell precursors in the thymus. Exposure to low doses of arsenite (<0.1 mL/L) in drinking water for 30 days increases the numbers of CD4+ CD25 + FoxP3-expressing cells, also known as natural regulatory T (nTreg) cells, in the thymus of male Swiss albinos mice [29]. Oral arsenite gavage (0.038–3.8 ppm) of male Balb/c mice for 30 days specifically promotes the CD4 lineage in the thymus without affecting the tissue ultrastructure [30]. However, this treatment also triggers the differentiation of splenic CD4+ T cells into nTreg cells and induces immunosuppression. Further research is thus required to determine the role of nTreg cells in the immunotoxic effects of arsenic in humans.

B lymphocytes, or B cells, mediate humoral immunity by producing and secreting antibodies. In contrast to T cells, the impact of arsenic on human B cells remains to be fully characterized. At low concentrations (0.1–2 μ M), arsenite has either no effect or modest effects on the *in vitro* CD40L-dependent Immunoglobulin M antibody-forming cell response of human isolated naïve B lymphocytes, whereas this concentration of arsenite markedly reduces the same response of murine B cells [31]. Arsenite and its monomethylated trivalent metabolite, monomethylarsonous acid, have also been demonstrated to reduce *in vivo* and *in vitro* murine pre-B cell development from hematopoietic stem cells, likely by interfering with IL-7 signaling, and to repress murine humoral immunity [32,33]. It will be interesting to confirm these results with human B cells.

3. Molecular basis of arsenic immunotoxicity

3.1. Oxidative stress and DNA damage

Arsenic is a pro-oxidant metalloid that forms stable complexes with vicinal thiol residues in several proteins and increases the levels of reactive oxygen (ROS) in several cell types, including macrophages and lymphocytes [8,34]. Previous reports suggest that the effects of arsenic on the viability and functions of macrophages, DCs or lymphocytes can result from oxidative stress and related DNA damage. In this context, at non cytotoxic concentrations (<1 μ M), ATO produces ROS in human monocyte-derived macrophages by directly activating NADPH oxidase at the plasma membrane [8]. To stimulate this superoxide-generating enzymatic complex, the metalloid induces the phosphorylation and subsequent membrane translocation of the p47^{phox} NADPH oxidase partner through a Rho-kinase/p38-kinase-dependent signaling

pathway. Arsenic may also produce ROS and disrupt macrophage functions by inducing the unfolded protein response [35]. At a higher concentration (5 μ M), ATO significantly reduces the mitochondrial transmembrane potential, increases ROS levels and triggers caspase-dependent apoptosis in human CD4+ and CD8+ T cells [36]. ROS likely contribute to the DNA damage detected in peripheral blood lymphocytes either isolated from arsenic-exposed individuals or treated *in vitro* with arsenical compounds, by eliciting 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine adducts and/or repressing DNA repair [34,37,38]. In addition to inducing DNA damage, arsenic impairs gene expression in human immune cells by modulating redox-sensitive signaling pathways. Notably, prevention of oxidative stress by an NADPH oxidase inhibitor or an antioxidant blocks CCL18 and CXCL2 gene expression in arsenic-exposed macrophages [8,39]. In addition, in response to cell stress, the transcription factor NRF2 not only regulates the induction of several antioxidant genes but also mediates the arsenic-dependent inhibition of IL12 gene expression in human mature DCs [40].

3.2. Epigenetic effects

Molecular epidemiological studies have suggested that arsenic can regulate gene expression in white blood cells by modifying the epigenome. Increased arsenic exposure through consumption of contaminated drinking water has been positively associated with global DNA methylation in the peripheral blood mononuclear cells of Bangladeshi adults [41,42]. Niedzwiecki et al. (2013) notably reported that the highest DNA methylation levels are measured in individuals with the highest arsenic exposure [42]. However, subtle modifications of DNA methylation can also be detected at the gene level. Indeed, in chronically exposed individuals, increased arsenic exposure either reduces or enhances the methylation levels of various genes involved in major cell functions, such as lipid metabolism, intracellular pH regulation or the nuclear factor κ B signaling pathway [43]. Similarly, Engström et al. [44] reported that increased arsenic exposure was associated with significant alterations of the CD4+ T cell methylome in Argentinean women. Both hypo- and hyper-methylated regions were detected in genes regulating T cell activation and differentiation. Interestingly, among these genes, Engström et al. found that the interferon regulatory factor 1 (IRF1) gene was hyper-methylated and its expression was decreased. In contrast, the ras homolog family member H (RHOH) gene was hypo-methylated and its expression was up-regulated. Although these results suggest that arsenic exposure may alter gene expressions by differentially modulating gene methylation levels, additional studies are warranted to assess the causality and clinical significance of this phenomenon. In addition to DNA methylation, other post-translational histone modifications have also been identified in peripheral blood mononuclear cells of adults exposed to arsenic [45,46]. Notably, Chervona et al. (2012) reported that in Bangladeshi adults exposed

to water containing up to containing 500 $\mu\text{g/L}$ arsenic, total urinary arsenic concentration was positively correlated with the level of histone 3 lysine 9 di-methylation (H3K9me2) and inversely correlated with H3K9 acetylation [45]. Other post-translational histone modifications associated with arsenic exposure differed in a sex-dependent manner. For example, arsenic concentration in water was positively associated with H3K4me3 and H3K27me3 among females but negatively correlated with the same modifications among males. Finally, Pournara et al. (2016) reported that the impacts of arsenic on histone residues could also differ between CD4+ and CD8+ T cells [46]. Increased arsenic exposure in drinking water was negatively correlated with H3K9me3 in CD4+ T cells but not in CD8+ T cells. Metalloid effects on histone residues are thus complex, depending on the cell types and sex, and these effects need to be further explored for a better understanding of their biological significance.

3.3. Inhibition of inflammasomes

Inflammasomes are cytoplasmic multiprotein complexes that specifically control the activation of the caspase 1-dependent cleavage of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 into their active forms. These complexes are primarily generated in macrophages exposed to pathogen-derived stimuli (bacterial toxins), self-derived molecules (uric acid, ATP) and environmental contaminants (silica, asbestos) [47]. They are composed of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) proteins that act as stimuli sensors. *In vitro*, arsenite and ATO inhibit the NLRP1, NLRP3 and NAIP5/NLRC4 inflammasomes in murine bone marrow-derived macrophages exposed to their respective activating stimuli [48]. Maier et al. [48] demonstrated that, *in vivo*, arsenite delays the NLRP1-mediated death of mice exposed to anthrax lethal toxin and reduces NLRP3-dependent inflammation in mice treated with monosodium urate crystals. Arsenic blocks the maturation of pro-IL-1 β by preventing the autoproteolytic and substrate cleavage activities of caspase-1 in murine macrophages [48]. Low concentrations of ATO (0.1–1 μM), which fail to repress the upregulation of IL-1 β mRNA caused by LPS in human monocyte-derived macrophages (Fig. 1A), inhibit the silica-induced secretion of active IL-1 β in the macrophage supernatant (Fig. 1B). These results suggest that ATO directly impairs the inflammasome activity of human macrophages, i.e., it suppresses the cleavage of pro-IL-1 β . Inflammasome complexes may thus constitute important molecular targets of arsenic in humans.

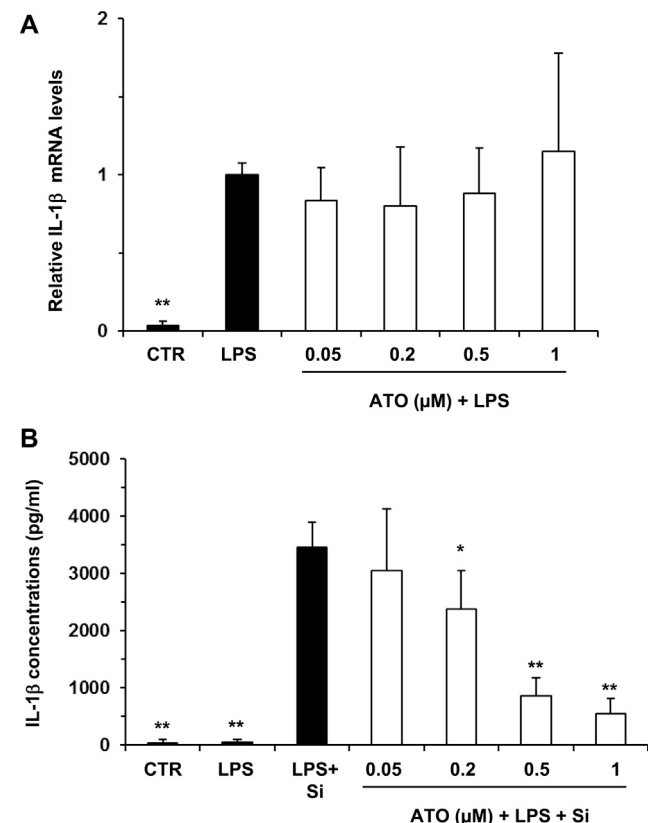
4. Consequences of arsenic immunotoxicity in humans

4.1. Contribution to diseases associated with chronic environmental exposure

As described above, arsenic exerts pleiotropic effects on immune cells, which may initially result in the suppression

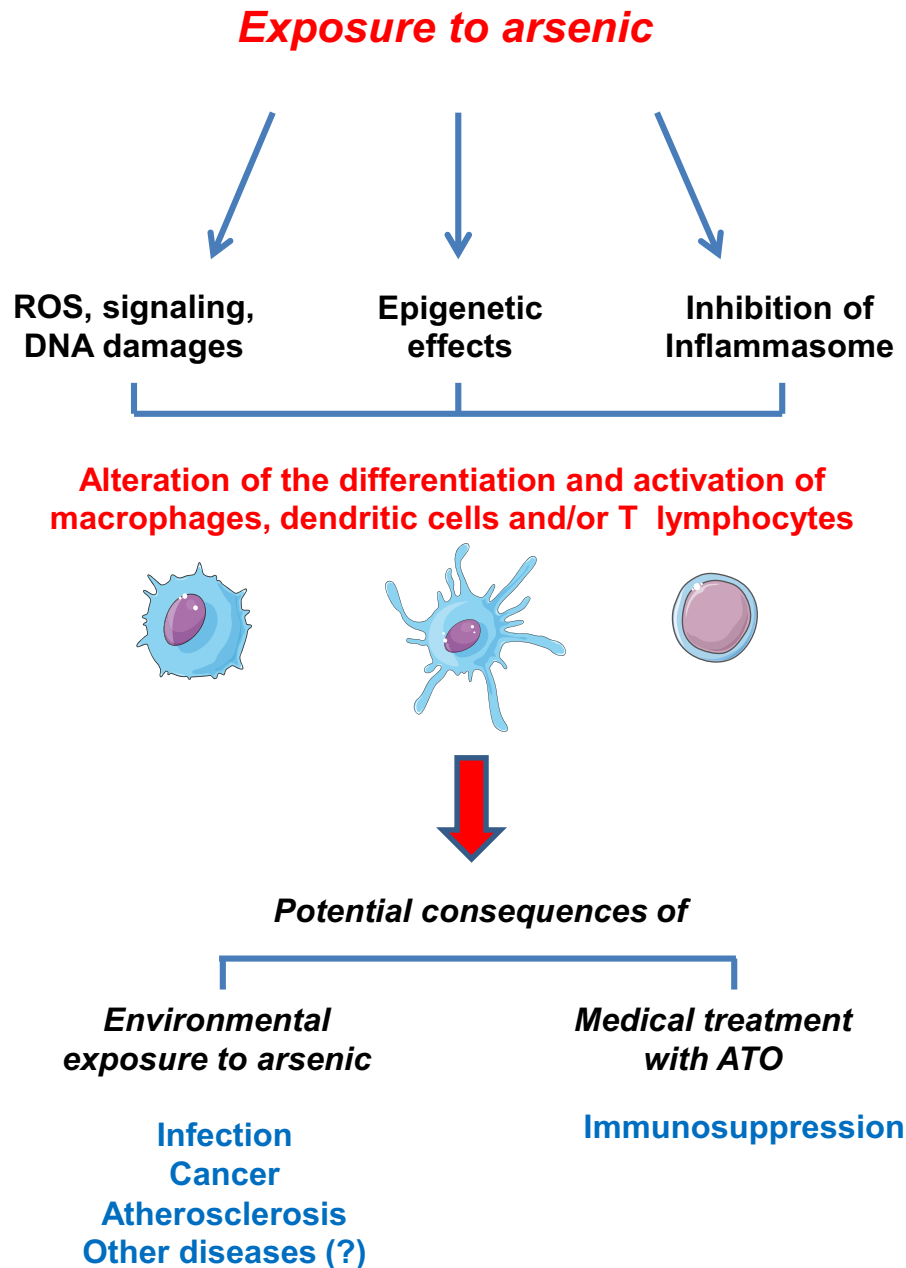
of major immune functions. Notably, arsenic decreases bacterial phagocytosis by macrophages, reduces T cell proliferation and markedly represses the secretion of pro-inflammatory cytokines by activated DC and T cells. These inhibitions can increase the susceptibility to infection by limiting pathogen eradication. Arsenic-induced immunosuppression likely increases the incidence of lower respiratory tract infections and diarrhea,

Fig. 1



Arsenic trioxide (ATO) inhibits IL-1 β secretion from human macrophages without impairing IL-1 β mRNA levels. Following the isolation of peripheral blood mononuclear cells by Ficoll gradient centrifugation, human monocytes were selected by an adhesion step and then differentiated into macrophages in RPMI medium containing 50 ng/mL macrophage-colony stimulating factor for 6 days. Macrophages were left untreated (CTR) or pre-treated with ATO for 2 h before stimulation with 20 ng/mL LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma Aldrich, France) for 4 h to increase IL-1 β mRNA expression. Next, cells were harvested (A) or cultured with 0 or 100 $\mu\text{g/mL}$ silica (Si) (DQ12 mineral dust silica, DMT GMBH, Germany) for 16 h (B) to activate NLRP3 inflammasome and produce active IL-1 β protein. At the end of the treatment, the culture media were collected and the levels of active IL-1 β secreted in the supernatant were quantified by ELISA (Duoset ELISA development system kits, R and D system, France) (B). In (A), mRNA levels were determined by RT-qPCR using the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad). Data are presented relative to mRNA levels found in macrophages treated with LPS and arbitrarily set at the value of 1. Results in (A) and (B) are expressed as the means \pm SD of 6 independent experiments. Significant differences were evaluated using ANOVA followed by the multi-range Dunnett's t test for multiple comparisons. The criterion for significance of the difference between means was * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$, versus LPS (A) or LPS + Si (B).

