



HAL
open science

Effet de l'hypoxie sur le développement, la persistance et l'évolution fibrosante des granulomes pulmonaires

Florence Jeny

► **To cite this version:**

Florence Jeny. Effet de l'hypoxie sur le développement, la persistance et l'évolution fibrosante des granulomes pulmonaires. Biologie cellulaire. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2021. Français. NNT : 2021PA131041 . tel-03697500

HAL Id: tel-03697500

<https://theses.hal.science/tel-03697500>

Submitted on 17 Jun 2022

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.

UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD
UFR SANTE MEDECINE BIOLOGIE HUMAINE
ECOLE DOCTORALE GALILÉE

THÈSE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Menée au sein du Laboratoire INSERM UMR U1272 « Hypoxie et Poumon »

Soutenue publiquement le 16 Juin 2021 par

Florence JENY

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

**Effet de l'hypoxie sur le développement, la persistance et l'évolution
fibrosante des granulomes pulmonaires**

Directrice du laboratoire : Pr Carole Planès

Directrice de thèse : Pr Carole Planès

Co-encadrement : Dr Valérie Besnard

Membres du jury :

Dr Makoto Miyara : Rapporteur

Dr Samuel Valable : Rapporteur

Dr Nadine Varin-Blank : Examinatrice

Pr Philippe Bonniaud : Examineur

Pr Bruno Crestani : Président du jury

Pr Carole Planès : Directrice de thèse

Dr Valérie Besnard : Co-encadrante de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer le travail de ma thèse: le Dr Samuel Valable pour son travail de relecture attentif et avisé ; le Dr Makoto Miyara pour ses conseils pertinents tout au long de ma thèse pendant les comités de suivi ; le Dr Nadine Varin-Blank pour sa gentillesse et ses recommandations éclairées ; le Pr Philippe Bonniaud pour ses paroles attentionnées pendant les J2R ; le Pr Bruno Crestani pour avoir accepté d'être président du jury , et ses questions toujours pertinentes lors de précédents jurys (master 2, CNU).

Je remercie la Fondation du Souffle, le Fond de Recherche en Santé Respiratoire et la bourse « Philippe Desandré » qui m'ont permis d'effectuer deux années de recherche à temps complet pour ma thèse de l'Université Sorbonne Paris-Nord.

Je remercie grandement le Pr Carole Planès, pour la rigueur scientifique avec laquelle elle m'a initiée à la recherche fondamentale C'est en toute confiance, et presque les yeux fermés que je me suis engagée dans une thèse de sciences en sachant qu'elle serait ma directrice. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour sa disponibilité, sa bienveillance et son souci d'amener au plus haut les plus jeunes. J'espère pouvoir vous ressembler. Je vous remercie également pour l'accueil dans l'unité UMR 1272 « Hypoxie et Poumon » durant toutes ces années.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Valérie Besnard, qui m'a encadré d'une main de maître pendant toute ma thèse, en me laissant la liberté nécessaire tout en étant très disponible. Je la remercie pour son soutien à la fois humain et scientifique, et pour ses encouragements à chaque fois que je faiblissais. Je la remercie pour les nombreux conseils qu'elle m'a prodigués, à chaque problème tu avais une solution, ce qui a considérablement diminué mon anxiété. Je suis ravie que cette thèse ne soit que le début d'une très belle collaboration dans le monde du granulome.

Je remercie sincèrement le Pr Hilario Nunes, qui m'a donné le goût de la pneumologie et a conforté ma vocation de pneumologue. Je le remercie pour son accompagnement toutes ces années, la transmission de ses nombreuses connaissances, et pour sa précision dans son travail. Je le remercie pour sa confiance, sa disponibilité et pour le temps dont j'ai pu bénéficier pour la recherche. Je suis ravie de pouvoir poursuivre dans le service qu'il dirige, pour de nombreux et passionnants projets.

J'adresse tous mes remerciements et ma gratitude au Pr Dominique Valeyre, qui m'a guidée et encouragée avec toujours beaucoup de bienveillance et intelligence dans mon parcours de vie hospitalo-universitaire. Je vous remercie pour votre générosité, j'ai beaucoup de chance de pouvoir travailler à vos côtés et de bénéficier de la richesse de vos connaissances sur des thèmes variés mais en particulier sur la sarcoïdose.

Je remercie vivement le Pr Jean-François Bernaudin à l'encre sympathique word.

Je tiens à remercier le Pr Yurdagül Uzunhan, pour son soutien et ses conseils qui m'ont accompagnée tout au long de mon cursus.

Je remercie le Dr Simon Chauveau avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler pendant son master2. Je te remercie pour toutes tes idées (sans limites), ton esprit scientifique et critique et ta grande gentillesse.

Je remercie le Dr Marianne Kambouchner, pour son travail qui est à l'origine des réflexions ayant amené à cette thèse.

Je remercie le Dr Ng Wing Tin pour son soutien pendant mes comités de suivi de thèse.

Je tiens également à remercier chaleureusement tous les membres de l'unité U1272 : Emilie Boncoeur, Nicolas Dard, Alexandre Guimard, François Lhuissier, Maria-Luisa Pérez Lozano, Dominique Marchant, Emmanuel Martinod, Ilaria Onorati, Patricia Quidu, Jean-Paul Richalet, Annie Sadoun, Dana Radu, Nicolas Voituron. Merci à vous tous pour l'accueil, vos conseils, je suis très heureuse d'avoir pu et de pouvoir travailler à vos côtés. Je remercie spécialement les « thésards » avec qui j'ai échangé avec beaucoup de plaisir pendant ces années et les remercie pour toute leur aide : Olivier Bernard, Florine Jeton, Eric Hermand, Eva Delbrel, Abdallah Fergani, Liasmine Haine, Hivda Yegen, Thininane Iskounen.

Je tiens à remercier aussi Roxane Hervé pour toutes les formations en microscopie et toutes ses explications. Merci également à Betty Dondi pour sa formation en cytométrie en flux.

Je remercie l'ensemble du service de Pneumologie pour leur aide dans ce travail, pour leur gentillesse et je suis ravie de pouvoir poursuivre le travail avec vous : Diane Bouvry, Julien Caliez, Morgane Didier, Olivia Freynet, Pierre Gazengel, Aurélie Hervé, Warda Khamis, Fatma Kort, Cécile Rotenberg, Danielle Sadoun. Je remercie tout particulièrement les infirmières d'hospitalisation de jour pour leur aide aux prélèvements des patients. Je remercie vivement Thomas Gille, Lucile Sesé et Boris Duchemann mes compagnons de galère universitaire.

Je remercie tous les patients et les « témoins » qui ont participé à cette étude.

Je tiens à remercier ma famille, mes parents, mes sœurs mes beaux-parents et mes amies du lycée et de la faculté qui m'ont soutenue et conseillée.

Je remercie enfin Baptiste pour son soutien et le bonheur qu'il m'apporte au quotidien et pour nos deux filles Adèle et Gabrielle. Vous m'apportez l'équilibre nécessaire à un travail épanoui, je vous en remercie de tout mon cœur.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Introduction	11
1. La sarcoïdose, une maladie complexe	11
1.1 Définition de la maladie.....	11
1.2 Épidémiologie.....	11
1.3 Diagnostic et formes cliniques.....	12
1.3.1 Critères et démarche diagnostiques.....	12
1.3.2 Description de certaines formes cliniques.....	14
1.3.2.1 Atteinte pulmonaire.....	14
1.3.2.2 Atteintes extra-thoraciques.....	19
1.3.2.3 Syndrome parasarcoïdien.....	22
1.4 Physiopathologie.....	22
1.4.1 Facteurs génétiques.....	23
1.4.2 Facteurs environnementaux.....	24
1.4.2.1 Facteurs infectieux.....	25
1.4.2.2 Facteurs environnementaux non-infectieux.....	26
1.4.3 Immunité innée et immunité adaptative.....	27
1.4.1 Autres mécanismes immunologiques et nouvelles voies de signalisation impliquées dans la pathogénie de la sarcoïdose.....	32
1.5 Activité de la maladie.....	34
1.5.1 Définitions.....	34
1.5.2 Marqueurs cliniques.....	35
1.5.3 Marqueurs biologiques.....	35
1.5.4 Imagerie.....	36
1.6 Histoire naturelle.....	38
1.6.1 Résolutive/spontanée et maladie chronique.....	38
1.6.2 Morbi/mortalité.....	38
1.7 Traitement et nouvelles cibles thérapeutiques.....	39
1.7.1 Principes du traitement.....	39
1.7.2 Indications.....	39
1.7.3 Outils thérapeutiques.....	40
2. Le granulome sarcoïdien	42
2.1 Définitions.....	42
2.1.1 Granulomes.....	42
2.1.2 Fonction des granulomes.....	43
2.1.3 Granulome sarcoïdien, particularités histologiques et métaboliques.....	44
2.2 Exemple du granulome sarcoïdien pulmonaire.....	47
2.3 Dynamique de formation et physiopathologie du granulome sarcoïdien.....	49
2.3.1 Les acteurs cellulaires.....	49
2.3.1.1 Macrophages, cellules épithélioïdes, cellules géantes.....	49
2.3.1.1.1 Définitions.....	49
2.3.1.1.2 Origine des cellules constituant le granulome pulmonaire.....	51
2.3.1.1.3 Fonctions générales du macrophage et dans le poumon.....	54
2.3.1.1.4 Polarisations macrophagique.....	56
2.3.1.2 Lymphocytes impliqués dans le granulome sarcoïdien.....	58
2.3.2 Réaction inflammatoire précédant la formation du granulome.....	62
2.3.3 Formation du granulome et mécanismes de pérennisation.....	63