Fig. 2



Effects of arsenic on immune cells and their potential consequences for humans. Environmental or occupational exposure to arsenic can impact the differentiation and activation of macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. Arsenic impairs immune cell functions by several molecular mechanisms, including the production of reactive oxygen (ROS), modulation of redox-sensitive signaling pathways controlling gene expression, induction of DNA damage, epigenetic effects (DNA methylation and histone modifications), and the inhibition of the inflammasome. Arsenic immunotoxicity may contribute to the increased incidence of respiratory infections, diarrhea, lung and skin cancers, and atherosclerosis in environmentally exposed individuals. In contrast, experimental studies have demonstrated that the immunosuppressive effects of arsenic may counteract hyperactivity of the immune system in murine models of lupus, chronic sclerodermatous graft-versus-host disease and acute allograft rejection. Moreover, these effects may prevent NLRP3-dependent inflammation from developing in mice exposed to monosodium urate crystals. These results support the idea that arsenic may have beneficial therapeutic immunosuppressive effects for the treatment of certain human diseases.

which frequently develop in young exposed children from low-income countries [49,50]. Particularly, increased arsenic exposure was found to promote pulmonary tuberculosis in Chile [50] and visceral leishmaniasis in India [51]. In a murine model, chronic exposure to low doses of arsenic also increased morbidity of influenza A infection by repressing DC-mediated immune responses in mice [52]. In addition, immunosuppression impairs the surveillance and killing of tumorigenic cells, which may promote lung and skin cancer associated with arsenic exposure [53]. Conversely, arsenic may induce a basal inflammatory state by increasing the secretion of molecules such as TNF- α and IL-8 from monocytes/macrophages and lymphocytes. Chronic inflammation and secretion of growth factors, such as IL-8, can also establish microenvironments supportive of tumor development [54]. Epidemiological studies carried out in various countries demonstrate that arsenic significantly increases the risk of atherosclerosis [55,56]. Several mechanisms may contribute to the development of atherosclerosis, including general pro-inflammatory cytokine secretion [10], increased ROS production [8], enhanced monocyte adhesion to vascular endothelium [57] and reduced cholesterol efflux from macrophages [7]. In murine models, at least, methylated metabolites and arsenic-3-methyltransferase play major roles in these pro-atherogenic effects of arsenic [58].

4.2. Potential beneficial effects of arsenic-induced immunosuppression

Recently, various experimental studies have suggested that the immunosuppressive properties of arsenic may reduce or treat severe immune-related diseases. Indeed, ATO prevents the development of a lupus-like syndrome in MRL/lpr mice by eliminating activated T cells that cause lymphoproliferation and skin, lung and kidney damage [59]. ATO also abrogates chronic sclerodermatous graft-versus-host disease that follows allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a murine model [60]. The metalloid inhibits the alloreactive process by selectively killing activated DCs and CD4-positive T cells. In addition, ATO prolongs cardiac and islet allograft survival in acute rejection murine models through the repression of alloreactive CD4+ and CD8+ memory T cells [61–63]. Finally, the fact that arsenic blocks inflammasome activity and the subsequent IL-1 β production in human macrophages suggests that arsenic may limit chronic inflammation in severe inflammasome-mediated disease [47].

5. Conclusions

Many human population-based and/or experimental studies strongly suggest that arsenic exerts potent immunotoxic effects towards key human immune cells, such as macrophages, DCs and T lymphocytes (Fig. 2). Multiple molecular and cellular mechanisms can mediate arsenic immunotoxicity, including ROS production, alteration of redox-sensitive signaling pathways, DNA

damage, epigenetic effects and inflammasome inhibition. Arsenic immunotoxicity likely contributes to the systemic deleterious effects associated with chronic environmental exposure. Notably, arsenic-induced immunosuppression may favor the development of infectious diseases and cancers. On the other hand, data derived from experimental studies using various mouse models support the hypothesis that the immunosuppressive effects of arsenic may be beneficial for limiting the exacerbation of the immune system in severe immune-related diseases. However, further research is still required to determine the role of arsenic immunotoxicity in the systemic effects of arsenic exposure and to investigate the potential use of this metalloid in medical immunosuppressive therapy.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from University of Rennes-1. We thank Dr Valérie Lecturer for her helpful comments and critical reading of the manuscript.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest

- Shakoor MB, Nawaz R, Hussain F, Raza M, Ali S, Rizwan M, Oh S-E, Ahmad S: **Human health implications, risk assessment and remediation of As-contaminated water: a critical review.** *Sci Total Environ* 2017, **601–602**:756–769. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.223>.
- Carlin DJ, Naujokas MF, Bradham KD, Cowden J, Heacock M, Henry HF, Lee JS, Thomas DJ, Thompson C, Tokar EJ, Waalkes MP, Birnbaum LS, Suk WA: **Arsenic and environmental health: state of the science and future research opportunities.** *Environ Health Perspect* 2016, **124**:890–899. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510209>.
- Hunt KM, Srivastava RK, Elmets CA, Athar M: **The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer.** *Canc Lett* 2014, **354**:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.016>.
- Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C, Suk WA: **The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem.** *Environ Health Perspect* 2013, **121**:295–302. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205875>.
- Banerjee N, Banerjee S, Sen R, Bandyopadhyay A, Sarma N, Majumder P, Das JK, Chatterjee M, Kabir SN, Giri AK: **Chronic arsenic exposure impairs macrophage functions in the exposed individuals.** *J Clin Immunol* 2009, **29**:582–594. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9304-x>.
- Lemarie A, Morzadec C, Mérimo D, Micheau O, Fardel O, Vernhet L: **Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-kappaB-related survival pathway down-regulation.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **316**:304–314. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.092874>.
- Padovani AMS, Molina MF, Mann KK: **Inhibition of liver x receptor/retinoid X receptor-mediated transcription contributes to the proatherogenic effects of arsenic in macrophages in vitro.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**:1228–1236. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.205500>.
- Lemarie A, Bourdonnay E, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L: **Inorganic arsenic activates reduced NADPH oxidase in human primary macrophages through a Rho kinase/p38 kinase pathway.** *J Immunol* 2008, **180**:6010–6017.
- Bourdonnay E, Morzadec C, Sparfel L, Galibert M-D, Jouneau S, Martin-Chouly C, Fardel O, Vernhet L: **Global effects of**

- inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages.** *Mol Immunol* 2009, **46**:649–656. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.08.268>.
10. Wu M-M, Chiou H-Y, Ho I-C, Chen C-J, Lee T-C: **Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**:1429–1438.
 11. Dutta K, Prasad P, Sinha D: **Chronic low level arsenic exposure evokes inflammatory responses and DNA damage.** *Int J Hyg Environ Health* 2015, **218**:564–574. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.06.003>.
 12. Singh V, Mitra S, Sharma AK, Gera R, Ghosh D: **Isolation and characterization of microglia from adult mouse brain: selected applications for ex vivo evaluation of immunotoxicological alterations following in vivo xenobiotic exposure.** *Chem Res Toxicol* 2014, **27**:895–903. <https://doi.org/10.1021/tx500046k>.
 13. Chen G, Mao J, Zhao J, Zhang Y, Li T, Wang C, Xu L, Hu Q, Wang X, Jiang S, Nie X, Wu Q: **Arsenic trioxide mediates HAPI microglia inflammatory response and the secretion of inflammatory cytokine IL-6 via Akt/NF- κ B signaling pathway.** *Regul Toxicol Pharmacol* 2016, **81**:480–488. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.09.027>.
 14. Singh V, Gera R, Kushwaha R, Sharma AK, Patnaik S, Ghosh D: **Hijacking microglial glutathione by inorganic arsenic impels bystander death of immature neurons through extracellular cystine/glutamate imbalance.** *Sci Rep* 2016, **6**:30601. <https://doi.org/10.1038/srep30601>.
 15. Tsuji JS, Garry MR, Perez V, Chang ET: **Low-level arsenic exposure and developmental neurotoxicity in children: a systematic review and risk assessment.** *Toxicology* 2015, **337**:91–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.09.002>.
 16. Macoch M, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L: **Inorganic arsenic impairs differentiation and functions of human dendritic cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2013, **266**:204–213. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.008>.
 17. Bahari A, Salmani V: **Environmentally relevant dose of arsenic interferes in functions of human monocytes derived dendritic cells.** *Toxicol Lett* 2017, **275**:118–122. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.005>.
 18. Wang BJ, Lee YY, Mak CP, Kao HF, Hsu ML, Hsien JR: **Quantitative and morphological changes of Langerhans cells in Bowen's disease from patients with chronic arsenicism.** *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi* 1991, **90**:1093–1098.
 19. Lee C-H, Hong C-H, Yu C-L, Wang L-F, Clausen BE, Liao W-T, Huang S-K, Chen G-S, Yu H-S: **Arsenic mobilizes Langerhans cell migration and induces Th1 response in epicutaneous protein sensitization via CCL21: a plausible cause of decreased Langerhans cells in arsenic-induced intra-epithelial carcinoma.** *Biochem Pharmacol* 2012, **83**:1290–1299. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.028>.
 20. Soto-Peña GA, Luna AL, Acosta-Saavedra L, Conde P, López-Carrillo L, Cebrián ME, Bastida M, Calderón-Aranda ES, Vega L: **Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic.** *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2006, **20**:779–781. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4860fje>.
 21. Biswas R, Ghosh P, Banerjee N, Das JK, Sau T, Banerjee A, Roy S, Ganguly S, Chatterjee M, Mukherjee A, Giri AK: **Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic.** *Hum Exp Toxicol* 2008, **27**:381–386. <https://doi.org/10.1177/0960327108094607>.
 22. Liao W-T, Yu C-L, Lan C-CE, Lee C-H, Chang C-H, Chang LW, You H-L, Yu H-S: **Differential effects of arsenic on cutaneous and systemic immunity: focusing on CD4+ cell apoptosis in patients with arsenic-induced Bowen's disease.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:1064–1072. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp095>.
 23. Morzadec C, Bouezzedine F, Macoch M, Fardel O, Vernhet L: **Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primary T lymphocytes.** *Toxicology* 2012, **300**:46–56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.025>.
 24. Burchiel SW, Lauer FT, Beswick EJ, Gandolfi AJ, Parvez F, Liu KJ, Hudson LG: **Differential susceptibility of human peripheral blood T cells to suppression by environmental levels of sodium arsenite and monomethylarsonous acid.** *PLoS One* 2014, **9**:e109192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109192>.
 25. Morzadec C, Macoch M, Robineau M, Sparfel L, Fardel O, Vernhet L: **Inorganic arsenic represses interleukin-17A expression in human activated Th17 lymphocytes.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, **262**:217–222. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.05.004>.
- The investigators demonstrate that trivalent inorganic arsenic (As₂O₃, 0.25–2 μ M) totally inhibits expression and secretion of IL-17A from naive and memory human CD4+ T lymphocytes differentiated into Th17 cells, notably by impairing JNK/C-jun-dependent signaling and RORC- γ t expression. IL-17A, which plays a key role in anti-infectious defenses but also in the development of various chronic inflammatory diseases, may thus constitute a major target of the arsenic in humans.
26. Vega L, Montes de Oca P, Saavedra R, Ostrosky-Wegman P: **Helper T cell subpopulations from women are more susceptible to the toxic effect of sodium arsenite in vitro.** *Toxicology* 2004, **199**:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.012>.
 27. Kile ML, Houseman EA, Baccarelli AA, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mostofa G, Cardenas A, Wright RO, Christiani DC: **Effect of prenatal arsenic exposure on DNA methylation and leukocyte subpopulations in cord blood.** *Epigenetics* 2014, **9**:774–782. <https://doi.org/10.4161/epi.28153>.
 28. Ahmed S, Ahsan KB, Kippler M, Mily A, Wagatsuma Y, Hoque AMW, Ngom PT, El Arifeen S, Raqib R, Vahter M: **In utero arsenic exposure is associated with impaired thymic function in newborns possibly via oxidative stress and apoptosis.** *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2012, **129**:305–314. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs202>.
 29. Choudhury S, Gupta P, Ghosh S, Mukherjee S, Chakraborty P, Chatterji U, Chattopadhyay S: **Arsenic-induced dose-dependent modulation of the NF- κ B/IL-6 axis in thymocytes triggers differential immune responses.** *Toxicology* 2016, **357–358**:85–96. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.005>.
 30. Gera R, Singh V, Mitra S, Sharma AK, Singh A, Dasgupta A, Singh D, Kumar M, Jagdale P, Patnaik S, Ghosh D: **Arsenic exposure impels CD4 commitment in thymus and suppress T cell cytokine secretion by increasing regulatory T cells.** *Sci Rep* 2017, **7**:7140. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07271-z>.
 31. Lu H, Crawford RB, North CM, Kaplan BLF, Kaminski NE: **Establishment of an immunoglobulin m antibody-forming cell response model for characterizing immunotoxicity in primary human B cells.** *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2009, **112**:363–373. <https://doi.org/10.1093/toxsci/ktp224>.
 32. Ezeh PC, Lauer FT, MacKenzie D, McClain S, Liu KJ, Hudson LG, Gandolfi AJ, Burchiel SW: **Arsenite selectively inhibits mouse bone marrow lymphoid progenitor cell development in vivo and in vitro and suppresses humoral immunity in vivo.** *PLoS One* 2014, **9**:e93920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093920>.
- The investigators demonstrate for the first time that, at low environmentally relevant levels, arsenite selectively inhibits CFU-B colony formation in femur and T-dependent antibody response in spleen of mice exposed through contaminated drinking water. *In vitro*, its monomethylated metabolite, monomethylarsonous acid, selectively suppresses the differentiation of murine CFU-B formation, at low nM concentrations, in the absence of apparent cytotoxicity. These findings support a marked sensitivity of murine lymphoid progenitor to inorganic arsenic and its methylated metabolite.
33. Ezeh PC, Xu H, Lauer FT, Liu KJ, Hudson LG, Burchiel SW: **Monomethylarsonous acid (MMA+3) inhibits IL-7 signaling in mouse Pre-B cells.** *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2016, **149**:289–299. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv233>.
 34. Biswas J, Sinha D, Mukherjee S, Roy S, Siddiqi M, Roy M: **Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal.** *Hum Exp Toxicol* 2010, **29**:513–524. <https://doi.org/10.1177/0960327109359020>.
 35. Srivastava RK, Li C, Chaudhary SC, Ballestas ME, Elmets CA, Robbins DJ, Matalon S, Deshane JS, Afaq F, Bickers DR, Athar M: **Unfolded protein response (UPR) signaling regulates arsenic trioxide-mediated macrophage innate immune**