2.3.4	Évolution fibrosante.....	66
2.3.4.1	Rôle du TGFβ	68
2.3.4.2	Polarisation M2/Th2 et fibrose.....	69
2.3.4.3	Rôle environnemental sur la fibrose	70
2.3.4.4	Fibroblastes et MMP	70
3.	Hypoxie et sarcoïdose.....	71
3.1	Hypoxie généralités	71
3.2	Voies de signalisation induites par l'hypoxie	73
3.2.1	Hypoxia inducible factor (HIF).....	73
3.2.1.1	Structure et rôle de HIF	73
3.2.1.1.1	Structure et schéma des grands rôles.....	73
3.2.1.1.2	Signalisations canonique et non canonique par HIF	76
3.2.1.2	Régulation canonique de HIF : mécanismes enzymatiques de détection de l'oxygène ..	77
3.2.1.2.1	Régulation de la stabilité de HIF-α par prolyl-hydroxylation	78
3.2.1.2.1	Régulation de la fonction transactivatrice par asparaginyloxylation	79
3.2.1.1	Régulation non canonique de HIF : des mécanismes variés.....	80
3.2.1.1.1	Régulation transcriptionnelle.....	80
3.2.1.1.2	Régulation traductionnelle	80
3.2.1.1.3	Régulation post traductionnelle de HIF	80
3.2.1.1.4	Régulation des liaisons de HIF à l'ADN.....	81
3.2.2	Nuclear factor-kappa B (NFκB)	81
3.2.3	Autres voies régulées par l'hypoxie	83
3.3	Hypoxie et inflammation	83
3.4	Hypoxie et fibrose.....	86
3.5	Hypoxie et sarcoïdose, quelles preuves et quels liens possibles ?	88
3.5.1	Exposition à l'hypoxie des cellules de l'immunité au cours de la sarcoïdose : mécanismes possibles ?	88
3.5.2	Marqueurs d'hypoxie et rôle de HIF au cours de la sarcoïdose	90
	Hypothèse et objectifs généraux du travail de thèse	92
	Matériels et Méthodes.....	93
1.	Considérations éthiques et réglementaires	93
1.1	Prélèvements sanguins humains	93
1.2	Modèles murins expérimentaux.....	93
2.	Culture cellulaire	94
2.1	Isolement des macrophages dérivés de monocytes sanguins humains (hMDMs)	94
2.2	Culture des hMDMs.....	94
2.3	Lignée NHLF	95
3.	Modèles expérimentaux murins	95
3.1	Modèle des nanotubes de carbone	95
3.2	Modèles de <i>Propionibacterium Acnes</i> (récemment <i>Cutibacterium Acnes</i>)	95
4.	Traitement hypoxique	98
4.1	Culture cellulaire.....	98
4.2	Modèle murin	98
5.	Étude histologique et immunochimique	99
5.1	Préparation des échantillons	99
5.1.1	Culture cellulaire	99
5.1.2	Tissus humains et murins.....	99
5.2	Colorations histologiques	99
5.2.1	Déparaffinage et réhydratation des coupes histologiques	99
5.2.2	Coloration Hématoxyline-Eosine (HE).....	99
5.2.3	Coloration Trichrome de Masson.....	100
5.3	Immunocytofluorescence	100

5.4	Immunohistochimie.....	101
6.	Étude transcriptionnelle	102
6.1	Extraction des ARNs.....	102
6.2	Transcription inverse	102
6.3	Poly Chain Reaction (PCR) quantitative (PCRq)	102
7.	Études protéiques.....	104
7.1	Préparations des échantillons.....	104
7.1.1	Milieux conditionnés.....	104
7.1.2	Protéines intracellulaires totales	104
7.2	Proteome array.....	104
7.3	Dosage des cytokines.....	105
7.3.1	Multiplex	105
7.3.2	ELISA TGF- β 1	105
7.4	Quantification de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription HIF-1 α et NF- κ B	105
8.	Étude de la phagocytose des hMDMs.....	106
9.	Étude de la migration et de la prolifération de fibroblastes pulmonaires humains en réponse au milieu conditionné de hMDMs.....	106
10.	Cytométrie en flux	107
	Travaux expérimentaux.....	109
1.	Effet de l'hypoxie sur des macrophages dérivés de monocytes sanguins chez des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire	109
1.1	Objectifs de travail.....	109
1.2	Article.....	109
1.3	Résultats complémentaires à l'article.....	133
1.3.1	Expression de HIF-2 α	133
1.3.2	Analyses complémentaires de la production cytokinique dans le surnageant de macrophages exposés à l'hypoxie.	134
1.4	Résumé des principaux résultats	137
2.	Effets de l'hypoxie dans des modèles in vivo de granulomatose pulmonaire.....	139
2.1	Hypothèse et objectifs de travail	139
2.2	Résultats	139
2.2.1	Mise au point du modèle de granulomatose pulmonaire induite par PA.....	139
2.2.1	Résultats histologiques de l'effet de l'hypoxie sur la granulomatose induite par PA.....	142
2.2.1.1	Coloration HE.....	142
2.2.1.2	Coloration au Trichrome de Masson	144
2.2.1.3	Marquage de HIF-1 α	145
2.2.2	Régulation transcriptionnelle par l'hypoxie dans le modèle de granulomatose induite par PA 146	
2.2.2.1	Cytokines pro-inflammatoires	146
2.2.2.2	Marqueurs associés à la fibrose	148
2.2.3	Résultats histologiques de l'effet de l'hypoxie sur la granulomatose induite par les nanotubes de carbone (NTs).	148
2.2.3.1	Coloration Hématoxyline Eosine	148
2.2.3.2	Coloration au Trichrome Masson	150
2.2.3.3	Marquage HIF-1 α	151
2.2.4	Régulation transcriptionnelle par l'hypoxie dans le modèle de granulomatose induite par NT 152	
2.2.4.1	Cytokines pro-inflammatoires	152
2.2.4.2	Marqueurs associés à la fibrose	153
	Discussion générale et perspectives	155

1. L'hypoxie et la sarcoïdose, un thème nouveau	155
2. Justification des deux types d'expérimentations et des méthodes utilisées, avantages et limites.....	156
2.1 Modèle <i>in vitro</i>	156
2.1.1 Choix du type de cellules	156
2.1.2 Critère de l'activité pulmonaire	157
2.1.3 Conditions de cultures	157
2.1.4 Niveaux d'oxygénation.....	158
2.2 Modèles <i>in vivo</i>	158
2.2.1 Modèle lié au P.acnes, avantages et inconvénients	159
2.2.2 Modèle lié aux nanotubes avantages et inconvénients.....	160
2.2.3 Exposition à l'hypoxie des modèles murins	160
3. Discussion du modèle <i>in vitro</i> chez l'homme à partir de monocytes circulants.....	161
3.1 Modulation de l'expression et de l'activité de HIF, facteurs explicatifs ?.....	162
3.2 Effet de l'hypoxie sur le phénotype sécrétoire des hMDMs, implication de HIF ?	163
3.3 Effet de l'hypoxie sur la phagocytose et la présentation antigénique.....	164
3.4 Effet de l'hypoxie sur le profil pro-fibrotique des macrophages.	165
4. Modèles <i>in vivo</i>, comment ces résultats préliminaires complètent ce qui a été observé <i>in vitro</i>	166
4.1 Effet de l'hypoxie sur la présence de granulomes et l'inflammation	166
4.2 Hypoxie et fibrose.....	167
4.3 Expression de HIF-1 α dans les modèles murins	168
5. Perspectives	168
5.1 Perspectives concernant le modèle <i>in vivo</i>	168
5.2 Perspectives concernant le modèle <i>in vitro</i>	169
Conclusion	171
Références bibliographiques	172
Annexes.....	201
Résumé.....	222
Abstract.....	223

Liste des figures

Figure 1 : Carte représentant la prévalence de la sarcoïdose à travers le monde.	12
Figure 2 : Imagerie thoracique typique de sarcoïdose	15
Figure 3 : Distribution périlymphatique	16
Figure 4 : Principales manifestations d'organe de la sarcoïdose	19
Figure 5 : Formation du granulome pulmonaire	28
Figure 6 : Représentation schématique des granulomes immuns et à corps étranger	43
Figure 7 : Modèle conceptuel de formation de l'inflammation granulomateuse	44
Figure 8 : Microscopie optique et immunohistochimie sur biopsies bronchiques d'un patient atteint de sarcoïdose	45
Figure 9 : Exemples de granulomes observés dans plusieurs situations de granulomes médiastino-pulmonaires	46
Figure 10 : Montage d'une section de granulome pulmonaire en microscopie électronique par transmission	48
Figure 11 : représentation schématique de la morphologie des différents éléments du système phagocytaire mononucléé	50
Figure 12 : Mécanismes sous-jacents à l'initiation et à l'évolution de la formation de sarcoïdose granulomateuse impliquant les cellules périphériques	52
Figure 13 : Sous-populations lymphocytaires CD4+	59
Figure 14 : Lésions anatomopathologique de fibrose sarcoïdienne pulmonaire	68
Figure 15 : Représentation des différents niveaux de PO ₂ dans le poumon et les vaisseaux	72
Figure 16 : Structure schématique des sous unités HIF	74
Figure 17 : Grandes fonctions de la voie HIF	75
Figure 18 : Exemples représentatifs des cibles de HIF porteuses d'un domaine HRE	76
Figure 19 : Mécanismes de régulation de HIF	78
Figure 20 : Interaction NF- κ b et HIF-1 α	82
Figure 21 : Effet de HIF-1 sur les cellules de l'immunité innée	85
Figure 22 : Immunohistochimie représentant la vascularisation du granulome	89
Figure 23 : Taille des granulomes pulmonaires et variation de la PO ₂ selon la distance aux vaisseaux	89
Figure 24 : Schéma représentant la culture cellulaire des hMDMs	95
Figure 25 : Protocole 7 du modèle murin de granulomatose pulmonaire induit par le P.acnes	97
Figure 26 : présentation du nombre d'animaux utilisé par modèle et représentation des schémas expérimentaux	98
Figure 27 : Images supplémentaires illustrant en immunohistochimie la présence de HIF-1 α et PAI-1 dans des granulomes provenant de biopsies pulmonaires chirurgicales	133
Figure 28 : Expression de HIF-2 α	134
Figure 29 : Résultats du protéome array concernant les 20 cytokines spécifiquement augmentées en hypoxie uniquement chez le patient présentant une forme persistante de sarcoïdose	135
Figure 30 : Effet de l'hypoxie sur la sécrétion de cytokines impliquées dans la régulation positive de la voie JAK-STAT	136
Figure 31 : Effet de l'hypoxie sur la sécrétion de chimiokines	137
Figure 32 : Morphométrie de la mise au point du modèle de granulomatose induite par PA	141
Figure 33 : Histologie de la mise au point du modèle de granulomatose induite par PA	142
Figure 34 : Histologie de la granulomatose induite par PA.	143
Figure 35 : Morphométrie du modèle de granulomatose induite par PA en milieu hypoxique	144
Figure 36 : Lésions fibrotiques dans la granulomatose induite par PA	145
Figure 37 : Présence de HIF-1 α dans la granulomatose induite par PA	146
Figure 38 : Taux d'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation, l'hypoxie et la fibrogénèse dans le modèle murin de granulomatose induite par PA	147
Figure 39 : Histologie de la granulomatose induite par nanotubes de carbone	149
Figure 40 : Morphométrie du modèle de granulomatose induite par les NTs	150
Figure 41 : Lésions fibrotiques dans la granulomatose induite par nanotubes de carbone	151
Figure 42 : Présence de HIF α dans la granulomatose induite par nanotubes de carbone.	152
Figure 43 : Taux d'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation, et la fibrogénèse dans le modèle murin de granulomatose induite par les nanotubes de carbone.	153

Liste des tableaux

Tableau 1: Rentabilité diagnostique des prélèvements thoraciques au cours de la sarcoïdose _____	13
Tableau 2 WASOG sarcoidosis organ assessment instrument _____	20
Tableau 3: Phénotypes de cellules de l'immunité observé des souris déficientes pour HIF-1 α _____	84
Tableau 4: Liste des anticorps/témoins isotypiques utilisés en immunohistochimie _____	101
Tableau 5: Liste et séquences des amorces utilisées sur les échantillons d'origine humaine _____	103
Tableau 6: Liste et séquences des amorces utilisées sur les échantillons d'origine murine _____	103
Tableau 7: Liste des anticorps/témoins isotypiques utilisés en cytométrie en flux _____	107
Tableau 8 : résumé de l'effet de l'hypoxie dans les deux modèles de granulomatose induites chez la souris. _	154
Tableau 9: Résumé de l'impact de l'hypoxie sur plusieurs fonctions du macrophage _____	161

Liste des abréviations

¹⁸F-FDG: 18-FluoroDésoxyGlucose

ACCESS: a case control etiologic study of sarcoidosis

AMPK: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase

ANXA11: annexin A11

ARN: acide ribonucléique

ARNT: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

AS: sarcoïdose avec forte activité pulmonaire

BTNL-2: butyrophilin-like 2

bHLH: basic helix loop helix

BMP: bone morphogenic protein

CCL: CC chemokine ligand

CCRX: C-C chemokine receptor type X

CD: cluster of differentiation

CFA: complete Freund adjuvant

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrices d'antigène

CPI: composite physiologic index

CTO: chitotriosidase

CXCR: C-X-Chemokine receptor

CREB: C-AMP Response Element-binding protein

CTAS: computed tomography activity score

DAMP : dommage associated molecular pattern

DLCO : diffusion pulmonaire au monoxyde de carbone

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

EFR: explorations fonctionnelles respiratoires

EPAS-1: endothelial PAS domain protein 1

EPO: erythropoietin

ESAT-6: 6-kDa early secretory antigenic target

FGF: fibroblast growth factor

FIH1: factor inhibiting HIF-1

FMISO: 18F-fluoromisonidazole

FOXP3: forkhead box P3

GLUT : glucose transporter

GRE : glucocorticoid response element

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HE : hématoxyline-eosine

HIF: hypoxia inducible factor

HLA: human leucocyte antigen

hMDMs : human monocyte-derived macrophages

HRE: hypoxia responsive element

ICAM-1: intercellular adhesion molecule

ICOS: inducible T cell costimulator

ICOSL: inducible T cell costimulator ligand

IFA: incomplete Freund adjuvant

IFN γ : interferon gamma

IL : interleukine

iNOS : inducible nitric oxide synthases

IP : intra-péritonéal

IS : sarcoïdose avec faible activité ou inactive

IT: intra-trachéal

JAK: janus kinase

LBA: lavage broncho-alvéolaire

Lck: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen activated protein kinase

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor

mKatG : *Mycobacterium tuberculosis* catalase–peroxidase

MMP: matrix metallo-proteinase

mSODA: mycobacterium superoxide dismutase A peptide

mTOR: mechanistic target of rapamycin

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B: nuclear factor-kappa-B

NHLF : normal human lung fibroblast

NK: natural Killer

NLR: nucleotide-binding oligodimerization domain protein-like receptor

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NO: monoxyde d'azote
NOD: nucleotide oligomerization domain
NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NOTCH4: neurogenic locus notch homolog 4
NTs: nanotubes
O₂: dioxygène
ODDD: O₂-dependant degradation domain
OR: odds ratio
PA: propionibacterium acnes
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1
PAMP: pathogen associated molecular patterns
PaO₂: pression partielle artérielle en dioxygène
PD-1: programmed death 1
PD-L1: programmed death-ligand 1
PDGF: platelet-derived growth factor
PBMC: peripheral blood mononuclear cells
PHD: prolyl-hydroxylases
PIC: pneumopathie interstitielle commune
PO₂: pression partielle en dioxygène
PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PRR: pattern recognition receptor
PTH-rp: parathyroid hormone-related protein
ROS: reactive oxygen species
RPMI: roswell park memorial institute medium
SAA: Serum amyloid A
SDS: sarcoidosis diagnosis score
sIL-2R: soluble interleukin 2 receptor
STAT: signal transducer and activator of transcription
SVF: SÉRUM de veau fœtal
TAD: transactivation domain
TARC: thymus and activation regulated chemokine
TCR: récepteur des cellules T
TEP: tomographie par émission de positons

Tfh: T follicular helper cells
TDM: tomodensitométrie
Th1: type 1 T helper
TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR: toll like receptor
TNF α : tumor necrosis factor alpha
TVO: trouble ventilatoire obstructif
VEGF: vascular endothelial growth factor
VEMS: volume expiré maximal en une seconde
VHL: von Hippel-Lindau
WASOG: world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders

Introduction

1. La sarcoïdose, une maladie complexe

1.1 Définition de la maladie

Même si la première description clinique de sarcoïdose remonte à 1869 par le britannique Jonathan Hutchinson, cette maladie systémique reste complexe et toujours de cause(s) inconnue(s) (James et Sharma 2002). Le terme de sarcoïdose du grec [σάρκο-] sarco- ou « chair » provient de sa ressemblance clinique avec les localisations cutanées de sarcome. En 1899 selon César Boeck, les nodules cutanés étaient caractérisés par des foyers compacts et bien définis de "cellules épithélioïdes à noyau pâle et aussi quelques cellules géantes". Pensant que cela ressemblait à un sarcome, il a appelé cette affection "sarcoïdes multiples bénins de la peau" (Spagnolo 2015; Iannuzzi, Rybicki, et Teirstein 2007). La sarcoïdose est néanmoins caractérisée par l'identification de granulomes dits « immuns » dans les organes atteints, préférentiellement le poumon et le système lymphatique (ATS/ERS/WASOG 1999; Crouser, Maier, et al. 2020; Grunewald et al. 2019) (une description détaillée des granulomes sera abordée dans le chapitre 2).

1.2 Épidémiologie

La sarcoïdose est une affection ubiquitaire (Figure 1) dont l'épidémiologie est complexe et varie selon le sexe, l'âge, l'ethnie, l'origine géographique, les expositions environnementales, le statut socio-économique et certains facteurs de prédisposition génétique (Arkema et Cozier 2020; Ramos-Casals et al. 2019 ; Brito-Zerón et al. 2019). De plus, certaines données épidémiologiques évoluent avec le temps, comme la mortalité qui a augmenté ces dernières décennies (Fidler et al. 2019; Kearney et al. 2019).