- function disruption.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2013, **272**: 879–887. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.004>.
36. Gupta S, Yel L, Kim D, Kim C, Chiplunkar S, Gollapudi S: **Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**:711–719.
 37. Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM: **Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations.** *Environ Mol Mutagen* 2003, **42**:192–205. <https://doi.org/10.1002/em.10192>.
 38. Andrew AS, Burgess JL, Meza MM, Demidenko E, Waugh MG, Hamilton JW, Karagas MR: **Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair in vitro and in individuals exposed to drinking water arsenic.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:1193–1198.
 39. Bourdonnay E, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L: **Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic.** *J Cell Biochem* 2009, **107**:537–547. <https://doi.org/10.1002/jcb.22155>.
 40. Macoch M, Morzadec C, Génard R, Pallardy M, Kerdine-Römer S, Fardel O, Vernhet L: **Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic.** *Free Radic Biol Med* 2015, **88**:381–390. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.003>.
 41. Kile ML, Baccarelli A, Hoffman E, Tarantini L, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mahiuddin G, Mostafa G, Hsueh Y-M, Wright RO, Christiani DC: **Prenatal arsenic exposure and DNA methylation in maternal and umbilical cord blood leukocytes.** *Environ Health Perspect* 2012, **120**:1061–1066. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104173>.
 42. Niedzwiecki MM, Hall MN, Liu X, Oka J, Harper KN, Slavkovich V, Ilievski V, Levy D, van Geen A, Mey JL, Alam S, Siddique AB, Parvez F, Graziano JH, Gamble MV: **A dose-response study of arsenic exposure and global methylation of peripheral blood mononuclear cell DNA in Bangladeshi adults.** *Environ Health Perspect* 2013, **121**:1306–1312. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206421>.
 43. Argos M, Chen L, Jasmine F, Tong L, Pierce BL, Roy S, Paul-Brutus R, Gamble MV, Harper KN, Parvez F, Rahman M, Rakibuz-Zaman M, Slavkovich V, Baron JA, Graziano JH, Kibriya MG, Ahsan H: **Gene-specific differential DNA methylation and chronic arsenic exposure in an epigenome-wide association study of adults in Bangladesh.** *Environ Health Perspect* 2015, **123**:64–71. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307884>.
 44. Engström K, Wojdacz TK, Marabita F, Ewels P, Källner M, Vezzi F, Prezza N, Gruselius J, Vahter M, Broberg K: **Transcriptomics and methylomics of CD4-positive T cells in arsenic-exposed women.** *Arch Toxicol* 2017, **91**:2067–2078. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1879-4>.
- By analysing methylomics (target-enrichment next-generation sequencing) of human blood CD4+ T lymphocytes from arsenic-exposed Argentinean women, the investigators demonstrate that high arsenic exposure is associated with increased DNA methylation and that hyper-methylated regions showed enrichment for immune-related gene ontologies associated with the basic functions of T lymphocytes. This finding shows that the metalloids can be immunotoxic by altering epigenetic regulation of gene expression in human T lymphocytes
45. Chervona Y, Hall MN, Arita A, Wu F, Sun H, Tseng H-C, Ali E, Uddin MN, Liu X, Zoroddu MA, Gamble MV, Costa M: **Associations between arsenic exposure and global posttranslational histone modifications among adults in Bangladesh.** *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2012, **21**:2252–2260. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0833>.
 46. Pournara A, Kippler M, Holmlund T, Ceder R, Grafström R, Vahter M, Broberg K, Wallberg AE: **Arsenic alters global histone modifications in lymphocytes in vitro and in vivo.** *Cell Biol Toxicol* 2016, **32**:275–284. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9334-0>.
 47. Howrylak JA, Nakahira K: **Inflammasomes: key mediators of lung immunity.** *Annu Rev Physiol* 2017, **79**:471–494. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105229>.
 48. Maier NK, Crown D, Liu J, Leppla SH, Moayeri M: **Arsenic trioxide and other arsenical compounds inhibit the NLRP1, NLRP3, and NAIP5/NLRC4 inflammasomes.** *J Immunol Baltim Md* 1950 2014, **192**:763–770. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301434>.
- The investigators show that trivalent inorganic arsenic inhibits *in vitro* activation of NLRP1, NLRP3 and NAIP5/NLRC4 inflammasomes in murine bone marrow-derived macrophages by preventing autoproteolytic activation of caspase-1 and subsequent processing and secretion of IL-1 β . Arsenic also prevents NLRP3-dependent inflammation in a murine peritonitis model induced by monosodium urate crystals. These results demonstrate time that inflammasomes constitute molecular targets of the metalloids.
49. Rahman A, Vahter M, Ekström E-C, Persson L-Å: **Arsenic exposure in pregnancy increases the risk of lower respiratory tract infection and diarrhea during infancy in Bangladesh.** *Environ Health Perspect* 2011, **119**:719–724. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002265>.
 50. Smith AH, Marshall G, Yuan Y, Liaw J, Ferreccio C, Steinmaus C: **Evidence from Chile that arsenic in drinking water may increase mortality from pulmonary tuberculosis.** *Am J Epidemiol* 2011, **173**:414–420. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq383>.
 51. Perry MR, Prajapati VK, Menten J, Raab A, Feldmann J, Chakraborti D, Sundar S, Fairlamb AH, Boelaert M, Picado A: **Arsenic exposure and outcomes of antimonial treatment in visceral leishmaniasis patients in Bihar, India: a retrospective cohort study.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**:e0003518. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003518>.
 52. Kozul CD, Ely KH, Enelow RI, Hamilton JW: **Low-dose arsenic compromises the immune response to influenza A infection in vivo.** *Environ Health Perspect* 2009, **117**:1441–1447. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900911>.
 53. Dangleben NL, Skibola CF, Smith MT: **Arsenic immunotoxicity: a review.** *Environ Health Glob Access Sci Source* 2013, **12**:73. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-73>.
 54. Yuan A, Chen JJW, Yao P-L, Yang P-C: **The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction.** *Front Biosci J Virtual Libr* 2005, **10**:853–865.
 55. Chen Y, Wu F, Graziano JH, Parvez F, Liu M, Paul RR, Shaheen I, Sarwar G, Ahmed A, Islam T, Slavkovich V, Rundek T, Demmer RT, Desvarieux M, Ahsan H: **Arsenic exposure from drinking water, arsenic methylation capacity, and carotid intima-media thickness in Bangladesh.** *Am J Epidemiol* 2013, **178**:372–381. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt001>.
 56. Mateen FJ, Grau-Perez M, Pollak JS, Moon KA, Howard BV, Umans JG, Best LG, Francesconi KA, Goessler W, Crainiceanu C, Guallar E, Devereux RB, Roman MJ, Navas-Acien A: **Chronic arsenic exposure and risk of carotid artery disease: the Strong Heart Study.** *Environ Res* 2017, **157**: 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.05.020>.
 57. Lemaire M, Negro Silva LF, Lemarié CA, Bolt AM, Flores Molina M, Krohn RM, Smits JE, Lehoux S, Mann KK: **Arsenic exposure increases monocyte adhesion to the vascular endothelium, a pro-atherogenic mechanism.** *PLoS One* 2015, **10**:e0136592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136592>.
 58. Negro Silva LF, Lemaire M, Lemarié CA, Plourde D, Bolt AM, Chiavatti C, Bohle DS, Slavkovich V, Graziano JH, Lehoux S, Mann KK: **Effects of inorganic arsenic, methylated arsenicals, and arsenobetaine on atherosclerosis in the mouse model and the role of as3mt-mediated methylation.** *Environ Health Perspect* 2017, **125**:077001. <https://doi.org/10.1289/EHP806>.
 59. Bobé P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MK: **Arsenic trioxide: a promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice.** *Blood* 2006, **108**:3967–3975. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-020610>.
 60. Kavian N, Marut W, Servettaz A, Laude H, Nicco C, Chéreau C, Weill B, Batteux F: **Arsenic trioxide prevents murine sclerodermatous graft-versus-host disease.** *J Immunol Baltim Md*

1950 2012, **188**:5142–5149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103538>.

Using a murine model of sclerodermatous graft-versus-host disease, the investigators report that arsenic trioxide markedly abrogates severe clinical syndromes developed by transplanted mice, through depletion of glutathione and production of reactive oxygen species that selectively kill activated CD4⁺ T cells and plasmacytoid dendritic cells. These results support the hypothesis that inorganic arsenic may display beneficial effects in the management of chronic graft-versus-host disease in humans.

61. Yan G, Xi Y, Xu S, Lin Y, Chen J, Dai H, Xia J, Li C, Li Q, Li Z, Qi Z: **Inhibition of accelerated rejection mediated by alloreactive CD4⁺ memory T cells and prolonged allograft survival**

by arsenic trioxide. *Immunol Invest* 2013, **42**:438–454. <https://doi.org/10.3109/08820139.2013.801986>.

62. Gao C, Jiang J, Ma P, Cheng P, Lian Y, Zhao B, Li C, Peng Y, Wang F, Lin Y, Jin N, Li J, Wang L, Li Q, Leng Y, Xia J, Qi Z: **Arsenic trioxide induces T cell apoptosis and prolongs islet allograft survival in mice.** *Transplantation* 2015, **99**: 1796–1806. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000735>.
63. Li C, Guan T, Gao C, Lin Y, Yan G, Zhu M, Lv C, Xia J, Qi Z: **Arsenic trioxide inhibits accelerated allograft rejection mediated by alloreactive CD8(+) memory T cells and prolongs allograft survival time.** *Transpl Immunol* 2015, **33**:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2015.05.004>.

Références bibliographiques

Achkova, D., and Maher, J. (2016). Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 333–341.

Agbanoma, G., Li, C., Ennis, D., Palfreeman, A.C., Williams, L.M., and Brennan, F.M. (2012). Production of TNF- α in Macrophages Activated by T Cells, Compared with Lipopolysaccharide, Uses Distinct IL-10–Dependent Regulatory Mechanism. *J. Immunol.* *188*, 1307–1317.

Alhamad, E.H., Cal, J.G., Shakoob, Z., Almogren, A., and AlBoukai, A.A. (2013). Cytokine gene polymorphisms and serum cytokine levels in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Med. Genet.* *14*, 66.

Al-Kufaidy, R., Vazquez-Tello, A., BaHamman, A.S., Al-Muhsen, S., Hamid, Q., and Halwani, R. (2017). IL-17 enhances the migration of B cells during asthma by inducing CXCL13 chemokine production in structural lung cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *139*, 696–699.e5.

Altintas, N., Erboga, M., Aktas, C., Bilir, B., Aydin, M., Sengul, A., Ates, Z., Topcu, B., and Gurel, A. (2016). Protective Effect of Infliximab, a Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitor, on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. *Inflammation* *39*, 65–78.

Andersson-Sjöland, A., de Alba, C.G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramírez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., and Selman, M. (2008). Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 2129–2140.

Aono, Y., Kishi, M., Yokota, Y., Azuma, M., Kinoshita, K., Takezaki, A., Sato, S., Kawano, H., Kishi, J., Goto, H., et al. (2014). Role of Platelet-Derived Growth Factor/Platelet-Derived Growth Factor Receptor Axis in the Trafficking of Circulating Fibrocytes in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *51*, 793–801.

Arai, T., Abe, K., Matsuoka, H., Yoshida, M., Mori, M., Goya, S., Kida, H., Nishino, K., Osaki, T., Tachibana, I., et al. (2000). Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *278*, L914–L922.

Arai, T., Tachibana, K., Sugimoto, C., Inoue, Y., Tokura, S., Okuma, T., Akira, M., Kitaichi, M., Hayashi, S., and Inoue, Y. (2017). High-dose prednisolone after intravenous methylprednisolone improves prognosis of acute exacerbation in idiopathic interstitial pneumonias. *Respirology* *22*, 1363–1370.

Arora, S., Ahmad, S., Irshad, R., Goyal, Y., Rafat, S., Siddiqui, N., Dev, K., Husain, M., Ali, S., Mohan, A., et al. (2019). TLRs in pulmonary diseases. *Life Sci.* *233*, 116671.

Aryal, S., and Nathan, S.D. (2018). An update on emerging drugs for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* *23*, 159–172.

Ashitani, J., Mukae, H., Taniguchi, H., Ihi, T., Kadota, J., Kohno, S., and Matsukura, S. (1999). Granulocyte-colony stimulating factor levels in bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* *54*, 1015–1020.

- Atamas, S.P., Luzina, I.G., Choi, J., Tsymbalyuk, N., Carbonetti, N.H., Singh, I.S., Trojanowska, M., Jimenez, S.A., and White, B. (2003). Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine Stimulates Collagen Production in Lung Fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 743–749.
- Bagnato, G., and Harari, S. (2015). Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *Eur. Respir. Rev.* 24, 102–114.
- Bantsimba-Malanda, C., Marchal-Sommé, J., Goven, D., Freynet, O., Michel, L., Crestani, B., and Soler, P. (2010). A Role for Dendritic Cells in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 385–395.
- Baran, C.P., Opalek, J.M., McMaken, S., Newland, C.A., O'Brien, J.M., Hunter, M.G., Bringardner, B.D., Monick, M.M., Brigstock, D.R., Stromberg, P.C., et al. (2007). Important Roles for Macrophage Colony-stimulating Factor, CC Chemokine Ligand 2, and Mononuclear Phagocytes in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 78–89.
- Barbarin, V., Arras, M., Misson, P., Delos, M., McGarry, B., Phan, S.H., Lison, D., and Huaux, F. (2004). Characterization of the effect of interleukin-10 on silica-induced lung fibrosis in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 78–85.
- Barbarin, V., Xing, Z., Delos, M., Lison, D., and Huaux, F. (2005). Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 288, L841–L848.
- Barbas-Filho, J., Ferreira, M., Sesso, A., Kairalla, R., Carvalho, C., and Capelozzi, V. (2001). Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J. Clin. Pathol.* 54, 132–138.
- Baumgartner, K.B., Samet, J.M., Stidley, C.A., Colby, T.V., and Waldron, J.A. (1997). Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 242–248.
- Bellamri, N., Morzadec, C., Joannes, A., Lecureur, V., Wollin, L., Jouneau, S., and Vernhet, L. (2019). Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. *Int. Immunopharmacol.* 72, 112–123.
- Belperio, J.A., Dy, M., Murray, L., Burdick, M.D., Xue, Y.Y., Strieter, R.M., and Keane, M.P. (2004). The Role of the Th2 CC Chemokine Ligand CCL17 in Pulmonary Fibrosis. *J. Immunol.* 173, 4692–4698.
- Bergeron, A., Soler, P., Kambouchner, M., Loiseau, P., Milleron, B., Valeyre, D., Hance, A.J., and Tazi, A. (2003). Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF- β and IL-10. *Eur. Respir. J.* 22, 69–76.
- Bhattacharjee, A., Pal, S., Feldman, G.M., and Cathcart, M.K. (2011). Hck Is a Key Regulator of Gene Expression in Alternatively Activated Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 36709–36723.

- Birring, S.S., Wijssenbeek, M.S., Agrawal, S., van den Berg, J.W.K., Stone, H., Maher, T.M., Tutuncu, A., and Morice, A.H. (2017). A novel formulation of inhaled sodium cromoglicate (PA101) in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic cough: a randomised, double-blind, proof-of-concept, phase 2 trial. *Lancet Respir. Med.* 5, 806–815.
- Biswas, S.K., Chittezhath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.-Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* 53, 11–24.
- Bonella, F., Stowasser, S., and Wollin, L. (2015). Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 6407–6419.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280–288.
- Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D.C., Johnson-Vroom, K.E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A.G., Aronow, B.J., Ghosh, G., Rickert, R.C., et al. (2004). Activation of IKK α target genes depends on recognition of specific κ B binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* 23, 4202–4210.
- Bonner, J.C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 255–273.
- Borghi, A., Verstrepen, L., and Beyaert, R. (2016). TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. *Biochem. Pharmacol.* 116, 1–10.
- Borie, R., Kannengiesser, C., Nathan, N., Tabèze, L., Pradère, P., and Crestani, B. (2015). Familial pulmonary fibrosis. *Rev. Mal. Respir.* 32, 413–434.
- Boveda-Ruiz, D., D'Alessandro-Gabazza, C.N., Toda, M., Takagi, T., Naito, M., Matsushima, Y., Matsumoto, T., Kobayashi, T., Gil-Bernabe, P., Chelakkot-Govindalayathil, A.-L., et al. (2013). Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. *Immunobiology* 218, 245–254.
- Bracke, K.R., Verhamme, F.M., Seys, L.J.M., Bantsimba-Malanda, C., Cunoosamy, D.M., Herbst, R., Hammad, H., Lambrecht, B.N., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. (2013). Role of CXCL13 in Cigarette Smoke-induced Lymphoid Follicle Formation and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 343–355.
- Burgess, J.K., Mauad, T., Tjin, G., Karlsson, J.C., and Westergren-Thorsson, G. (2016). The extracellular matrix – the under-recognized element in lung disease? *J. Pathol.* 240, 397–409.
- Burman, A., Tanjore, H., and Blackwell, T.S. (2018). Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. *Matrix Biol.* 68–69, 355–365.
- Byrne, A.J., Mathie, S.A., Gregory, L.G., and Lloyd, C.M. (2015). Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax* 70, 1189–1196.
- Byrne, A.J., Maher, T.M., and Lloyd, C.M. (2016). Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? *Trends Mol. Med.* 22, 303–316.
- Cai, M., Bonella, F., He, X., Sixt, S.U., Sarria, R., Guzman, J., and Costabel, U. (2013). CCL18 in serum, BAL fluid and alveolar macrophage culture supernatant in interstitial lung diseases. *Respir. Med.* 107, 1444–1452.