Les taux d'incidence les plus élevés sont rapportés dans les pays du nord de l'Europe et chez les Afro-américains (8-11,5/100 000 habitants/an), les plus bas en Asie (0.5/100 000 habitants/an) (Arkema et al. 2016; Baughman et al. 2016; Yoon et al. 2018). En France, la sarcoïdose est considérée comme une maladie rare, avec une prévalence estimée à près de 30/100 000 habitants et une incidence de 4,9/100 000/an (Duchemann et al. 2017). Les dernières études épidémiologiques montrent que l'âge moyen de déclaration de la maladie recule et se situe entre 45 et 55 ans (Sawahata et al. 2015; Duchemann et al. 2017; Baughman et al. 2016; Arkema et al. 2016). En revanche la sarcoïdose apparaît rarement avant l'âge de 15 ans et après

Lower, et Baughman 2018; Judson et al. 2014). Enfin certaines situations, en raison de leur caractère quasi-pathognomonique, ne nécessitent pas de recours à la biopsie pour le diagnostic comme le syndrome de Löfgren (*cf* chapitre 1.3.2.2) ou l'association d'adénopathies médiastino-hilaires bilatérales à un syndrome d'Heerfordt ou à un lupus pernio (Crouser, Maier, et al. 2020).

La mise en évidence de granulomes épithélioïdes typiques reste le plus souvent nécessaire, surtout si le tableau n'est pas habituel et/ou lorsqu'un traitement est envisagé. Dans ces cas il faut privilégier les sites facilement accessibles (lésions cutanées, adénopathies périphériques, nodules conjonctivaux) (Jeny, Bernaudin, et al. 2020). Les prélèvements réalisés au cours d'une endoscopie bronchique ont un très bon rendement diagnostique (biopsies bronchiques, biopsies pulmonaires transbronchiques, cytoponctions transbronchiques de ganglions intrathoraciques guidées par écho-endoscopie) (Tableau 1).

Tableau 1: Rentabilité diagnostique des prélèvements thoraciques au cours de la sarcoïdose

PRELEVEMENT	RENTABILITE DIAGNOSTIQUE	NOTES
LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE	/	Méthode peu invasive. Un ratio CD4/CD8 > 3,5 est évocateur de sarcoïdose mais est insuffisant pour affirmer le diagnostic.
ASPIRATION TRANSBRONCHIQUE A L'AIGUILLE FINE	Élevée (Jusqu'à 100%)	L'échographie endobronchique augmente la rentabilité diagnostique. La présence du cytologiste sur place permet de réduire le nombre de biopsies (Sehgal et al. 2017). Cet examen a supplanté la médiastinoscopie. Le cytobloc est utile à la réalisation de techniques complémentaires histologiques
BIOPSIE BRONCHIQUE	Modérée (20-60%)	Les biopsies bronchiques qui doivent être étagées (au moins 6) sont positives dans environ 60% des cas
BIOPSIE PULMONAIRE TRANSBRONCHIQUE	Modérée à élevée (40 à 90%)	Les biopsies pulmonaires transbronchiques ont une rentabilité diagnostique de 40 à 90% mais exposent à un risque de pneumothorax ou d'hémoptysie.
CRYOBIOPSIE PULMONAIRE TRANSBRONCHIQUE	Élevée (Jusqu'à 100%)	Le volume des tissus est plus important que ceux obtenus lors de biopsies transbronchiques et la technique est associée à une moindre morbidité que les biopsies pulmonaires chirurgicales
BIOPSIE PULMONAIRE CHIRURGICALE	Élevée (Jusqu'à 100%)	Réalisée exceptionnellement dans une minorité de cas lorsque le diagnostic est difficile et n'a pu être obtenu par des techniques moins invasives.

Adapté de (Spagnolo et al. 2018)

1.3.2 Description de certaines formes cliniques

Même si dans la majorité des cas la sarcoïdose est « bénigne », certaines formes de sarcoïdose sont qualifiées de « dangereuses » car associées à un risque de mortalité, de morbidité significative, ou nécessitant un traitement lourd ou exceptionnel (biomédicament *anti-Tumor necrosis Factor α* (TNF α), transplantation). C'est le cas notamment de certaines atteintes pulmonaires, cardiaques et neurologiques. Les objectifs du clinicien seront de ne pas manquer ces formes « dangereuses » mais aussi d'évaluer et de prendre en charge les signes d'inconfort persistant fréquemment associés à la sarcoïdose tels que la fatigue, pouvant retentir sévèrement sur la qualité de vie des patients (Thillai et al. 2021).

1.3.2.1 Atteinte pulmonaire

La sarcoïdose peut potentiellement atteindre tous les organes, mais l'atteinte thoracique est quasi-constante avec une prévalence de près de 90% des cas (Baughman et al. 2001; Mañá et al. 2017). L'atteinte pulmonaire est par ailleurs la première cause de mortalité liée à la sarcoïdose, principalement en cas de fibrose pulmonaire et/ou d'hypertension pulmonaire (Jamilloux et al. 2016; Walsh et al. 2014; Kirkil, Lower, et Baughman 2018; Jeny, Uzunhan, et al. 2020; Shlobin et al. 2020; Boucly et al. 2017; Nardi et al. 2011; Jeon et al. 2020). La présentation clinique est diverse allant d'un état asymptomatique à un tableau d'insuffisance respiratoire chronique. Les symptômes sont peu spécifiques, les plus fréquents étant la toux et la dyspnée.

La radiographie thoracique est anormale dans 90 à 95% des cas (Nunes et al. 2012). La présence dans 50 à 80 % des cas d'adénopathies hilaires bilatérales symétriques et non compressives est un signe typique (Figure 2 A). L'infiltration parenchymateuse si elle est présente, prédomine dans les territoires supérieurs et moyens. La classification de Scadding distingue 5 stades corrélés à la probabilité de guérison spontanée de la sarcoïdose (Scadding 1961). Stade 0 : radiographie normale au cours d'une sarcoïdose extra thoracique ; stade I : stade le plus fréquent, caractérisé par des adénopathies sans atteinte parenchymateuse (Figure 2A); stade II : adénopathies associées à une atteinte parenchymateuse ; stade III : atteinte parenchymateuse isolée sans fibrose ; stade IV : fibrose pulmonaire (Figure 2D). La probabilité de guérison est respectivement de 60-90 %, 40-70 %, 10-20 % et 0 % pour les stades I, II, III et IV (Nunes et al. 2012; Scadding 1961).

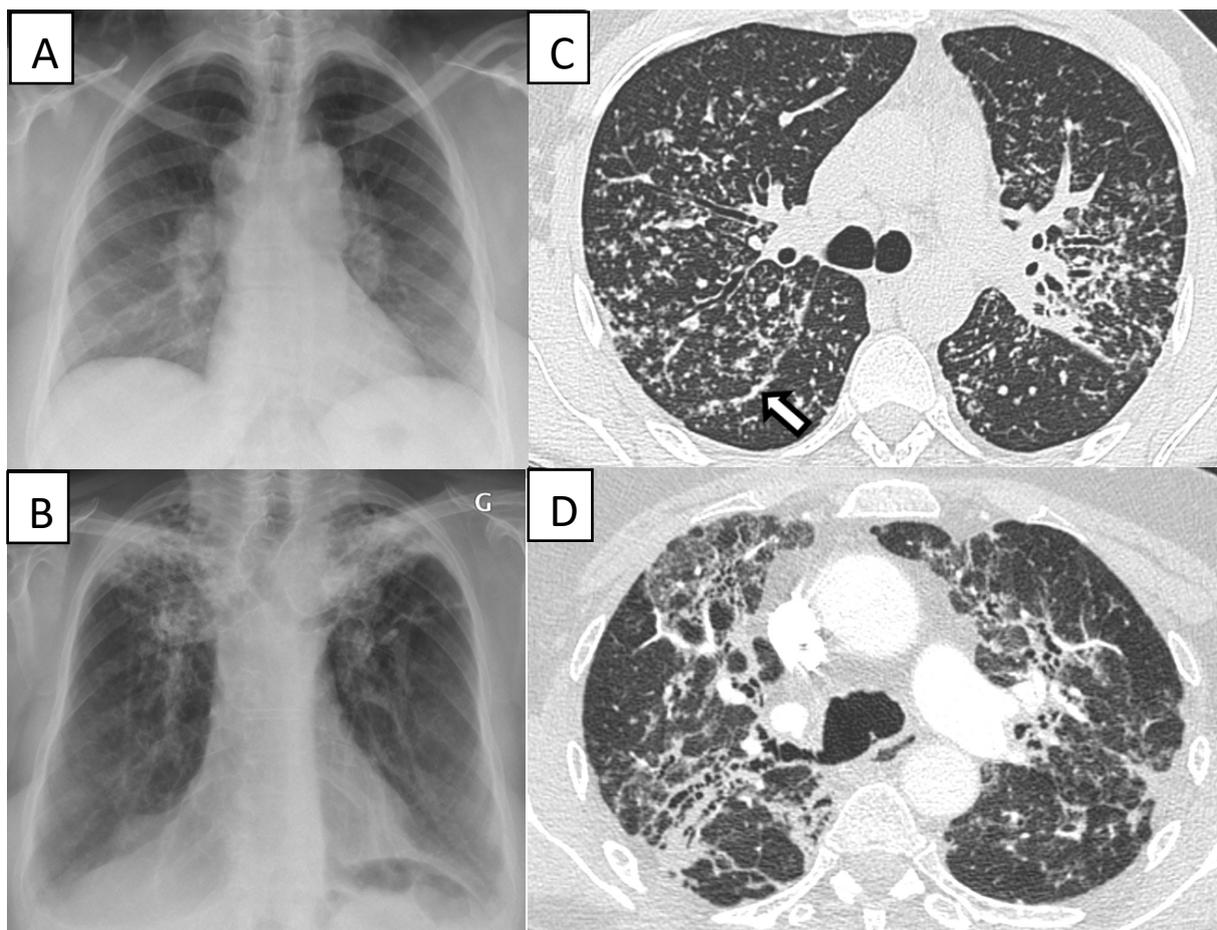


Figure 2: Imagerie thoracique typique de sarcoïdose

A : radiographie thoracique montrant des adénopathies médiastino-hilaires bilatérales et symétriques (stade I) ; B : radiographie thoracique montrant une fibrose des sommets avec perte de volume et attraction des bronches principales (stade IV) ; C : Tomodensitométrie (TDM) thoracique montrant des micronodules de distribution périlymphatique le long de la scissure (flèche). D : TDM thoracique montrant une fibrose pulmonaire liée à la sarcoïdose avec rétraction postérieure du hile associée à des distorsions bronchiques centrales prédominant dans les territoires supérieurs. Images issues de (Jeny et al. 2019; Jeny, Bernaudin, et al. 2020)

En tomodensitométrie (TDM) thoracique, le tableau typique (Nunes et al. 2012) est celui de l'association d'adénopathies médiastino-hilaires bilatérales et symétriques associées à des micronodules de distribution péri-lymphatique. Les micronodules se retrouvent le long des axes périlobovasculaires et à l'échelle du lobule secondaire dans les septa interlobulaires, en sous pleural et notamment le long des scissures (Figure 2C ; Figure 3). Ce tableau permet de prédire avec plus de 95% de sécurité un diagnostic de sarcoïdose chez 80% des patients (Spagnolo et al. 2018; Grenier et al. 1994; Müller, Kullnig, et Miller 1989). Dans les rares cas où des lésions non habituelles prédominent, comme le verre dépoli ou les condensations, la présence d'adénopathies typiques ou de micronodules périlymphatiques même au second plan permet dans la plupart des cas de retenir le diagnostic de sarcoïdose (Martin et al. 2010; De Margerie-Mellon et al. 2016).

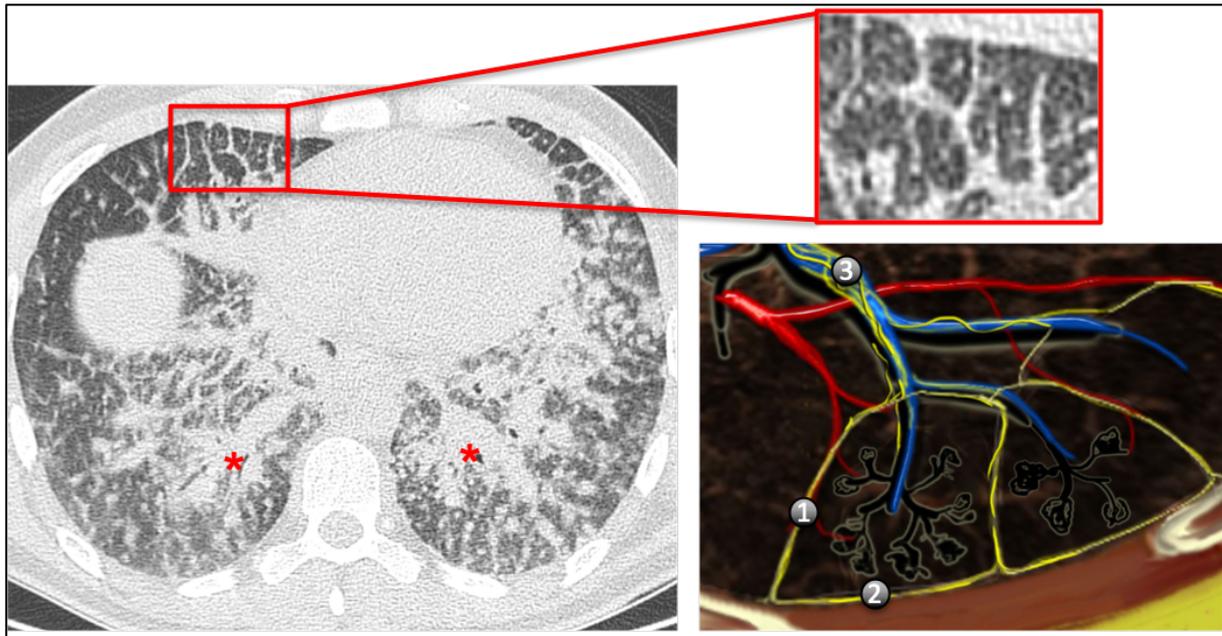


Figure 3: Distribution périlymphatique

A gauche : TDM thoracique montrant des micronodules profus de distribution lymphatique. * : représentant l'atteinte périlobovasculariale. Le grossissement met en évidence les lobules anormalement marqués par la distribution périlymphatique (issus de (Jeny et Valeyre 2019))

A droite : représentation schématique du lobule secondaire et de la distribution périlymphatique des micronodules. En rouge : veine pulmonaire ; en bleu artère pulmonaire suivant la bronchiole, en jaune : les lymphatiques. Les micronodules dans la distribution périlymphatique sont situés au niveau du lobule dans les (1) septa interlobulaires, (2) la plèvre viscérale (sous pleurale, scissure) et le (3) le long des axes périlobovasculaires. Schéma adapté selon <https://radiologyassistant.nl/chest/hrct/basic-interpretation>.

La TDM thoracique permet en outre, de renseigner avec plus de précision sur le caractère réversible « inflammatoire » (micronodules, nodules, condensation) ou irréversible des lésions (fibrose). Les lésions micronodulaires ou nodulaires observées sur le scanner thoracique correspondent en effet à la présence de granulomes en anatomopathologie (Nakatsu et al. 2002; Nishimura et al. 1993). Des adénopathies calcifiées bilatérales peuvent témoigner de la déclaration ancienne de la maladie.

Les lésions de fibrose pulmonaire suivent la distribution des granulomes, prédominant dans les territoires supérieurs moyens et périhilaires et s'accompagnent d'une réduction de volume des lobes supérieurs (Sawahata et al. 2020). Trois tableaux radiologiques ont été décrits (Abehsera et al. 2000): (i) le plus typique, à type de distorsion périlobovasculariale avec ou sans masses de fibrose menant à un trouble ventilatoire obstructif, (Figure 2D) où les bronchectasies par traction peuvent mimer des lésions en rayon de miel (Sawahata et al. 2020) ; (ii) les lésions en rayon de miel avec une prédominance périhilaire associées à un trouble ventilatoire restrictif ; (iii) les réticulations diffuses linéaires avec un impact modéré aux explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) (Abehsera et al. 2000). L'analyse en micro-CT de pièce opératoire

d'explants pulmonaires de sarcoïdose a montré par ailleurs qu'une atteinte des voies aériennes distales avec une perte des bronchioles terminales était systématique en cas de fibrose (Verleden et al. 2021).

Récemment, une étude a recensé plusieurs cas de sarcoïdose pulmonaire (n=25) pour lesquels un profil scannographique de pneumopathie interstitielle commune était associé. Ces patients présentaient une mortalité similaire à des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Deux hypothèses peuvent être émises : soit deux maladies existent chez un même patient (FPI et sarcoïdose), soit il pourrait exister une prédisposition génétique commune à développer ces deux types de maladies fibrosantes à différents temps de la vie (Collins et al. 2018).

Les EFR sont souvent normales ou discrètement anormales au diagnostic (Baughman et al. 2001). Une étude récente rétrospective portant sur 1110 cas de sarcoïdoses prévalentes et incidentes, montraient qu'un tiers des patients avaient une fonction respiratoire normale, près de 30% un trouble ventilatoire obstructif (TVO), 27,1% un trouble ventilatoire restrictif et 10% un trouble ventilatoire mixte principalement. Cette dernière catégorie était constituée de patients atteints d'une sarcoïdose stade IV (Kouranos et al. 2020). Les principales causes de TVO sont l'existence de distorsions bronchiques par la fibrose, un épaississement bronchique par infiltration granulomateuse, parfois sténosante (Naccache et al. 2008). Plus rarement, le TVO peut résulter d'une compression ganglionnaire extrinsèque, ou d'une bronchiolite. La diminution de la diffusion pulmonaire au monoxyde de carbone (DLCO) est l'anomalie la plus fréquemment observée (Valeyre et al. 2015). Elle est le plus souvent diminuée en raison d'un trouble de la diffusion par une atteinte de la membrane alvéolo capillaire (par exemple en cas de fibrose) ou être le reflet d'une cause vasculaire (hypertension pulmonaire). La diminution de la DLCO et de sa composante membranaire prédisent les anomalies des échanges gazeux à l'effort qui se traduisent par une diminution de la pression partielle artérielle en dioxygène (PaO₂) et une augmentation de la différence alvéolo-artérielle à l'exercice (Lamberto et al. 2004). Les débits inspiratoires peuvent-être également diminués en cas d'atteinte laryngée.

Les principales formes sévères des atteintes pulmonaires sont la fibrose pulmonaire avec retentissement significatif, l'hypertension pulmonaire, la surinfection par une infection pulmonaire aspergillaire (Uzunhan et al. 2017) et les atteintes graves des voies aériennes avec TVO.