- Cai, Y., Sugimoto, C., Arainga, M., Alvarez, X., Didier, E.S., and Kuroda, M.J. (2014). In Vivo Characterization of Alveolar and Interstitial Lung Macrophages in Rhesus Macaques: Implications for Understanding Lung Disease in Humans. *J. Immunol.* *192*, 2821–2829.
- Carlsen, H.S. (2004). Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood* *104*, 3021–3027.
- Cavarra, E., Carraro, F., Fineschi, S., Naldini, A., Bartalesi, B., Pucci, A., and Lungarella, G. (2004). Early response to bleomycin is characterized by different cytokine and cytokine receptor profiles in lungs. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *287*, L1186–L1192.
- Chakarov, S., Lim, H.Y., Tan, L., Lim, S.Y., See, P., Lum, J., Zhang, X.-M., Foo, S., Nakamizo, S., Duan, K., et al. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* *363*, eaau0964.
- Chaudhary, N.I., Roth, G.J., Hilberg, F., Muller-Quernheim, J., Prasse, A., Zissel, G., Schnapp, A., and Park, J.E. (2007). Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur. Respir. J.* *29*, 976–985.
- Chenivesse, C., and Tsicopoulos, A. (2018). CCL18 – Beyond chemotaxis. *Cytokine* *109*, 52–56.
- Chioma, O.S., and Drake, W.P. (2017). Role of Microbial Agents in Pulmonary Fibrosis. *Yale J. Biol. Med.* *90*, 219–227.
- Chizzolini, C., Rezzonico, R., De Luca, C., Burger, D., and Dayer, J.-M. (2000). Th2 Cell Membrane Factors in Association with IL-4 Enhance Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) While Decreasing MMP-9 Production by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Differentiated Human Monocytes. *J. Immunol.* *164*, 5952–5960.
- Clarke, D.L., Carruthers, A.M., Mustelin, T., and Murray, L.A. (2013). Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes. *Fibrogenesis Tissue Repair* *6*, 20.
- Collard, H.R., Ryerson, C.J., Corte, T.J., Jenkins, G., Kondoh, Y., Lederer, D.J., Lee, J.S., Maher, T.M., Wells, A.U., Antoniou, K.M., et al. (2016). Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *194*, 265–275.
- Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., and Vancheri, C. (2014). Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur. J. Pharm. Sci.* *58*, 13–19.
- Cottin, V., Crestani, B., Valeyre, D., Wallaert, B., Cadranet, J., Dalphin, J.C., Delaval, P., Israel-Biet, D., Kessler, R., Reynaud-Gaubert, M., et al. (2013). Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique. Élaborées par le centre national de référence et les centres de compétence pour les maladies pulmonaires rares sous l'égide de la Société de pneumologie de langue française. *Rev. Mal. Respir.* *30*, 879–902.
- Cottin, V., Crestani, B., Cadranet, J., Cordier, J.-F., Marchand-Adam, S., Prévot, G., Wallaert, B., Bergot, E., Camus, P., Dalphin, J.-C., et al. (2017). French practical guidelines for the

diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis - 2017 update. Full-length version. *Rev. Mal. Respir.* 34, 900–968.

Crestani, B., Huggins, J.T., Kaye, M., Costabel, U., Glaspole, I., Ogura, T., Song, J.W., Stansen, W., Quaresma, M., Stowasser, S., et al. (2019). Long-term safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results from the open-label extension study, INPULSIS-ON. *Lancet Respir. Med.* 7, 60–68.

Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S.A., and Ngo, V.N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* 176, 181–193.

Dadrich, M., Nicolay, N.H., Flechsig, P., Bickelhaupt, S., Hoeltgen, L., Roeder, F., Hauser, K., Tietz, A., Jenne, J., Lopez, R., et al. (2016). Combined inhibition of TGF β and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis. *OncoImmunology* 5, e1123366.

Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C.K., and Roy, S. (2015). Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am. J. Pathol.* 185, 2596–2606.

DeMaio, L., Buckley, S.T., Krishnaveni, M.S., Flodby, P., Dubourd, M., Banfalvi, A., Xing, Y., Ehrhardt, C., Minoo, P., Zhou, B., et al. (2012). Ligand-independent transforming growth factor- β type I receptor signaling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Pathol.* 226, 633–644.

DePianto, D.J., Chandriani, S., Abbas, A.R., Jia, G., N'Diaye, E.N., Caplazi, P., Kauder, S.E., Biswas, S., Karnik, S.K., Ha, C., et al. (2015). Heterogeneous gene expression signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 70, 48–56.

Desai, O., Winkler, J., Minasyan, M., and Herzog, E.L. (2018). The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* 5.

Donahoe, M., Valentine, V.G., Chien, N., Gibson, K.F., Raval, J.S., Saul, M., Xue, J., Zhang, Y., and Duncan, S.R. (2015). Autoantibody-Targeted Treatments for Acute Exacerbations of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* 10, e0127771.

Donnelly, R.P., Dickensheets, H., and Finbloom, D.S. (1999). The Interleukin-10 Signal Transduction Pathway and Regulation of Gene Expression in Mononuclear Phagocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 563–573.

Duerr, C.U., and Fritz, J.H. (2016). Regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Cytokine* 87, 1–8.

Eddens, T., Elsegeiny, W., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Castillo, P., Trevejo-Nunez, G., Serody, K., Campfield, B.T., Khader, S.A., Chen, K., Rangel-Moreno, J., et al. (2017). Pneumocystis driven inducible bronchus associated lymphoid tissue formation requires Th2 and Th17 immunity. *Cell Rep.* 18, 3078–3090.

Fathi, M., Johansson, A., Lundborg, M., Orre, L., Sköld, C.M., and Camner, P. (2001). Functional and Morphological Differences between Human Alveolar and Interstitial Macrophages. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 77–82.

- Finch, D.K., Ettinger, R., Karnell, J.L., Herbst, R., and Sleeman, M.A. (2013). Effects of CXCL13 inhibition on lymphoid follicles in models of autoimmune disease. *Eur. J. Clin. Invest.* *43*, 501–509.
- Fiorcari, S., Maffei, R., Audrito, V., Martinelli, S., Hacken, E.T., Zucchini, P., Grisendi, G., Potenza, L., Luppi, M., Burger, J.A., et al. (2016). Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* *7*, 65968–65981.
- Fleige, H., Ravens, S., Moschovakis, G.L., Bölter, J., Willenzon, S., Sutter, G., Häussler, S., Kalinke, U., Prinz, I., and Förster, R. (2014). IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J. Exp. Med.* *211*, 643–651.
- Fletcher, A.A., and Evans, C.M. (2014). Regulation of Microbial Populations and Immune Functions by Muc5b. *Ann. Am. Thorac. Soc.* *11*, S80–S80.
- Florez-Sampedro, L., Song, S., and Melgert, B.N. (2018). The diversity of myeloid immune cells shaping wound repair and fibrosis in the lung. *Regeneration* *5*, 3–25.
- François, A., Gombault, A., Villeret, B., Alsaleh, G., Fanny, M., Gasse, P., Adam, S.M., Crestani, B., Sibilia, J., Schneider, P., et al. (2015). B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis. *J. Autoimmun.* *56*, 1–11.
- Fraser, E., and Hoyles, R.K. Therapeutic advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *10*.
- Froese, A.R., Shimbori, C., Bellaye, P.-S., Inman, M., Obex, S., Fatima, S., Jenkins, G., Gaudie, J., Ask, K., and Kolb, M. (2016). Stretch-induced Activation of Transforming Growth Factor- β 1 in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *194*, 84–96.
- Fujishima, S., Shiomi, T., Yamashita, S., Yogo, Y., Nakano, Y., Inoue, T., Nakamura, M., Tasaka, S., Hasegawa, N., Aikawa, N., et al. (2010). Production and Activation of Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin 1) in the Lungs of Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* *134*, 7.
- Fukuda, Y., Ishizaki, M., Kudoh, S., Kitaichi, M., and Yamanaka, N. (1998). Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *78*, 687–698.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* *128*, 415–435.
- Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Rapino, F., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., Graf, T., and Hornung, V. (2016). Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* *44*, 833–846.
- Galati, D., De Martino, M., Trotta, A., Rea, G., Bruzzese, D., Cicchitto, G., Stanziola, A.A., Napolitano, M., Sanduzzi, A., and Bocchino, M. (2014). Peripheral depletion of NK cells and imbalance of the Treg/Th17 axis in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Cytokine* *66*, 119–126.

- Garbi, N., and Lambrecht, B.N. (2017). Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* *469*, 561–572.
- Garcia, S., Hartkamp, L.M., Malvar-Fernandez, B., van Es, I.E., Lin, H., Wong, J., Long, L., Zanghi, J.A., Rankin, A.L., Masteller, E.L., et al. (2016). Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *18*, 75.
- Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V.F.J., Lagente, V., et al. (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* *JCI32285*.
- Gibbins, S.L., Goyal, R., Desch, A.N., Leach, S.M., Prabagar, M., Atif, S.M., Bratton, D.L., Janssen, W., and Jakubzick, C.V. (2015). Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. *Blood* *126*, 1357–1366.
- Gibbins, S.L., Thomas, S.M., Atif, S.M., McCubbrey, A.L., Desch, A.N., Danhorn, T., Leach, S.M., Bratton, D.L., Henson, P.M., Janssen, W.J., et al. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *57*, 66–76.
- Gibbons, M.A., MacKinnon, A.C., Ramachandran, P., Dhaliwal, K., Duffin, R., Phythian-Adams, A.T., van Rooijen, N., Haslett, C., Howie, S.E., Simpson, A.J., et al. (2011). Ly6Chi Monocytes Direct Alternatively Activated Profibrotic Macrophage Regulation of Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 569–581.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 23–35.
- Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C.E., Schledzewski, K., and Goerdt, S. (2001). Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein β IG-H3. *Scand. J. Immunol.* *53*, 386–392.
- Gregory, A.D., Kliment, C.R., Metz, H.E., Kim, K.-H., Kargl, J., Agostini, B.A., Crum, L.T., Oczypok, E.A., Oury, T.A., and Houghton, A.M. (2015). Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* *98*, 143–152.
- Grommes, J., and Soehnlein, O. (2011). Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Mol. Med.* *17*, 293–307.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* *13*, 85–94.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.
- Gulati, S., and Thannickal, V.J. (2019). The Aging Lung and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Med. Sci.* *357*, 384–389.

- Häcker, H., Tseng, P.-H., and Karin, M. (2011). Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 457–468.
- Hagimoto, N., Kuwano, K., Miyazaki, H., Kunitake, R., Fujita, M., Kawasaki, M., Kaneko, Y., and Hara, N. (1997). Induction of Apoptosis and Pulmonary Fibrosis in Mice in Response to Ligation of Fas Antigen. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *17*, 272–278.
- Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., and Hara, N. (2002). TGF- β 1 as an Enhancer of Fas-Mediated Apoptosis of Lung Epithelial Cells. *J. Immunol.* *168*, 6470–6478.
- Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 533–544.
- Hamilton, T.A., Zhao, C., Pavicic, P.G.J., and Datta, S. (2014). Myeloid Colony-Stimulating Factors as Regulators of Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* *5*.
- Hams, E., Armstrong, M.E., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Schwartz, C., Cooke, G., Fahy, R.J., Crotty, T.B., Hirani, N., Flynn, R.J., et al. (2014). IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 367–372.
- Han, B.K., Kuzin, I., Gaughan, J.P., Olsen, N.J., and Bottaro, A. (2016). Baseline CXCL10 and CXCL13 levels are predictive biomarkers for tumor necrosis factor inhibitor therapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: a pilot, prospective study. *Arthritis Res. Ther.* *18*.
- Han, M.K., Zhou, Y., Murray, S., Tayob, N., Noth, I., Lama, V.N., Moore, B.B., White, E.S., Flaherty, K.R., Huffnagle, G.B., et al. (2014a). Association Between Lung Microbiome and Disease Progression in IPF: A Prospective Cohort Study. *Lancet Respir. Med.* *2*, 548–556.
- Han, M.K., Zhou, Y., Murray, S., Tayob, N., Noth, I., Lama, V.N., Moore, B.B., White, E.S., Flaherty, K.R., Huffnagle, G.B., et al. (2014b). Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. *Lancet Respir. Med.* *2*, 548–556.
- Hart, P.H., Vitti, G.F., Burgess, D.R., Whitty, G.A., Piccoli, D.S., and Hamilton, J.A. (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1, and prostaglandin E₂. *Proc Natl Acad Sci USA* *5*.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* *38*, 792–804.
- He, Y., Hara, H., and Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 1012–1021.
- Heukels, P., Moor, C.C., von der Thüsen, J.H., Wijsenbeek, M.S., and Kool, M. (2019). Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respir. Med.* *147*, 79–91.

Hilberg, F., Tontsch-Grunt, U., Baum, A., Le, A.T., Doebele, R.C., Lieb, S., Gianni, D., Voss, T., Garin-Chesa, P., Haslinger, C., et al. (2018). Triple Angiokinase Inhibitor Nintedanib Directly Inhibits Tumor Cell Growth and Induces Tumor Shrinkage via Blocking Oncogenic Receptor Tyrosine Kinases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *364*, 494–503.

Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., and Gabbiani, G. (2007). The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *Am. J. Pathol.* *170*, 1807–1816.

Hope-Gill, B.D.M., Hilldrup, S., Davies, C., Newton, R.P., and Harrison, N.K. (2003). A Study of the Cough Reflex in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *168*, 995–1002.

Horowitz, J.C., and Thannickal, V.J. (2006). Epithelial–Mesenchymal Interactions in Pulmonary Fibrosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *27*, 600–612.

Horton, M.R., Santopietro, V., Mathew, L., Horton, K.M., Polito, A.J., Liu, M.C., Danoff, S.K., and Lechtzin, N. (2012). Thalidomide for the treatment of cough in idiopathic pulmonary fibrosis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* *157*, 398–406.

Hostettler, K. (2017). Fibrose pulmonaire idiopathique. *Forum Méd. Suisse* *17*, 1115–1123.