La fibrose pulmonaire définie par un stade IV radiographique concerne 5,4% des patients à la présentation et jusqu'à 20% en cours d'évolution (Baughman et al. 2001). Dans les pays occidentaux, elle représente la principale cause de morbidité-mortalité avec une survie de moins

de 80% à 15 ans (Nardi et al. 2011). Les causes de décès sont une insuffisance respiratoire terminale et/ou une hypertension pulmonaire, puis une hémoptysie massive secondaire à une atteinte aspergillaire (Nardi et al. 2011; Jeny, Uzunhan, et al. 2020). L'évolution peut être également compliquée de pneumothorax ou d'infections mycobactériennes non tuberculeuses et surinfections bronchiques favorisées par les broncheectasies de traction (Nardi et al. 2011; Panselinas et Judson 2012; Rossides et al. 2020). Plus de la moitié des patients ayant une fibrose pulmonaire garde une activité résiduelle granulomateuse mise en évidence par la captation du 18-FluoroDéoxyGlucose communément appelé ¹⁸F-FDG observée à la tomographie par émission de positons (TEP) couplée au scanner et peut bénéficier d'un traitement par corticoïdes et/ou immunosuppresseurs (Mostard et al. 2013; Nardi et al. 2011).

L'hypertension pulmonaire touche environ 3% de l'ensemble des patients, mais la prévalence atteint jusqu'à 79% des candidats à une transplantation (Huitema et al. 2020). Elle est définie lors d'un cathétérisme cardiaque droit par une pression artérielle pulmonaire moyenne >20mmHg (Simonneau et al. 2019). Il s'agit le plus souvent d'une hypertension pulmonaire précapillaire, (le cathétérisme permettant d'éliminer les hypertensions pulmonaires post-capillaires secondaires à une sarcoïdose du ventricule gauche), avec des mécanismes complexes: destruction du lit capillaire par la fibrose, obstruction vasculaire par des adénopathies ou une médiastinite fibreuse, atteinte vasculaire spécifique granulomateuse (Huitema et al. 2020, Baughman et al. 2010). L'embolie pulmonaire ou un syndrome d'apnées du sommeil sont des comorbidités associées à la sarcoïdose et sont à éliminer. L'hypertension pulmonaire a un pronostic sombre, avec une survie de 55 à 70 % à 5 ans (Nardi et al. 2011; Shlobin et al. 2020; Boucly et al. 2017) . La réduction de la distance au test de marche des 6 min < 300m ainsi que la diminution de la DLCO sont des facteurs pronostiques de mortalité (Shlobin et al. 2020).

1.3.2.2 Atteintes extra-thoraciques

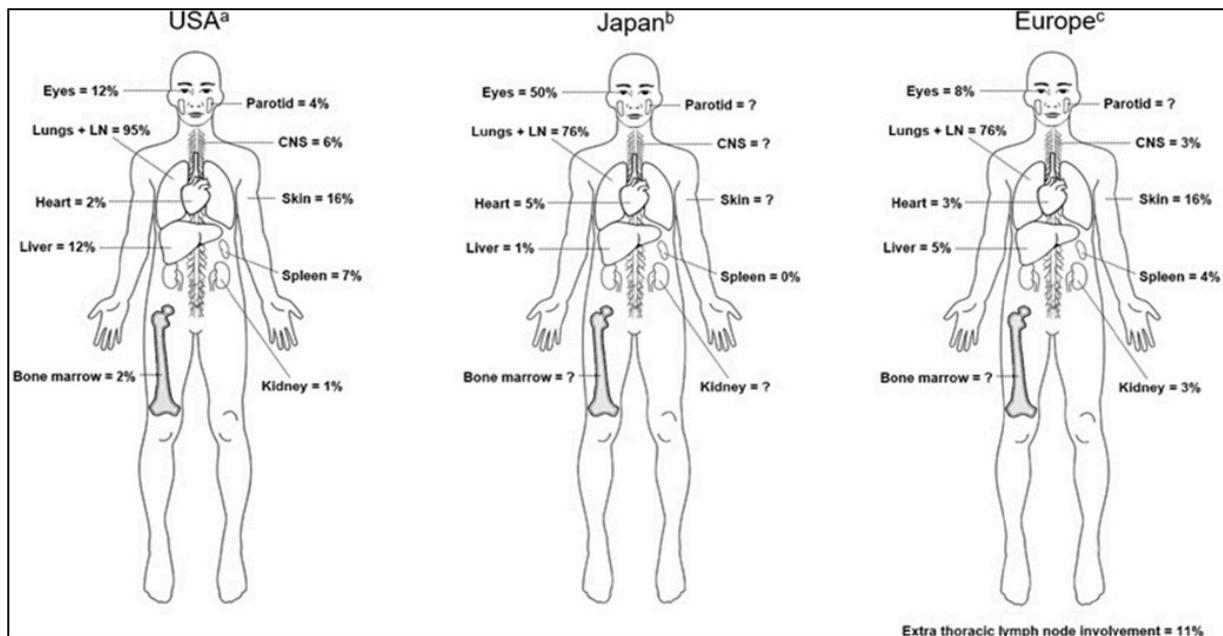


Figure 4: Principales manifestations d'organe de la sarcoïdose

Fréquence des principales manifestations d'organes en a) États-Unis, b) Japon, c) Europe. CNS : central nervous system : système nerveux central ; LN : Lymph node : ganglions. Adapté de (Thillai et al. 2021)

Une atteinte extrapulmonaire est présente dans 30 à 50 % des cas et peut être inaugurale dans la maladie ou apparaître au cours du suivi. Tous les organes peuvent être touchés, avec des fréquences qui varient selon l'origine géographique (Ramos-Casals et al. 2019; Thillai et al. 2021)(Figure 4). Le plus fréquemment, il s'agit d'adénopathies périphériques, d'atteintes cutanées (plaques, nodules, lupus pernio) et d'atteintes ophtalmiques (uvéïtes, glandes lacrymales, neuropathie optique). Les autres localisations comprennent les atteintes cardiaques, celles du système nerveux central et périphérique, hépatiques, rénales, ORL, osseuses, articulaires, spléniques ou musculaires (Baughman et al. 2001). Le syndrome de Löfgren de très bon pronostic car résolutif spontanément dans environ 90% des cas, est défini par une association d'adénopathies intra-thoraciques hilaires bilatérales avec un érythème noueux (surtout chez les femmes), et/ou une arthrite ou atteinte inflammatoire périarticulaire bilatérale isolée des chevilles (plus fréquente chez l'homme) (Grunewald et Eklund 2007; Karakaya et al. 2017). Le Tableau 2 indique selon un groupe d'experts, les manifestations cliniques et paracliniques hautement probables (probabilité de sarcoïdose causant cette manifestation d'au moins 90 %) et probables (probabilité de sarcoïdose causant cette manifestation comprise entre

50 et 90%) (Judson et al. 2014). Ce tableau illustre la complexité et la variabilité de la présentation clinique de la sarcoïdose.

Tableau 2 WASOG sarcoidosis organ assessment instrument

ORGANE	HAUTEMENT PROBABLE	PROBABLE
POUMON	Radiographie thoracique : Adénopathies hilaires bilatérales Scanner thoracique : nodules périlymphatiques Scanner thorax : adénopathies symétriques médiastinales/ hilaires TEP/scintigraphie gallium 67 : fixation médiastinale/ hilaire	Radiographie thoracique : infiltrats diffus Radiographie thoracique : fibrose des lobes supérieurs Scanner thoracique : épaissement péribronchique LBA : alvéolite lymphocytaire LBA : CD4/CD8 ratio>3,5 TEP/scintigraphie gallium 67 : fixation diffuse du parenchyme pulmonaire. Cytoponction transbronchique : agrégats lymphoïdes/ cellules géantes.
SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET PERIPHERIQUE	Syndrome clinique compatible avec une inflammation granulomateuse des méninges, du cerveau, du système ventriculaire, des nerfs crâniens, de l'hypophyse, de la moelle épinière, des vaisseaux cérébraux ou des racines nerveuses. Et IRM anormale caractéristique de neurosarcoïdose, avec une prise de contraste anormale au gadolinium ou d'un examen du liquide céphalorachidien démontrant une inflammation.	Paralysie faciale isolée, IRM négative. Syndrome clinique compatible avec une inflammation granulomateuse des méninges, du cerveau, du système ventriculaire, des nerfs crâniens, de l'hypophyse, de la moelle épinière, des vaisseaux cérébraux, des racines nerveuses mais sans résultats caractéristiques sur l'IRM ou le LCR
GANGLIONS EXTRA THORACIQUES		Ganglions lymphatiques cervicaux ou épitrochléaires multiples et palpables sans symptômes B Ganglions lymphatiques élargis identifiés par imagerie dans au moins 2 stations ganglionnaires périphériques ou viscérales sans symptômes B
REIN		Insuffisance rénale sensible au traitement sans autres facteurs de risque. Insuffisance rénale sensible au traitement chez les patients diabétiques et/ou hypertendus.
COEUR		Cardiomyopathie ou bloc auriculo-ventriculaire sensible au traitement. FEVG réduite en l'absence d'autres facteurs de risque cliniques. Tachycardie ventriculaire soutenue spontanée ou induite sans autre facteur de risque Bloc cardiaque Mobitz II ou de 3e degré Fixation patchy myocardique au TEP. Prise de contraste tardive au gadolinium sur l'IRM cardiaque. Scintigraphie au Gallium positive Défaut de perfusion à la scintigraphie de perfusion ou SPECT scan. Hypersignal T2 à l'IRM cardiaque.
PEAU	Lupus pernio	Nodules sous cutanés ou plaques. Papules inflammatoires sur cicatrice ou tatouage. Lésions annulaires violacées ou érythémateuses. Lésions maculaires ou papulaires violacées ou érythémateuses autour des yeux, nez ou bouche.
YEUX	Uvéite Névrite optique Précipités cornéens "en grasse de mouton" Nodules iridiens Hyalite avec un aspect œufs de fourmis /collier de perles » (pars planite)	Gonflement des glandes lacrymales Maillage de nodules trabéculaires Rétinites Sclérites Lésions périphériques chorioretiniennes multiples Nodules des annexes