Hostettler, K.E., Zhong, J., Papakonstantinou, E., Karakiulakis, G., Tamm, M., Seidel, P., Sun, Q., Mandal, J., Lardinois, D., Lambers, C., et al. (2014). Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* *15*, 157.

Hou, J., Ma, T., Cao, H., Chen, Y., Wang, C., Chen, X., Xiang, Z., and Han, X. (2018). TNF- α -induced NF- κ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Cell. Physiol.* *233*, 2409–2419.

Hoyne, G.F., Elliott, H., Mutsaers, S.E., and Prêle, C.M. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis and a role for autoimmunity. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 577–583.

Huang, J., Maier, C., Zhang, Y., Soare, A., Dees, C., Beyer, C., Harre, U., Chen, C.-W., Distler, O., Schett, G., et al. (2017a). Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1941–1948.

Huang, Y., Ma, S.-F., Espindola, M.S., Vij, R., Oldham, J.M., Huffnagle, G.B., Erb-Downward, J.R., Flaherty, K.R., Moore, B.B., White, E.S., et al. (2017b). Microbes Are Associated with Host Innate Immune Response in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *196*, 208–219.

Huaux, F., Louahed, J., Hudspith, B., Meredith, C., Delos, M., Renauld, J.-C., and Lison, D. (1998). Role of Interleukin-10 in the Lung Response to Silica in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *18*, 51–59.

Hume, D.A., and MacDonald, K.P.A. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* *119*, 1810–1820.

Hussain, M., Adah, D., Tariq, M., Lu, Y., Zhang, J., and Liu, J. (2019). CXCL13/CXCR5 signaling axis in cancer. *Life Sci.* 227, 175–186.

Inoue, T., Fujishima, S., Ikeda, E., Yoshie, O., Tsukamoto, N., Aiso, S., Aikawa, N., Kubo, A., Matsushima, K., and Yamaguchi, K. (2004). CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 24, 49–56.

Islam, S.A., Ling, M.F., Leung, J., Shreffler, W.G., and Luster, A.D. (2013). Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor. *J. Exp. Med.* 210, 1889–1898.

Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.

Iyer, S.N., Wild, J.S., Schiedt, M.J., Hyde, D.M., Margolin, S.B., and Giri, S.N. (1995). Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *J. Lab. Clin. Med.* 125, 779–785.

Iyer, S.N., Hyde, D.M., and Giri, S.N. (2000). Anti-inflammatory effect of pirfenidone in the bleomycin-hamster model of lung inflammation. *Inflammation* 24, 477–491.

Jacquel, A., Benikhlef, N., Paggetti, J., Lalaoui, N., Guery, L., Dufour, E.K., Ciudad, M., Racoer, C., Micheau, O., Delva, L., et al. (2009). Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. *Blood* 114, 3633–3641.

Ji, W.-J., Ma, Y.-Q., Zhou, X., Zhang, Y.-D., Lu, R.-Y., Guo, Z.-Z., Sun, H.-Y., Hu, D.-C., Yang, G.-H., Li, Y.-M., et al. (2013). Spironolactone Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Injury Partially via Modulating Mononuclear Phagocyte Phenotype Switching in Circulating and Alveolar Compartments. *PLOS ONE* 8, e81090.

Ji, W.-J., Ma, Y.-Q., Zhou, X., Zhang, Y.-D., Lu, R.-Y., Sun, H.-Y., Guo, Z.-Z., Zhang, Z., Li, Y.-M., and Wei, L.-Q. (2014). Temporal and spatial characterization of mononuclear phagocytes in circulating, lung alveolar and interstitial compartments in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary injury. *J. Immunol. Methods* 403, 7–16.

Johannson, K.A., Strâmbu, I., Ravaglia, C., Grutters, J.C., Valenzuela, C., Mogulkoc, N., Luppi, F., Richeldi, L., Wells, A.U., Vancheri, C., et al. (2017). Antacid therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: more questions than answers? *Lancet Respir. Med.* 5, 591–598.

Jolly, M.K., Ward, C., Eapen, M.S., Myers, S., Hallgren, O., Levine, H., and Sohal, S.S. (2018). Epithelial–mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Dev. Dyn.* 247, 346–358.

Joshi, N., Walter, J.M., and Misharin, A.V. (2018). Alveolar Macrophages. *Cell. Immunol.* 330, 86–90.

Kahloon, R.A., Xue, J., Bhargava, A., Csizmadia, E., Otterbein, L., Kass, D.J., Bon, J., Soejima, M., Levesque, M.C., Lindell, K.O., et al. (2013). Patients with Idiopathic Pulmonary

Fibrosis with Antibodies to Heat Shock Protein 70 Have Poor Prognoses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 768–775.

Kahnert, A., Seiler, P., Stein, M., Bandermann, S., Hahnke, K., Mollenkopf, H., and Kaufmann, S.H.E. (2006). Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 36, 631–647.

Kallioulas, G.D., and Ivashkiv, L.B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 49–62.

Karakioulakis, G., Papakonstantinou, E., Aletras, A.J., Tamm, M., and Roth, M. (2007). Cell Type-specific Effect of Hypoxia and Platelet-derived Growth Factor-BB on Extracellular Matrix Turnover and Its Consequences for Lung Remodeling. *J. Biol. Chem.* 282, 908–915.

Keane, M.P., Belperio, J.A., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2001). IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L92–L97.

Kenn, K., Gloeckl, R., Soennichsen, A., Szczepanski, B., Winterkamp, S., Boensch, M., and Welte, T. (2015). Predictors of success for pulmonary rehabilitation in patients awaiting lung transplantation. *Transplantation* 99, 1072–1077.

Kim, K.-H., Burkhart, K., Chen, P., Frevert, C.W., Randolph-Habecker, J., Hackman, R.C., Soloway, P.D., and Madtes, D.K. (2005). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Deficiency Amplifies Acute Lung Injury in Bleomycin-Exposed Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 271–279.

King, T.E., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Hormel, P., Lancaster, L., Noble, P.W., Sahn, S.A., Szwarzberg, J., Thomeer, M., et al. (2009). Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 374, 222–228.

King, T.E., Pardo, A., and Selman, M. (2011a). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* 378, 1949–1961.

King, T.E., Pardo, A., and Selman, M. (2011b). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 378, 1949–1961.

King, T.E.J., Bradford, W.Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E.A., Glaspole, I., Glassberg, M.K., Gorina, E., Hopkins, P.M., Kardatzke, D., Lancaster, L., et al. (2014). A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

Klimatcheva, E., Pandina, T., Reilly, C., Torno, S., Bussler, H., Scrivens, M., Jonason, A., Mallow, C., Doherty, M., Paris, M., et al. (2015). CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders. *BMC Immunol.* 16, 6.

Klinkhammer, B.M., Floege, J., and Boor, P. (2018). PDGF in organ fibrosis. *Mol. Aspects Med.* 62, 44–62.

Kobayashi, S., Murata, K., Shibuya, H., Morita, M., Ishikawa, M., Furu, M., Ito, H., Ito, J., Matsuda, S., Watanabe, T., et al. (2013). A Distinct Human CD4⁺ T Cell Subset That Secretes CXCL13 in Rheumatoid Synovium. *Arthritis Rheum.* *65*, 3063–3072.

Kobayashi, S., Watanabe, T., Suzuki, R., Furu, M., Ito, H., Ito, J., Matsuda, S., and Yoshitomi, H. (2016). TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4⁺ T cells: TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* *46*, 360–371.

Kohberg, C., Andersen, C.U., and Bendstrup, E. (2016). Opioids: an unexplored option for treatment of dyspnea in IPF. *Eur. Clin. Respir. J.* *3*.

Kolahian, S., Fernandez, I.E., Eickelberg, O., and Hartl, D. (2016). Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *55*, 309–322.

Kolb, M., Margetts, P.J., Anthony, D.C., Pitossi, F., and Gauldie, J. (2001). Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* *107*, 1529–1536.

Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.-M., Seeger, W., et al. (2008). Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *178*, 838–846.

Kotsianidis, I., Nakou, E., Bouchliou, I., Tzouvelekis, A., Spanoudakis, E., Steiropoulos, P., Sotiriou, I., Aidinis, V., Margaritis, D., Tsatalas, C., et al. (2009). Global Impairment of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *179*, 1121–1130.

Kreuter, M., Wuyts, W., Renzoni, E., Koschel, D., Maher, T.M., Kolb, M., Weycker, D., Spagnolo, P., Kirchgaessler, K.-U., Herth, F.J.F., et al. (2016). Antacid therapy and disease outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis: a pooled analysis. *Lancet Respir. Med.* *4*, 381–389.

Kropski, J.A., Lawson, W.E., Young, L.R., and Blackwell, T.S. (2013). Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis. Model. Mech.* *6*, 9–17.

Kropski, J.A., Blackwell, T.S., and Loyd, J.E. (2015). The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* *45*, 1717–1727.

Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N.R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., and Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog.* *11*.

Kuwano, K., Kunitake, R., Kawasaki, M., Nomoto, Y., Hagimoto, N., Nakanishi, Y., and Hara, N. (1996). P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *154*, 477–483.

Lasithiotaki, I., Giannarakis, I., Tsitoura, E., Samara, K.D., Margaritopoulos, G.A., Choulaki, C., Vasarmidi, E., Tzanakis, N., Voloudaki, A., Sidiropoulos, P., et al. (2016). NLRP3

inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung. *Eur. Respir. J.* *47*, 910–918.

Lawson, W.E., Cheng, D.-S., Degryse, A.L., Tanjore, H., Polosukhin, V.V., Xu, X.C., Newcomb, D.C., Jones, B.R., Roldan, J., Lane, K.B., et al. (2011). Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 10562–10567.

Lee, C.G., Cho, S.J., Kang, M.J., Chapoval, S.P., Lee, P.J., Noble, P.W., Yehualaeshet, T., Lu, B., Flavell, R.A., Milbrandt, J., et al. (2004). Early Growth Response Gene 1–mediated Apoptosis Is Essential for Transforming Growth Factor β 1–induced Pulmonary Fibrosis. *J. Exp. Med.* *200*, 377–389.

Lee, J.S., Collard, H.R., Raghu, G., Sweet, M.P., Hays, S.R., Campos, G.M., Golden, J.A., and King, T.E. (2010). Does Chronic Microaspiration Cause Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *Am. J. Med.* *123*, 304–311.

Lee, J.S., Ryu, J.H., Elicker, B.M., Lydell, C.P., Jones, K.D., Wolters, P.J., King, T.E., and Collard, H.R. (2011). Gastroesophageal Reflux Therapy Is Associated with Longer Survival in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 1390–1394.

Lee, J.S., Collard, H.R., Anstrom, K.J., Martinez, F.J., Noth, I., Roberts, R.S., Yow, E., and Raghu, G. (2013). Anti-Acid Therapy and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: an analysis of data from three randomized controlled trials. *Lancet Respir. Med.* *1*, 369–376.

Lee, S.H., Kim, D.S., Kim, Y.W., Chung, M.P., Uh, S.T., Park, C.S., Jeong, S.H., Park, Y.B., Lee, H.L., Song, J.S., et al. (2015). Association between occupational dust exposure and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis: a Korean national survey. *Chest* *147*, 465–474.

Lehmann, M., Korfei, M., Mutze, K., Klee, S., Skronska-Wasek, W., Alsafadi, H.N., Ota, C., Costa, R., Schiller, H.B., Lindner, M., et al. (2017). Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis *ex vivo*. *Eur. Respir. J.* *50*, 1602367.

Lehnert, B.E., Valdez, Y.E., Lehnert, N.M., Park, M.S., and Englen, M.D. (1994). Stimulation of rat and murine alveolar macrophage proliferation by lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *11*, 375–385.

Leppäranta, O., Sens, C., Salmenkivi, K., Kinnula, V.L., Keski-Oja, J., Myllärniemi, M., and Koli, K. (2012). Regulation of TGF- β storage and activation in the human idiopathic pulmonary fibrosis lung. *Cell Tissue Res.* *348*, 491–503.

Ley, B., Collard, H.R., and King, T.E. (2011). Clinical Course and Prediction of Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 431–440.

Li, D., Guabiraba, R., Besnard, A.-G., Komai-Koma, M., Jabir, M.S., Zhang, L., Graham, G.J., Kurowska-Stolarska, M., Liew, F.Y., McSharry, C., et al. (2014). IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 1422-1432.e11.

- Li, F.J., Surolia, R., Li, H., Wang, Z., Kulkarni, T., Liu, G., de Andrade, J.A., Kass, D.J., Thannickal, V.J., Duncan, S.R., et al. (2017a). Autoimmunity to Vimentin Is Associated with Outcomes of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Immunol.* *199*, 1596–1605.
- Li, L.-F., Kao, K.-C., Liu, Y.-Y., Lin, C.-W., Chen, N.-H., Lee, C.-S., Wang, C.-W., and Yang, C.-T. (2017b). Nintedanib reduces ventilation-augmented bleomycin-induced epithelial-mesenchymal transition and lung fibrosis through suppression of the Src pathway. *J. Cell. Mol. Med.* *21*, 2937–2949.
- Li, T., Morgan, M.J., Choksi, S., Zhang, Y., Kim, Y.-S., and Liu, Z. (2010). MicroRNAs modulate the noncanonical NF- κ B pathway by regulating IKK α expression during macrophage differentiation. *Nat. Immunol.* *11*, 799–805.
- Liegeois, M., Legrand, C., Desmet, C.J., Marichal, T., and Bureau, F. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell. Immunol.* *330*, 91–96.
- Litsiou, E., Semitekolou, M., Galani, I.E., Morianos, I., Tsoutsas, A., Kara, P., Rontogianni, D., Bellenis, I., Konstantinou, M., Potaris, K., et al. (2013). CXCL13 Production in B Cells via Toll-like Receptor/Lymphotoxin Receptor Signaling Is Involved in Lymphoid Neogenesis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *187*, 1194–1202.
- Liu, F., Mih, J.D., Shea, B.S., Kho, A.T., Sharif, A.S., Tager, A.M., and Tschumperlin, D.J. (2010). Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *J. Cell Biol.* *190*, 693–706.
- Liu, H., Jakubzick, C., Osterburg, A.R., Nelson, R.L., Gupta, N., McCormack, F.X., and Borchers, M.T. (2017a). Dendritic Cell Trafficking and Function in Rare Lung Diseases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *57*, 393–402.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017b). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* *2*, 17023.
- Luzina, I.G., Tsybalyuk, N., Choi, J., Hasday, J.D., and Atamas, S.P. (2006a). CCL18-stimulated upregulation of collagen production in lung fibroblasts requires Sp1 signaling and basal Smad3 activity. *J. Cell. Physiol.* *206*, 221–228.
- Luzina, I.G., Highsmith, K., Pochetuhin, K., Nacu, N., Rao, J.N., and Atamas, S.P. (2006b). PKC α Mediates CCL18-Stimulated Collagen Production in Pulmonary Fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *35*, 298–305.
- Luzina, I.G., Papadimitriou, J.C., Anderson, R., Pochetuhin, K., and Atamas, S.P. (2006c). Induction of prolonged infiltration of T lymphocytes and transient T lymphocyte-dependent collagen deposition in mouse lungs following adenoviral gene transfer of CCL18. *Arthritis Rheum.* *54*, 2643–2655.
- Luzina, I.G., Todd, N.W., Nacu, N., Locketell, V., Choi, J., Hummers, L.K., and Atamas, S.P. (2009). Regulation of pulmonary inflammation and fibrosis through expression of integrins α V β 3 and α V β 5 on pulmonary T lymphocytes. *Arthritis Rheum.* *60*, 1530–1539.

- Macías-Barragán, J. (2010). The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets. *Tissue Repair* 11.
- Maher, T.M., and Strek, M.E. (2019). Antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: time to treat. *Respir. Res.* 20.
- Mantovani, A., Gray, P.A., Damme, J.V., and Sozzani, S. (2000). Macrophage-derived chemokine (MDC). *J. Leukoc. Biol.* 68, 400–404.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Mantovani, Alberto, Sica, Antonio, and Locati, M. (2005). Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* 23, 344–346.
- Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Valeyre, D., Soumelis, V., Crestani, B., and Soler, P. (2006). Cutting Edge: Nonproliferating Mature Immune Cells Form a Novel Type of Organized Lymphoid Structure in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Immunol.* 176, 5735–5739.
- Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Kambouchner, M., Valeyre, D., Crestani, B., and Soler, P. (2007). Dendritic Cells Accumulate in Human Fibrotic Interstitial Lung Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 1007–1014.
- Margaritopoulos, G.A., Lasithiotaki, I., and Antoniou, K.M. (2017). Toll-like receptors and autophagy in interstitial lung diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 808, 28–34.
- Marmai, C., Sutherland, R.E., Kim, K.K., Dolganov, G.M., Fang, X., Kim, S.S., Jiang, S., Golden, J.A., Hoopes, C.W., Matthay, M.A., et al. (2011). Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 301, L71–L78.
- Martinet, Y., Rom, W.N., Grotendorst, G.R., Martin, G.R., and Crystal, R.G. (1987). Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 317, 202–209.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6.
- Martinez, F.J., Collard, H.R., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J.J., Taniguchi, H., and Wells, A.U. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17074.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 453–461.

- Martinez, J.A., King, T.E., Brown, K., Jennings, C.A., Borish, L., Mortenson, R.L., Khan, T.Z., Bost, T.W., and Riches, D.W. (1997). Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Am. J. Physiol.* 273, L676-683.
- Mazzei, M.E., Richeldi, L., and Collard, H.R. (2015). Nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 9, 121–129.
- McCormick, S.M., and Heller, N.M. (2015). Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine* 75, 38–50.
- Mechnikov, I.I. (1988). Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev. Infect. Dis.* 10, 223–227.
- Mi, S., Li, Z., Yang, H.-Z., Liu, H., Wang, J.-P., Ma, Y.-G., Wang, X.-X., Liu, H.-Z., Sun, W., and Hu, Z.-W. (2011). Blocking IL-17A Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis Via TGF- β 1-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Immunol.* 187, 3003–3014.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166–6173.
- Moeller, A., Gilpin, S.E., Ask, K., Cox, G., Cook, D., Gauldie, J., Margetts, P.J., Farkas, L., Dobranowski, J., Boylan, C., et al. (2009). Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 588–594.
- Molyneaux, P.L., Cox, M.J., Willis-Owen, S.A.G., Mallia, P., Russell, K.E., Russell, A.-M., Murphy, E., Johnston, S.L., Schwartz, D.A., Wells, A.U., et al. (2014). The Role of Bacteria in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 906–913.
- Moore, B.B., Fry, C., Zhou, Y., Murray, S., Han, M.K., Martinez, F.J., Flaherty, K.R., and The COMET Investigators (2014). Inflammatory leukocyte phenotypes correlate with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Front. Med.* 1.
- Morales-Nebreda, L., Misharin, A.V., Perlman, H., and Budinger, G.R.S. (2015). The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur. Respir. Rev.* 24, 505–509.
- Moreira, A.P., Cavassani, K.A., Hullinger, R., Rosada, R.S., Fong, D.J., Murray, L., Hesson, D.P., and Hogaboam, C.M. (2010). Serum amyloid P attenuates M2 macrophage activation and protects against fungal spore-induced allergic airway disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 712-721.e7.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989a). Heterogeneity of Cytokine Secretion Patterns and Functions of Helper T Cells. In *Advances in Immunology*, F.J. Dixon, ed. (Academic Press), pp. 111–147.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989b). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173.

- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* *136*, 2348–2357.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 209–212.
- Moyron-Quiroz, J., Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., and Randall, T.D. (2007). The function of local lymphoid tissues in pulmonary immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* *590*, 55–68.
- Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* *10*, 927–934.
- Mueller, T.D., Zhang, J.-L., Sebald, W., and Duschl, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1592*, 237–250.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J.D., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. (1999). A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin $\alpha\beta6$ Binds and Activates Latent TGF $\beta1$. *Cell* *96*, 319–328.
- Murray, L.A., Chen, Q., Kramer, M.S., Hesson, D.P., Argentieri, R.L., Peng, X., Gulati, M., Homer, R.J., Russell, T., van Rooijen, N., et al. (2011). TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 154–162.
- Nabhan, A.N., Brownfield, D.G., Harbury, P.B., Krasnow, M.A., and Desai, T.J. (2018). Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science* *359*, 1118–1123.
- Naccache, J.-M., Montil, M., Cadranel, J., Cachanado, M., Cottin, V., Crestani, B., Valeyre, D., Wallaert, B., Simon, T., and Nunes, H. (2019). Study protocol: exploring the efficacy of cyclophosphamide added to corticosteroids for treating acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis; a randomized double-blind, placebo-controlled, multi-center phase III trial (EXAFIP). *BMC Pulm. Med.* *19*.
- Nadiminty, N., Lou, W., Lee, S.O., Lin, X., Trump, D.L., and Gao, A.C. (2006). Stat3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7264–7269.
- Nakagome, K. (2006). In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF- in the lung. *Thorax* *61*, 886–894.
- Nathan, S.D., Shlobin, O.A., Ahmad, S., Burton, N.A., Barnett, S.D., and Edwards, E. (2010). Comparison of wait times and mortality for idiopathic pulmonary fibrosis patients listed for single or bilateral lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *29*, 1165–1171.

Nho, R.S., Peterson, M., Hergert, P., and Henke, C.A. (2013). FoxO3a (Forkhead Box O3a) Deficiency Protects Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) Fibroblasts from Type I Polymerized Collagen Matrix-Induced Apoptosis via Caveolin-1 (cav-1) and Fas. *PLOS ONE* 8, e61017.

Noble, P.W., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Glassberg, M.K., Kardatzke, D., King, T.E., Lancaster, L., Sahn, S.A., Szwarberg, J., et al. (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *The Lancet* 377, 1760–1769.

Noskovičová, N., Petřek, M., Eickelberg, O., and Heinzemann, K. (2015). Platelet-Derived Growth Factor Signaling in the Lung. From Lung Development and Disease to Clinical Studies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 263–284.

Noth, I., Zhang, Y., Ma, S.-F., Flores, C., Barber, M., Huang, Y., Broderick, S.M., Wade, M.S., Hysi, P., Scurba, J., et al. (2013). Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir. Med.* 1, 309–317.

Obayashi, Y., Yamadori, I., Fujita, J., Yoshinouchi, T., Ueda, N., and Takahara, J. (1997). The Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 112, 1338–1343.

O'Dwyer, D.N., Armstrong, M.E., Trujillo, G., Cooke, G., Keane, M.P., Fallon, P.G., Simpson, A.J., Millar, A.B., McGrath, E.E., Whyte, M.K., et al. (2013). The Toll-like Receptor 3 L412F Polymorphism and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 1442–1450.

Ogura, T., Taniguchi, H., Azuma, A., Inoue, Y., Kondoh, Y., Hasegawa, Y., Bando, M., Abe, S., Mochizuki, Y., Chida, K., et al. (2015). Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 1382–1392.

Okigaki, M., Davis, C., Falasca, M., Harroch, S., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., and Schlessinger, J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10740–10745.

Osterholzer, J.J., Olszewski, M.A., Murdock, B.J., Chen, G.-H., Erb-Downward, J.R., Subbotina, N., Browning, K., Lin, Y., Morey, R.E., Dayrit, J.K., et al. (2013). Implicating Exudate Macrophages and Ly-6Chigh Monocytes in CCR2-Dependent Lung Fibrosis following Gene-Targeted Alveolar Injury. *J. Immunol.* 190, 3447–3457.

Pal, S., Bhattacharjee, A., Ali, A., Mandal, N.C., Mandal, S.C., and Pal, M. (2014). Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 11, 23.

Pandit, K.V., Corcoran, D., Yousef, H., Yarlagadda, M., Tzouveleakis, A., Gibson, K.F., Konishi, K., Yousem, S.A., Singh, M., Handley, D., et al. (2010). Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 220–229.

Papiris, S.A., Kagouridis, K., Kolilekas, L., Papaioannou, A.I., Roussou, A., Triantafillidou, C., Baou, K., Malagari, K., Argentos, S., Kotanidou, A., et al. (2015). Survival in Idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations: the non-steroid approach. *BMC Pulm. Med.* 15.

- Parameswaran, N., and Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *20*, 87–103.
- Parker, J.M., Glaspole, I.N., Lancaster, L.H., Haddad, T.J., She, D., Roseti, S.L., Fiening, J.P., Grant, E.P., Kell, C.M., and Flaherty, K.R. (2017). A Phase 2 Randomized Controlled Study of Tralokinumab in Subjects with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *197*, 94–103.
- Parsamanesh, N., Moossavi, M., Bahrami, A., Fereidouni, M., Barreto, G., and Sahebkar, A. (2019). NLRP3 inflammasome as a treatment target in atherosclerosis: A focus on statin therapy. *Int. Immunopharmacol.* *73*, 146–155.
- Peljto, A.L., Zhang, Y., Fingerlin, T.E., Ma, S.-F., Garcia, J.G.N., Richards, T.J., Silveira, L.J., Lindell, K.O., Steele, M.P., Loyd, J.E., et al. (2013). Association Between the MUC5B Promoter Polymorphism and Survival in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *JAMA* *309*, 2232–2239.
- Perrier, P., Martinez, F.O., Locati, M., Bianchi, G., Nebuloni, M., Vago, G., Bazzoni, F., Sozzani, S., Allavena, P., and Mantovani, A. (2004). Distinct Transcriptional Programs Activated by Interleukin-10 with or without Lipopolysaccharide in Dendritic Cells: Induction of the B Cell-Activating Chemokine, CXC Chemokine Ligand 13. *J. Immunol.* *172*, 7031–7042.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2004). Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J. Clin. Invest.* *114*, 438–446.
- Pignatti, P., Brunetti, G., Moretto, D., Yacoub, M.-R., Fiori, M., Balbi, B., Balestrino, A., Cervio, G., Nava, S., and Moscato, G. (2006). Role of the Chemokine Receptors CXCR3 and CCR4 in Human Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 310–317.
- Ping, L., Ding, N., Shi, Y., Feng, L., Li, J., Liu, Y., Lin, Y., Shi, C., Wang, X., Pan, Z., et al. (2017). The Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib exerts immunomodulatory effects through regulation of tumor-infiltrating macrophages. *Oncotarget* *8*, 39218–39229.
- Pixley, F.J., and Stanley, E.R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol.* *14*, 628–638.
- Pochetuhén, K., Luzina, I.G., Lockatell, V., Choi, J., Todd, N.W., and Atamas, S.P. (2007). Complex Regulation of Pulmonary Inflammation and Fibrosis by CCL18. *Am. J. Pathol.* *171*, 428–437.
- Pourgholamhossein, F., Rasooli, R., Pournamdari, M., Pourgholi, L., Samareh-Fekri, M., Ghazi-Khansari, M., Iranpour, M., Poursalehi, H.-R., Heidari, M.-R., and Mandegary, A. (2018). Pirfenidone protects against paraquat-induced lung injury and fibrosis in mice by modulation of inflammation, oxidative stress, and gene expression. *Food Chem. Toxicol.* *112*, 39–46.
- Prasse, A., Pechkovsky, D.V., Toews, G.B., Jungraithmayr, W., Kollert, F., Goldmann, T., Vollmer, E., Müller-Quernheim, J., and Zissel, G. (2006). A Vicious Circle of Alveolar

Macrophages and Fibroblasts Perpetuates Pulmonary Fibrosis via CCL18. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 781–792.

Prasse, A., Probst, C., Bargagli, E., Zissel, G., Toews, G.B., Flaherty, K.R., Olschewski, M., Rottoli, P., and Müller-Quernheim, J. (2009). Serum CC-Chemokine Ligand 18 Concentration Predicts Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 717–723.

Pulkkinen, V., Bruce, S., Rintahaka, J., Hodgson, U., Laitinen, T., Alenius, H., Kinnula, V.L., Myllärniemi, M., Matikainen, S., and Kere, J. (2009). ELMOD2, a candidate gene for idiopathic pulmonary fibrosis, regulates antiviral responses. *FASEB J.* 24, 1167–1177.

Puttur, F., Gregory, L.G., and Lloyd, C.M. (2019). Airway macrophages as the guardians of tissue repair in the lung. *Immunol. Cell Biol.* 97, 246–257.

Rabinovich, E.I., Kapetanaki, M.G., Steinfeld, I., Gibson, K.F., Pandit, K.V., Yu, G., Yakhini, Z., and Kaminski, N. (2012). Global Methylation Patterns in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* 7, e33770.

Raghu, G., and Meyer, K.C. (2012). Silent gastro-oesophageal reflux and microaspiration in IPF: mounting evidence for anti-reflux therapy? *Eur. Respir. J.* 39, 242–245.

Raghu, G., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., du Bois, R.M., Lasky, J.A., Thomeer, M., Utz, J.P., Khandker, R.K., McDermott, L., et al. (2008). Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 948–955.

Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.-F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., et al. (2011). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 788–824.

Raghu, G., Chen, S.-Y., Yeh, W.-S., Maroni, B., Li, Q., Lee, Y.-C., and Collard, H.R. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11. *Lancet Respir. Med.* 2, 566–572.

Raghu, G., Martinez, F.J., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., Wells, A.U., Lancaster, L., Gibson, K.F., Haddad, T., Agarwal, P., et al. (2015). CC-chemokine ligand 2 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis: a phase 2 trial of carlumab. *Eur. Respir. J.* 46, 1740–1750.

Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J.L., Richeldi, L., Ryerson, C.J., Lederer, D.J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S.K., Morell, F., et al. (2018a). Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, e44–e68.

Raghu, G., van den Blink, B., Hamblin, M.J., Brown, A.W., Golden, J.A., Ho, L.A., Wijsenbeek, M.S., Vasakova, M., Pesci, A., Antin-Ozerkis, D.E., et al. (2018b). Effect of Recombinant Human Pentraxin 2 vs Placebo on Change in Forced Vital Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *JAMA* 319, 2299–2307.

Raghu, G., Pellegrini, C.A., Yow, E., Flaherty, K.R., Meyer, K., Noth, I., Scholand, M.B., Cello, J., Ho, L.A., Pipavath, S., et al. (2018c). Laparoscopic anti-reflux surgery for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (WRAP-IPF): a multicentre, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Respir. Med.* *6*, 707–714.