		Rétinite périveineuse, nodulaire, en taches de bougie
FOIE		Hépatomégalie sur une imagerie hépatique Nodules hépatiques sur une imagerie abdominale Phosphatases alcalines >3 xNormes
MOELLE OSSEUSE	Fixation diffuse au TEP	
RATE		Nodules hypodenses au scanner Fixation au TEP/gallium-67 des nodules spléniques Splénomégalie à l'imagerie ou à l'examen physique
OS/ARTICULATIONS	Caractéristiques radiographiques typiques (atteinte trabéculaire, ostéolyse, kystes/lésions perforées)	Dactylites Ténosynovite nodulaire Imagerie osseuse positive : TEP, IRM ou scinti gallium-67.
ORL		Modifications granulomateuses à la laryngoscopie Imagerie concordante (p. ex. érosion nasale, épaissement mucopériosté, TEP positive)
PAROTIDE / GLANDES SALIVAIRES	Gallium-67 positif ("Signe du panda") TEP positive des glandes parotides	Parotidites symétriques Glandes salivaires augmentées de volume
MUSCLES		Imagerie positive (IRM, Gallium-67) Masses musculaires palpables
HYPERCALCEMIES / HYPERCALCURIE/ NEPHROLITHIASES	Hypercalcémie et tous les éléments suivants : a) taux sérique normal de PTH ; b) taux normal ou augmenté de 1,25-OH vitamine D c) faible taux de 25-OH vitamine D Hypercalciurie et tous les éléments suivants : a) taux sérique normal de PTH ; b) taux normal ou augmenté de 1,25-OH vitamine D c) un faible taux de 25-OH vitamine D	Néphrolithiases et tous les éléments suivants : a) taux sérique normal de PTH ; b) taux normal ou accru de 1,25-OH vitamine D c) faible taux de 25-OH vitamine D Hypercalciurie sans modification de PTH sérique et taux de 25 et 1,25-OH vitamine D Néphrolithiase avec calculs calciques, sans modification de PTH sérique et taux de 25 et 1,25 OH vitamine D
SYNDROME DE LOFGREN	Association d'adénopathies intra-thoraciques hilaires bilatérales avec un érythème noueux (surtout chez les femmes), ou une atteinte inflammatoire périarticulaire bilatérale isolée des chevilles (plus fréquente chez l'homme)	

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; IRM : Imagerie par résonance magnétique ; LBA : lavage broncho-alvéolaire, LCR : liquide céphalo-rachidien ; PTH : parathormone. Adapté par Bickett et al. (Judson et al. 2014; Bickett, Lower, et Baughman 2018)

Récemment, une large étude s'est intéressée au phénotype clinique de plus de 2000 patients « caucasiens » dans 31 centres européens et a permis par une étude de clusters de différencier 5 groupes en fonction de l'atteinte prédominante et des associations d'organes : 1) atteinte abdominale, 2) association d'atteintes oculaire, cardiaque, cutanée et du système nerveux central, 3) association d'atteinte cutanée et musculo-squelettique, 4) atteinte pulmonaire et ganglionnaire intrathoracique et 5) atteinte extra-pulmonaire (Schupp et al. 2018). L'existence de phénotypes distinguables a été confirmée par une deuxième étude, où les phénotypes différaient selon le sexe, l'origine géographique et les catégories socioprofessionnels (Lhote et al. 2020).

1.3.2.3 Syndrome parasarcoïdien

Le terme « syndrome para-sarcoïdien » a été employé pour désigner les manifestations accompagnant la maladie mais non causées directement par les granulomes (Judson 2015). Ces manifestations sont parfois extrêmement invalidantes et comprennent : une neuropathie des petites fibres (Tavee et al. 2017; Heij, Dahan, et Hoitsma 2012) caractérisée par l'association de douleurs neuropathiques et une atteinte du système nerveux autonome (palpitations, hypotension orthostatique, dyshidrose, troubles du transit) ; des troubles cognitifs, une dépression et des syndromes algiques articulaires et musculaires en dehors d'anomalies objectives, un érythème noueux dont les biopsies montrent une absence de granulome ; une fatigue touchant 50-70% des patients, plus particulièrement les femmes (Drent, Lower, et De Vries 2012), elle peut être profonde et compromettre la vie socio-professionnelle et personnelle. Les mécanismes physiopathologiques du syndrome parasarcoïdien ne sont pas connues, mais il est possiblement lié à la libération de médiateurs de l'inflammation comme la *C-reactive protein* (Drent et al. 1999), ou plus récemment associé à des anticorps anti-onconeuronaux (Lower, Sturdivant, et Baughman 2019).

1.4 Physiopathologie

La/les cause(s) de la sarcoïdose n'est toujours pas connue(s), mais plusieurs hypothèses ont été émises dont la principale est celle d'une réaction immunitaire disproportionnée face à un/des antigènes/agents inconnu(s) chez un patient génétiquement prédisposé. Dans cette hypothèse, la première étape dans la maladie serait le processus de traitement (reconnaissance, phagocytose, présentation) de l'/des antigène(s)/agent(s) par une cellule support de l'immunité innée et/ou présentatrice d'antigène (macrophage, cellule dendritique). Dans une première voie « classique » ou immunitaire adaptative, l'antigène/l'agent serait ensuite présenté notamment via les molécules de présentation de type *human leukocyte antigen* (HLA) (pouvant présenter des polymorphismes) aux lymphocytes T de type CD4⁺ induisant une réponse immunitaire disproportionnée de type « *Type 1 T helper* » (Th1), Th17, Th17.1 et s'accompagnant de la production de cytokines comme le TNF α et l'interféron γ (IFN γ) menant à une réaction inflammatoire impliquant les macrophages et induisant leur différenciation en cellules épithélioïdes puis à la formation de granulomes (Grunewald et al. 2019; Broos et al. 2013; Patterson et Chen 2018). Une deuxième voie de mise en évidence récente, impliquerait directement et dans un premier temps les macrophages après activation de différentes voies de

signalisation intracellulaires (Riteau et Bernaudin 2020) telles que la voie de l'inflammasome *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* (NLRP3) (Huppertz et al. 2020), la voie *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) (Linke et al. 2017) et/ou la voie *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) (Rotenberg et al. 2018; Damsky et al. 2018).

1.4.1 Facteurs génétiques

Une prédisposition génétique dans la sarcoïdose est suggérée par l'épidémiologie de la maladie. La prévalence et l'incidence de la maladie varient en fonction de l'origine ethnique (Brito-Zerón et al. 2019). La sarcoïdose est habituellement sporadique mais des formes familiales se voient dans 1 à 4% des cas (Rossides, Grunewald, et al. 2018; Rybicki et al. 2001). Le risque de développer une sarcoïdose pour un individu si son jumeau monozygote est atteint est multiplié par 80 par rapport à la population générale (Sverrild et al. 2008) et le risque de survenue d'une sarcoïdose chez un parent du premier degré d'un patient atteint est multiplié par un facteur 3,7 (Rossides, Grunewald, et al. 2018). Le risque de forme familiale est également plus important chez les sujets « caucasiens » que les Afro-américains (Rybicki et al. 2001).

Des études d'association pangénomiques des polymorphismes ont été mis en évidence et ont permis de mieux comprendre la pathogénie de la sarcoïdose (Calender et al. 2020). Les facteurs de risque génétique les plus importants ont été identifiés sur le chromosome 6p21, un locus contenant les principaux gènes liés à la présentation de l'antigène et à la régulation des lymphocytes T, tels que l'HLA et la protéine *Butyrophilin-like 2* (BTNL-2). BTNL-2 est un cofacteur de CD80/CD86 agissant comme régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T pendant la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (Calender et al. 2020). De même, des polymorphismes d'HLA de classe II ont été associés à un risque accru d'apparition de la maladie et à certains phénotypes de sarcoïdose (Calender et al. 2020). L'étude ACCESS (*A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis*) a été la première à montrer que les allèles HLA-DRB1 (*1101) et HLA-DPB1 (*0101) contribuaient de manière significative au risque de sarcoïdose (Rossman et al. 2003). L'allèle HLA-DRB1*03 est associé aux formes spontanément résolutive au cours du syndrome de Löfgren (Grunewald et Eklund 2009). De nombreux autres polymorphismes ont été mis en évidence comme par exemple pour *NOD2* (récepteur de reconnaissance de motif moléculaires (PRR)) (Besnard et al. 2018, 2), *TNFA*

(Song, Kim, et Lee 2014), *NFKB*, *ANXA11* (Calender et al. 2020) ou *NOTCH4* (impliquée dans la division cellulaire et l'apoptose) (Adrianto et al. 2012).

La technique de séquençage de type *whole exome* a pu mettre en évidence au sein de plusieurs familles atteints de sarcoïdose grâce aux analyses de concordances fonctionnelles l'implication de l'autophagie et de la voie de signalisation mTOR entre autres (Calender et al. 2019).