Raica, M., and Cimpean, A.M. (2010). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals* *3*, 572–599.

Réb e, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Pr evotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., et al. (2007). Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* *109*, 1442–1450.

Redente, E.F., Keith, R.C., Janssen, W., Henson, P.M., Ortiz, L.A., Downey, G.P., Bratton, D.L., and Riches, D.W.H. (2014). Tumor Necrosis Factor- α Accelerates the Resolution of Established Pulmonary Fibrosis in Mice by Targeting Profibrotic Lung Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *50*, 825–837.

Reilkoff, R.A., Bucala, R., and Herzog, E.L. (2011). Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 427–435.

Reilkoff, R.A., Peng, H., Murray, L.A., Peng, X., Russell, T., Montgomery, R., Feghali-Bostwick, C., Shaw, A., Homer, R.J., Gulati, M., et al. (2013). Semaphorin 7a+ Regulatory T Cells Are Associated with Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Are Implicated in Transforming Growth Factor- β 1-induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *187*, 180–188.

Richards, T.J., Kaminski, N., Baribaud, F., Flavin, S., Brodmerkel, C., Horowitz, D., Li, K., Choi, J., Vuga, L.J., Lindell, K.O., et al. (2012). Peripheral Blood Proteins Predict Mortality in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*

Richeldi, L., Costabel, U., Selman, M., Kim, D.S., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Brown, K.K., Flaherty, K.R., Noble, P.W., Raghu, G., et al. (2011). Efficacy of a Tyrosine Kinase Inhibitor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

Richeldi, L., Cottin, V., Flaherty, K.R., Kolb, M., Inoue, Y., Raghu, G., Taniguchi, H., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Le Maulf, F., et al. (2014a). Design of the INPULSISTM trials: two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.* *108*, 1023–1030.

Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K.R., Hansell, D.M., Inoue, Y., et al. (2014b). Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* *370*, 2071–2082.

Roth, G.J., Binder, R., Colbatzky, F., Dallinger, C., Schlenker-Herceg, R., Hilberg, F., Wollin, S.-L., and Kaiser, R. (2015). Nintedanib: From Discovery to the Clinic. *J. Med. Chem.* *58*, 1053–1063.

- Roy, B., Bhattacharjee, A., Xu, B., Ford, D., Maizel, A.L., and Cathcart, M.K. (2002). IL-13 signal transduction in human monocytes: phosphorylation of receptor components, association with Jaks, and phosphorylation/activation of Stats. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 580–589.
- Ruspi, G., Schmidt, E.M., McCann, F., Feldmann, M., Williams, R.O., Stoop, A.A., and Dean, J.L.E. (2014). TNFR2 increases the sensitivity of ligand-induced activation of the p38 MAPK and NF- κ B pathways and signals TRAF2 protein degradation in macrophages. *Cell. Signal.* *26*, 683–690.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 331–344.
- Saito, A., Okazaki, H., Sugawara, I., Yamamoto, K., and Takizawa, H. (2003). Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *132*, 168–176.
- Salton, F., Volpe, M.C., and Confalonieri, M. (2019). Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Mex.)* *55*.
- Sampaio, N.G., Yu, W., Cox, D., Wyckoff, J., Condeelis, J., Stanley, E.R., and Pixley, F.J. (2011). Phosphorylation of CSF-1R Y721 mediates its association with PI3K to regulate macrophage motility and enhancement of tumor cell invasion. *J. Cell Sci.* *124*, 2021–2031.
- Sanders, Y.Y., Tollefsbol, T.O., Varisco, B.M., and Hagood, J.S. (2011). Epigenetic regulation of thy-1 by histone deacetylase inhibitor in rat lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 16–23.
- Sato, S., Shinohara, S., Hayashi, S., Morizumi, S., Abe, S., Okazaki, H., Chen, Y., Goto, H., Aono, Y., Ogawa, H., et al. (2017). Anti-fibrotic efficacy of nintedanib in pulmonary fibrosis via the inhibition of fibrocyte activity. *Respir. Res.* *18*, 172.
- Schmidt, N.W., Thieu, V.T., Mann, B.A., Ahyi, A.-N.N., and Kaplan, M.H. (2006). Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR-Induced IL-10 Production. *J. Immunol.* *177*, 7203–7210.
- Schneider, C., Nobs, S.P., Kurrer, M., Rehrauer, H., Thiele, C., and Kopf, M. (2014). Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat. Immunol.* *15*, 1026–1037.
- Schupp, J.C., Binder, H., Jäger, B., Cillis, G., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., and Prasse, A. (2015). Macrophage Activation in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* *10*, e0116775.
- Scott, C.L., Henri, S., and Guillems, M. (2014). Mononuclear phagocytes of the intestine, the skin, and the lung. *Immunol. Rev.* *262*, 9–24.
- Seibold, M.A., Wise, A.L., Speer, M.C., Steele, M.P., Brown, K.K., Loyd, J.E., Fingerlin, T.E., Zhang, W., Gudmundsson, G., Groshong, S.D., et al. (2011). A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1503–1512.

- Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., Segura, L., Ramírez, R., Barrios, R., and Pardo, A. (2000). TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L562–L574.
- Selman, M., King, T.E., Pardo, A., American Thoracic Society, European Respiratory Society, and American College of Chest Physicians (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 134, 136–151.
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., and Richeldi, L. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir. Res.* 19.
- Shamskhou, E.A., Kratochvil, M.J., Orcholski, M.E., Nagy, N., Kaber, G., Steen, E., Balaji, S., Yuan, K., Keswani, S., Danielson, B., et al. (2019). Hydrogel-based delivery of IL-10 improves treatment of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Biomaterials* 203, 52–62.
- Shinoda, H., Tasaka, S., Fujishima, S., Yamasawa, W., Miyamoto, K., Nakano, Y., Kamata, H., Hasegawa, N., and Ishizaka, A. (2009). Elevated CC Chemokine Level in Bronchoalveolar Lavage Fluid Is Predictive of a Poor Outcome of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiration* 78, 285–292.
- Spagnolo, P., Tzouvelekis, A., and Bonella, F. (2018). The Management of Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* 5, 148.
- Sprangers, S., de Vries, T.J., and Everts, V. (2016). Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J. Immunol. Res.* 2016, 1475435.
- Stahl, M., Schupp, J., Jäger, B., Schmid, M., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., and Prasse, A. (2013). Lung Collagens Perpetuate Pulmonary Fibrosis via CD204 and M2 Macrophage Activation. *PLoS ONE* 8, e81382.
- Stanley, E.R., and Chitu, V. (2014). CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a021857.
- Staples, K.J., Smallie, T., Williams, L.M., Foey, A., Burke, B., Foxwell, B.M.J., and Ziegler-Heitbrock, L. (2007). IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 4779–4785.
- Strieter, R.M., Keeley, E.C., Burdick, M.D., and Mehrad, B. (2009). The role of circulating mesenchymal progenitor cells, fibrocytes, in promoting pulmonary fibrosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 120, 49–59.
- Suga, H., Rennert, R.C., Rodrigues, M., Sorkin, M., Glotzbach, J.P., Januszyk, M., Fujiwara, T., Longaker, M.T., and Gurtner, G.C. (2014). Tracking the elusive fibrocyte: Identification and characterization of collagen producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1347–1360.
- Suga, M., Iyonaga, K., Ichiyasu, H., Saita, N., Yamasaki, H., and Ando, M. (1999). Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur. Respir. J.* 14, 376–382.

- Suganuma, H., Sato, A., Tamura, R., and Chida, K. (1995). Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax* 50, 984–989.
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 21, 71–85.
- Sun, L., Louie, M.C., Vannella, K.M., Wilke, C.A., LeVine, A.M., Moore, B.B., and Shanley, T.P. (2011). New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 300, L341–L353.
- Swanson, K.V., Deng, M., and Ting, J.P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 477–489.
- Takeda, K., and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9.
- Tanaka, T., Yoshimi, M., Maeyama, T., Hagimoto, N., Kuwano, K., and Hara, N. (2002). Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur. Respir. J.* 20, 359–368.
- Tanjore, H., Blackwell, T.S., and Lawson, W.E. (2012). Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L721–L729.
- Taskar, V., and Coultas, D. (2008). Exposures and idiopathic lung disease. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 29, 670–679.
- Taskar, V.S., and Coultas, D.B. (2006). Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 293–298.
- Thabut, G., Mal, H., Castier, Y., Groussard, O., Brugière, O., Marrash-Chahla, R., Lesèche, G., and Fournier, M. (2003). Survival benefit of lung transplantation for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126, 469–475.
- Thannickal, V.J. (2006). Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 350–356.
- Tian, R., Zhu, Y., Yao, J., Meng, X., Wang, J., Xie, H., and Wang, R. (2017). NLRP3 participates in the regulation of EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp. Cell Res.* 357, 328–334.
- Tian, Y., Li, H., Qiu, T., Dai, J., Zhang, Y., Chen, J., and Cai, H. (2019). Loss of PTEN induces lung fibrosis via alveolar epithelial cell senescence depending on NF- κ B activation. *Aging Cell* 18, e12858.
- Todd, E.M., Zhou, J.Y., Szasz, T.P., Deady, L.E., D'Angelo, J.A., Cheung, M.D., Kim, A.H.J., and Morley, S.C. (2016). Alveolar macrophage development in mice requires L-plastin for cellular localization in alveoli. *Blood* 128, 2785–2796.
- Todd, N., Scheraga, Galvin, Iacono, Britt, Luzina, Burke, and Atamas (2013). Lymphocyte aggregates persist and accumulate in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Inflamm. Res.* 63.

- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 349.
- Tomos, I.P., Tzouvelekis, A., Aidinis, V., Manali, E.D., Bouros, E., Bouros, D., and Papiris, S.A. (2017). Extracellular matrix remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis. It is the ‘bed’ that counts and not ‘the sleepers.’ *Expert Rev. Respir. Med.* *11*, 299–309.
- Tsoumakidou, M., Karagiannis, K.P., Bouloukaki, I., Zakyntinos, S., Tzanakis, N., and Siafakas, N.M. (2009). Increased bronchoalveolar lavage fluid CD1c expressing dendritic cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* *78*, 446–452.
- Tugal, D., Liao, X., and Jain, M.K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1135–1144.
- Uhal, B.D., Joshi, I., Hughes, W.F., Ramos, C., Pardo, A., and Selman, M. (1998). Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *275*, L1192–L1199.
- Upagupta, C., Shimbori, C., Alsilmi, R., and Kolb, M. (2018). Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* *27*, 180033.
- Vainshelboim, B., Fox, B.D., Oliveira, J., and Kramer, M.R. (2016). Exercise training in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* *10*, 69–77.
- Valapour, M., Skeans, M.A., Heubner, B.M., Smith, J.M., Hertz, M.I., Edwards, L.B., Cherikh, W.S., Callahan, E.R., Snyder, J.J., Israni, A.K., et al. (2015). OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: Lung. *Am. J. Transplant.* *15*, 1–28.
- Valeyre, D., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., King, T.E., Leff, J.A., Noble, P.W., Sahn, S.A., and Bois, R.M. du (2014). Comprehensive assessment of the long-term safety of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* *19*, 740–747.
- Varma, S., Mahavadi, P., Sasikumar, S., Cushing, L., Hyland, T., Rosser, A.E., Riccardi, D., Lu, J., Kalin, T.V., Kalinichenko, V.V., et al. (2013). Grainyhead-like 2 (GRHL2) distribution reveals novel pathophysiological differences between human idiopathic pulmonary fibrosis and mouse models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *306*, L405–L419.
- Varone, F., Sgalla, G., Iovene, B., Bruni, T., and Richeldi, L. (2018). Nintedanib for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin. Pharmacother.* *19*, 167–175.
- Vaure, C., and Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front. Immunol.* *5*.
- Vital, R., Horowitz, J.C., Moore, B.B., Zhang, H., Martinez, F.J., Toews, G.B., Standiford, T.J., and Thannickal, V.J. (2005). Modulation of Prosurvival Signaling in Fibroblasts by a Protein Kinase Inhibitor Protects against Fibrotic Tissue Injury. *Am. J. Pathol.* *166*, 367–375.
- Vuga, L.J., Tedrow, J.R., Pandit, K.V., Tan, J., Kass, D.J., Xue, J., Chandra, D., Leader, J.K., Gibson, K.F., Kaminski, N., et al. (2014). C-X-C Motif Chemokine 13 (CXCL13) Is a

Prognostic Biomarker of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 966–974.

Wallach-Dayana, S.B., Izbicki, G., Cohen, P.Y., Gerstl-Golan, R., Fine, A., and Breuer, R. (2006). Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L790–L796.

Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., and Borok, Z. (2005). Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 166, 1321–1332.

Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J. Exp. Med.* 207, 535–552.

Wind, S., Schmid, U., Freiwald, M., Marzin, K., Lotz, R., Ebner, T., Stopfer, P., and Dallinger, C. (2019). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin. Pharmacokinet.*

Winters, N.I., Burman, A., Kropski, J.A., and Blackwell, T.S. (2019). Epithelial Injury and Dysfunction in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Med. Sci.* 357, 374–378.

Wipff, P.-J., Rifkin, D.B., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 179, 1311–1323.

Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V., Holweg, A., and Ryffel, B. (2014). Antifibrotic and Anti-inflammatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 209–220.

Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., Schnapp, G., Hostettler, K.E., Stowasser, S., and Kolb, M. (2015). Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 1434–1445.

Wolters, P.J., Collard, H.R., and Jones, K.D. (2014). Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 157–179.

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57.

Wynn, T.A. (2004). FIBROTIC DISEASE AND THE TH1/TH2 PARADIGM. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 583–594.

Xaubet, A., Agustí, C., Luburich, P., Barberá, J.A., Carrión, M., Ayuso, M.C., Roca, J., and Rodríguez-Roisin, R. (1998). Interleukin-8 expression in bronchoalveolar lavage cells in the evaluation of alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.* 92, 338–344.

Xia, H., Nho, R.S., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C.A. (2004). Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in

Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a $\beta 1$ Integrin Viability Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 33024–33034.

Xue, J., Kass, D.J., Bon, J., Vuga, L., Tan, J., Csizmadia, E., Otterbein, L., Soejima, M., Levesque, M.C., Gibson, K.F., et al. (2013). Plasma B Lymphocyte Stimulator and B Cell Differentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *J. Immunol.* 191, 2089–2095.

Yadava, K., Bollyky, P., and Lawson, M.A. (2016). The formation and function of tertiary lymphoid follicles in chronic pulmonary inflammation. *Immunology* 149, 262–269.

Yamaguchi, M., Hirai, S., Tanaka, Y., Sumi, T., Miyajima, M., Mishina, T., Yamada, G., Otsuka, M., Hasegawa, T., Kojima, T., et al. (2017). Fibroblastic foci, covered with alveolar epithelia exhibiting epithelial–mesenchymal transition, destroy alveolar septa by disrupting blood flow in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lab. Invest.* 97, 232–242.

Yamashita, C.M., Dolgonos, L., Zemans, R.L., Young, S.K., Robertson, J., Briones, N., Suzuki, T., Campbell, M.N., Gauldie, J., Radisky, D.C., et al. (2011). Matrix Metalloproteinase 3 Is a Mediator of Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 179, 1733–1745.

Yang, I.V., and Schwartz, D.A. (2015). Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl. Res.* 165, 48–60.

Yang, I.V., Pedersen, B.S., Rabinovich, E., Hennessy, C.E., Davidson, E.J., Murphy, E., Guardela, B.J., Tedrow, J.R., Zhang, Y., Singh, M.K., et al. (2014). Relationship of DNA methylation and gene expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 1263–1272.

Yang, L., Wang, Y., Pan, Z., Gao, S., Zou, B., Lin, Z., Feng, D., HuangFu, C., and Liu, G. (2018). Tetraspanin 1 inhibits TNF α -induced apoptosis via NF- κ B signaling pathway in alveolar epithelial cells. *Inflamm. Res.* 67, 951–964.

Yogo, Y., Fujishima, S., Inoue, T., Saito, F., Shiomi, T., Yamaguchi, K., and Ishizaka, A. (2009). Macrophage derived chemokine (CCL22), thymus and activation-regulated chemokine (CCL17), and CCR4 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 10, 80.

Yoshida, M., Sakatani, M., Yamamoto, S., Matsumoto, N., Kaneda, Y., and Kishimoto, T. (1995). A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor 131, or platelet-derived growth factor B gene. *Med. Sci.* 5.

Yu, L.J., Wang, B., Parobchak, N., Roche, N., and Rosen, T. (2015). STAT3 cooperates with the non-canonical NF- κ B signaling to regulate pro-labor genes in the human placenta. *Placenta* 36, 581–586.

Yu, Y.-R.A., Hotten, D.F., Malakhau, Y., Volker, E., Ghio, A.J., Noble, P.W., Kraft, M., Hollingsworth, J.W., Gunn, M.D., and Tighe, R.M. (2016). Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 13–24.

Yusen, R.D., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Benden, C., Dipchand, A.I., Dobbels, F., Goldfarb, S.B., Levvey, B.J., Lund, L.H., Meiser, B., et al. (2014). The registry of the

International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 33, 1009–1024.

Zhang, H.Y., and Phan, S.H. (1999). Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 658–665.

Zhang, Y., Noth, I., Garcia, J.G.N., and Kaminski, N. (2011). A Variant in the Promoter of MUC5B and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 364, 1576–1577.

Zhang-Hoover, J., Sutton, A., and Stein-Streilein, J. (2001). CD40/CD40 Ligand Interactions Are Critical for Elicitation of Autoimmune-Mediated Fibrosis in the Lung. *J. Immunol.* 166, 3556–3563.

Ziora, D., Jastrzębski, D., Adamek, M., Czuba, Z., J., J.K., Grzanka, A., and Kasperska-Zajac, A. (2015). Circulating concentration of markers of angiogenic activity in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm. Med.* 15.

Zuo, F., Kaminski, N., Eugui, E., Allard, J., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Lollini, L., Morris, D., Kim, Y., DeLustro, B., et al. (2002). Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6292–6297.

ofev-epar-public-assessment-report_en.pdf

Nessrine BELLAMRI

9 Boulevard Jeanne d'ARC, 35000, Rennes

bellamri.nessrine@gmail.com

Diplômes

- **Docteur en Sciences Pharmaceutiques**, Université de Rennes 1, France (Oct 2016– Sep 2019).
Intitulé de la thèse: Le macrophage humain dans la fibrose pulmonaire idiopathique : effet de l'antifibrotique Nintedanib et expression du biomarqueur CXCL13.
Directeur de thèse: Professeur Laurent VERNHET
Co-directeur de thèse: Professeur Stéphane JOUINEAU
- **Master 2 Sciences cellulaires et moléculaires du vivant**, Université de Rennes 1, France (Sep 2015 – Juin 2016).
Intitulé du stage: Caractérisation de la lignée épithéliale bronchique pulmonaire BEAS-2B exposée chroniquement aux particules Diesel.
Maitre de stage: Professeur Laurent VERNHET
- **Master 1 Sciences cellulaires et moléculaires du vivant**, Université de Rennes 1, France (Sep 2014 – Juin 2015).
Intitulé du stage: Récepteur d'œstrogène et co-activateurs.
Maitre de stage: Professeur Thierry CHARLIER.
- **Docteur en Pharmacie**, Université d'Alger -Département de Pharmacie (Sept 2008 – Juin 2014)

Expériences professionnelles

- **Enseignant-chercheur contractuel**. Université de Rennes 1, France (Octobre 2019-Aout 2020)
- **Enseignement en Biochimie**. Université de Rennes 1, France (Sep 2019- Août 2019)
- **Encadrement des étudiants en Master « Biologie Santé »**. Université de Rennes 1, France (Jan 2019-Fev 2019)
- **Enseignement en Toxicologie**. UFR Pharmacie, Université de Rennes 1, France (Sep 2019- Août 2019)
- **Encadrement d'étudiant en Master 1 « Sciences cellulaires et moléculaires du vivant »**. Université de Rennes 1, France (Avr 2018-Mai 2018)
- **Encadrement des étudiants en Master « Biologie Santé »**. Université de Rennes 1, France (Jan 2018-Fev 2018)
- **Enseignement en Immunologie**. Université de Rennes 1, France (Sep 2018- Août 2018)
- **Encadrement des étudiants en Master « Biologie Santé »**. Université de Rennes 1, France (Jan 2017-Fev 2017)
- **Pharmacien**. Alger (Juin 2015- Août 2015)

- **Pharmacien.** Alger (Juil 2014-Sep 2014)

Compétences techniques

- Culture cellulaire: Macrophage humain, Macrophage alvéolaire, Monocyte, isolement de LB et lignée épithéliale bronchique pulmonaire BEAS-2B
- Migration cellulaire
- Transfection cellulaire (siRNA)
- Extraction d'ARNm (Trizol, Nucleospin)
- RT-PCR et Q-PCR
- Immunofluorescence
- Western blot
- ELISA
- Cytométrie en flux

Autres compétences

- Rédaction d'article scientifique
- Langues: Français et Anglais

Distinctions et prix

- **Prix de la meilleure communication orale.** 9ème journée recherche 2019. 16 Janvier 2019. Rennes, France.

Publications

- **Bellamri N**, Viel R, Morzadec C, Joannes A, De Latour B, Llamas-Gutierrez F, Vernhet L, and Jouneau S. TNF- α and IL-10 control macrophage expression of human CXCL13, a prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. (En revision à Journal of Immunology)
- **Bellamri N**, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Wollin L, Jouneau S, Vernhet L. Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. Int Immunopharmacol. 2019 PMID: 30974282
- **Bellamri N**, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L. Arsenic and the immune system. Current Opinion in Toxicology 2018, 10:60–68
- Savary C, **Bellamri N**, Morzadec C, Langouët S, Lecureur V, Vernhet L. Long term exposure to environmental concentrations of diesel exhaust particles does not impact the phenotype of human bronchial epithelial cells. Toxicol In Vitro. 2018. PMID: 29928969

Présentation orales

- **Bellamri N**, Viel R, Morzadec C, Le Garrec M, Arnouat B, De Latour B, Llamas-Gutierrez F, Joannes A, Lecureur V, Vernhet L and Jouneau S. TNF- α and IL-10 control macrophage expression of CXCL13, a prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. Le printemps de la recherche à l'Irset. 28 Mars 2019. Rennes, France.
- **Bellamri N**, Viel R, Morzadec C, Le Garrec M, Arnouat B, De Latour B, Llamas-Gutierrez F, Joannes A, Lecureur V, Vernhet L and Jouneau S. TNF- α and IL-10 control macrophage expression of CXCL13, a prognostic biomarker of idiopathic

- pulmonary fibrosis. 9ème journée recherche 2019. 16 Janvier 2019. Rennes, France.
- **Bellamri N**, Morzadec C, Lecureur V, Joannes A, Wollin L, Jouneau S and Vernhet L. Effects of Nintedanib on the M1 and M2a polarization of human macrophages. European Respiratory Society (ERS 2018) International Congress. 19 Septembre 2018. Paris, France.
 - **Bellamri N**, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Jouneau S and Vernhet L. CXCL13 expression is induced by TNF α and IL10, and is inhibited by the anti-fibrotic drug Nintedanib (BIBF-1120), in human macrophages. Jeune chercheur de l'IRset. 11 Janvier 2018. Rennes, France.

Présentation sous format poster

- **Bellamri N**, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Jouneau S and Vernhet L. TNF- α and IL-10 control CXCL13 expression in human macrophages. Journée de recherche respiratoire. Bruxelles. 18-19 Octobre 2019.
- **Bellamri N**, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Wollin L, Jouneau S and Vernhet L. The anti-fibrotic drug Nintedanib impairs the phenotype of human macrophages. 9ème journée recherche 2019. 16 Janvier 2019. Rennes, France.
- **Bellamri N**, Viel R, Morzadec C, Le Garrec M, Arnouat B, De Latour B, Llamas-Gutierrez F, Joannes A, Lecureur V, Vernhet L and Jouneau S. TNF- α and IL-10 control macrophage expression of CXCL13, a prognostic biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. JBS-UBL, 13 Decembre 2018. Rennes, France.
- **Bellamri N**, Morzadec C, Lecureur V, Joannes A, Wollin L, Jouneau S and Vernhet L. Effects of Nintedanib on the M1 and M2a polarization of human macrophages. European Respiratory Society (ERS 2018) International Congress. 19 Septembre 2018. Paris, France
- **Bellamri N**, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Jouneau S and Vernhet L. TNF- α and IL-10 induce CXCL13 expression in human macrophages and are relevant in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). European Respiratory Society (ERS 2018) International Congress. 18 Septembre 2018. Paris, France
- **Bellamri N**, Morzadec C, Joannes A, Lecureur V, Jouneau S and Vernhet L. CXCL13 expression is induced by TNF α and IL10, and is inhibited by the anti-fibrotic drug Nintedanib (BIBF-1120), in human macrophages. 9ème journée recherche 2019. 17 Janvier 2018. Rennes, France.

Références

- Pr Laurent VERNHET, Directeur de thèse, UMR1085-IRSET. Rennes (France).
laurent.vernhet@univ-rennes1.fr
- Pr Stéphane JOUNEAU, Co-directeur de thèse, UMR1085-IRSET. Rennes (France).
Stephane.JOUNEAU@chu-rennes.fr
- Pr Olivier FARDEL, UMR1085-IRSET. Rennes (France).
olivier.fardel@univ-rennes1

Titre : Le macrophage dans la fibrose pulmonaire idiopathique: Effets du nintédanib et expression du biomarqueur pronostic CXCL13.

Mots clés : Fibrose pulmonaire idiopathique, nintédanib, macrophage, CSF-1R, CXCL13, signalisation.

Résumé : Le nintédanib (NTD), un médicament antifibrosant, ralentit le déclin de la fonction respiratoire chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Le NTD exerce ses effets antifibrosants en inhibant l'activité cellulaire de différentes protéines à tyrosine kinase. Le NTD inhibe également l'activité kinase de la protéine humaine recombinante CSF-1R. Ce récepteur, exprimé par les cellules myéloïdes, contrôle différentes fonctions du macrophage. Cellule immunitaire résidente ou différenciée à partir du monocyte, le macrophage contribue au développement de la fibrose pulmonaire en sécrétant des molécules pro-inflammatoires et pro-fibrosantes. Un premier objectif de mes travaux de thèse a été de déterminer si, en bloquant l'activité de CSF-1R, le NTD altère les propriétés *in vitro* du macrophage humain différencié à partir du monocyte circulant (MDM) par le CSF-1. Nos résultats démontrent que le NTD inhibe la phosphorylation et l'activité de CSF-1R dans le MDM, à de faibles concentrations équivalentes à celles bloquant l'activité de la protéine recombinante. En réduisant l'activité de CSF-1R, le NTD diminue l'adhérence du macrophage et l'expression de la chimiokine pro-fibrosante CCL2.

De plus, en bloquant l'activité de CSF-1R et celles d'autres cibles moléculaires, le NTD altère la polarisation des MDM en macrophages M1 et M2. Il réduit la production de diverses interleukines et chimiokines par le macrophage M1 et prévient l'expression de marqueurs membranaires par le macrophage M2. Nos résultats démontrent en particulier que le NTD réduit l'expression de CXCL13, un biomarqueur pronostique de la FPI. Cette chimiokine est exprimée dans le tissu pulmonaire mais son origine cellulaire reste incertaine. Le second objectif de mes travaux de thèse a donc été de caractériser l'expression de CXCL13 dans le macrophage pulmonaire. Nos résultats démontrent que CXCL13 est exprimé par les macrophages alvéolaires de patients atteints de FPI. *In vitro*, l'expression de CXCL13 dans le macrophage alvéolaire et dans le MDM activé est induite par le TNF- α et l'IL-10, via l'activation respective des voies de signalisation NF- κ B et JAK/STAT. Nous montrons que les concentrations sériques de CXCL13, de TNF- α et d'IL-10 sont significativement corrélées entre elles chez les patients atteints de FPI. Ces résultats suggèrent donc que le TNF- α et l'IL-10 peuvent contrôler l'expression de CXCL13 chez ces patients.

Title : Macrophage in idiopathic pulmonary fibrosis : Effects of Nintedanib and expression of the prognostic biomarker CXCL13.

Keywords : Idiopathic pulmonary fibrosis, nintedanib, macrophages, CSF-1R, CXCL13, signaling pathways.

Abstract: Nintedanib (NTD) is an antifibrotic drug that decreases the decline of the respiratory function of patients suffering from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). NTD exerts antifibrotic effects by inhibiting cellular activity of various tyrosine kinase proteins. It also prevents the activity of the human recombinant CSF-1R protein that is expressed by myeloid cells, especially macrophages. Resident cells or differentiated from circulating monocytes, the macrophages contribute to IPF by secreting several proinflammatory and profibrotic cytokines. In this context, the first objective of my thesis was to determine, if by inhibiting CSF-1R activity, NTD could alter the functions of human macrophages differentiated from blood monocytes (MoDM) by CSF-1 (also called M-CSF). Our results demonstrate that NTD blocks the phosphorylation and the activity of CSF-1R in CSF-1-activated MoDM at very low concentrations that are similar to those inhibiting the human recombinant protein. By preventing CSF-1R activity, NTD reduces cell adhesion and expression of the profibrotic chemokine CCL2.

Moreover, by blocking the activity of CSF-1R and that of other molecular targets, NTD modulates the polarization of CSF-1-activated MoDM. It reduces the production of various interleukins and chemokines by M1 MoDM and prevents the membrane expression of M2 markers. Our results notably demonstrate that NTD significantly inhibits the expression of CXCL13, a prognostic biomarker of IPF. This chemokine is expressed in pulmonary tissues but its cellular origin is unclear. The second objective of my thesis was thus to characterize CXCL13 expression in pulmonary macrophages. Our results demonstrate that CXCL13 is expressed by alveolar macrophages in patients with IPF. *In vitro*, CXCL13 expression in activated alveolar macrophages and MoDM is controlled by TNF- α and IL-10 through the activation of the NF- κ B and JAK/STAT pathways, respectively. Moreover, we demonstrate that seric concentrations of TNF- α , IL-10 and CXCL13 are correlated in patients with IPF. These results thus suggest that TNF- α and IL-10 could mediate CXCL13 expression in those patients.