Une récente étude épigénétique, a souligné la possible implication de processus de méthylation de l'ADN au cours des formes progressives de sarcoïdose contrairement aux formes résolutives. Ceci suggérerait l'existence de facteurs environnementaux à l'origine de ces modifications épigénétiques (Yang et al. 2019).

L'héritabilité de la sarcoïdose a été évaluée à 39%, les facteurs environnementaux apparaissant donc très importants (Rossides, Grunewald, et al. 2018). Des études d'interaction gène-environnement ont récemment mis en évidence une interaction entre certains variants de prédispositions génique à la sarcoïdose et le tabagisme ou l'exposition aux insecticides (Rivera et al. 2019; Chen et al. 2019).

1.4.2 Facteurs environnementaux

Judson propose 4 hypothèses selon lesquelles les expositions environnementales pourraient être associées à la pathogénie de la sarcoïdose (Judson 2020).

La première est celle d'une exposition environnementale qui agirait comme une stimulation antigénique directe sur le système immunitaire, ce dernier en retour répondrait de façon disproportionnée. L'antigène serait la cause directe de la sarcoïdose chez un patient génétiquement prédisposé.

Dans une deuxième hypothèse, l'antigène dérégulerait le système immunitaire en favorisant l'apparition d'une auto-immunité par mimétisme moléculaire qui consiste en des similitudes entre des peptides étrangers et des auto-peptides. Ce mécanisme favorise l'activation de cellules T ou B autoréactives par un antigène d'origine étrangère chez un individu sensible (Rojas et al. 2018). D'autres facteurs tels que l'activation non spécifique par stimuli antigéniques persistants peuvent également contribuer au développement de maladies auto-immunes (Rojas et al. 2018). Par exemple, la béryllose pulmonaire chronique, est une granulomatose dont la présentation est très proche de la sarcoïdose. La susceptibilité génétique est fortement liée à des allèles HLA-DPB1 porteuses d'un résidu d'acide glutamique à la position 69 de la chaîne β (β Glu69) (l'allèle le plus répandu contenant β Glu69 étant HLA-DPB1*02:01)(Greaves, Atif, et Fontenot 2020). Ceci modifierait la conformation et la charge électrique du site favorisant la liaison au béryllium

positivement chargée. Le béryllium fixé, la conformation du sillon de liaison des peptides est modifié facilitant la présentation d'auto-peptides comme la plexin A à des lymphocytes TCD4+ pour induire une réponse T spécifique (Falta et al. 2013).

La troisième hypothèse est celle de l'action de l'antigène comme adjuvant pour stimuler ou déréguler le système immunitaire mais de façon non spécifique et ne causant pas directement la maladie sarcoïdose.

La quatrième hypothèse est qu'il est possible que les facteurs environnementaux soient uniquement des facteurs associés mais ne causant pas la maladie (Judson 2020).

De nombreux arguments dans la littérature sont en faveur d'un facteur environnemental: la prévalence plus importante des atteintes des organes exposés au milieu extérieur (poumon, peau, oeil) ; les variations épidémiologiques spatio-temporelles de la maladie avec des pics d'incidence saisonniers notamment au printemps (Demirkok et al. 2007; Wilsher 1998), ou dans des zones géographiques extrêmement limitées (Beghè et al. 2017) ; la possible existence d'un agent transmissible expliquant le développement de sarcoïdose chez le receveur après transplantation d'organes issus de patients atteints de sarcoïdose (Burke et al. 1990).

1.4.2.1 Facteurs infectieux

Il existe une abondance de preuves indirectes indiquant que les agents infectieux pourraient être impliqués dans le développement de la sarcoïdose. Deux méta-analyses évaluant des agents infectieux ont mis en évidence un lien étiologique avec la sarcoïdose (Esteves, Aparicio, et Garcia-Patos 2016; Fang, Huang, et Xu 2016). Les techniques moléculaires de type *polymerase chain reaction* (PCR) notamment pour la détection d'ARN ou ADN ribosomal-16S, la spectrométrie de masse et très rarement la culture cellulaire ont identifié des bactéries et virus dans les tissus de sarcoïdose principalement la peau le poumon et les ganglions. Seuls deux pathogènes ont été significativement associés à la pathologie : le *Propionibacterium acnes* (ou nouvellement *Cutibacterium acnes*) avec un *odds ratio* (OR) de 18,8 et les mycobactéries dont l'OR était de 6,8. (Esteves, Aparicio, et Garcia-Patos 2016). Des peptides de mycobactéries ont également été identifiés dans les granulomes sarcoïdiens comme la protéine catalase-peroxydase mycobactérienne (mKatG), *Mycobacterium Superoxide Dismutase A Peptide* (mSODA) ou le *6 kDa early secretory antigenic target* produit par *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT-6). Ces peptides entraînent une réponse immunitaire spécifique T et la production d'anticorps sériques spécifiquement chez les patients atteints de sarcoïdose (Chen et Moller 2014). Le *P.acnes*, est une bactérie anaérobie, gram positive commensale de la peau. Cette bactérie est le seul micro-organisme qui ait été cultivé à partir de lésions de sarcoïdose (Homma

et al. 1978) et a été identifiée dans des granulomes de plusieurs organes de patients de sarcoïdose (peau, ganglions, poumon). *P.acnes* a également été mis en évidence au sein de granulomes myocardiques mais aussi dans des zones inflammatoires adjacentes (Asakawa et al. 2017). Ce pathogène pourrait participer à l'initiation de la réaction inflammatoire qui précède la formation du granulome. De nombreuses études ont identifié des réponses immunitaires spécifiques au *P.acnes* chez les patients atteints de sarcoïdose en comparaison avec des sujets sains (Schupp et al. 2015; Furusawa et al. 2012; Ebe et al. 2000).

Le *P.acnes*, ou l'utilisation de peptides de mycobactéries ont été utilisés avec succès pour mettre au point plusieurs modèles murins de granulomatose pulmonaire ou des modèles *in vitro* de sarcoïdose utilisant des cellules mononucléées du sang (PBMC) (Crouser et al. 2017; Jeny et al. 2016).

L'impact du microbiote sur le développement de la sarcoïdose a été peu étudié avec des résultats parfois contradictoires (Becker et al. 2019; Zimmermann et al. 2017). Les bactéries anaérobies *Atopobium* et *Fusobacterium* détectées dans le LBA pourraient être associées à la sarcoïdose (Zimmermann et al. 2017). Le microbiote dans le lavage broncho-alvéolaire des patients atteints de sarcoïdose seraient moins diversifié et moins abondant que chez les témoins sains (Scher et al. 2016). Toutefois, on ne sait pas si ces modifications du microbiote sont parmi les facteurs causaux de la sarcoïdose ou si elles en résultent.

1.4.2.2 Facteurs environnementaux non-infectieux

Des agents organiques et inorganiques non infectieux ont été mis en cause via des études épidémiologiques portant spécifiquement sur la sarcoïdose. Dans l'étude ACCESS, certains facteurs environnementaux ont été associés à la maladie comme l'exposition à des moisissures, aux insecticides, ou les métiers de l'agriculture (Newman et al. 2004), ou des emplois exposant à des poussières organiques industrielles (Barnard et al. 2005). De plus, un pic d'incidence de cas de sarcoïdose a été retrouvé chez les pompiers qui sont intervenus au moment des attentats du World Trade Center (Izbicki et al. 2007). Ces attaques ont entraîné la libération de nombreuses substances pouvant potentiellement déclencher une réaction granulomateuse comme, des métaux, des fibres (verre, amiante), des particules (carbonate de calcium et silice) mais aussi des polluants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Izbicki et al. 2007; Liroy et al. 2002). Il est intéressant de noter que l'atteinte respiratoire prédominait au diagnostic, mais a disparu dans 45% des cas au cours du suivi (en moyenne 8 ans) laissant place à l'apparition d'atteintes extra pulmonaires cardiaques ou articulaires (Hena et al. 2018). Ceci pourrait suggérer qu'il existe une première phase locale liée à l'exposition

antigénique, puis une deuxième phase systémique impliquant le système immunitaire dans sa globalité. Les nanoparticules de carbone, produits de la combustion (diesel, méthane, propane...), ont d'ailleurs été utilisées sous forme de nanotubes, dans des modèles *in vivo* chez la souris, pour reproduire une granulomatose pulmonaire (Pacheco et al. 2018; Huizar et al. 2011) présentant des similarités de profils transcriptionnels avec la sarcoïdose (Mohan et al. 2018). Les particules de carbone ont aussi été incriminées dans les atteintes cutanées de sarcoïdose liées aux tatouages. Les tatouages noirs composés de carbone amorphe sont plus souvent responsables de lésions cutanées que les tatouages rouges dénués de carbone. Ce type de tatouage est accompagné du « *rush phenomenon* » particulièrement observé chez les patients atteints de sarcoïdose. Il s'agit d'une réaction papulo-nodulaire qui survient sur un tatouage noir récent puis dans un second temps qui se développe sur d'autres tatouages noirs anciens, rappelant les deux phases : locale puis systémique (Sepehri, Carlsen, et Serup 2016; Hutton Carlsen, Larsen, et Serup 2020).

Parmi les particules inorganiques les poussières de métaux sont aussi incriminées. Des emplois avec une exposition à la silice cristalline ont été identifiés comme associés à la sarcoïdose (Graff et al. 2020). Récemment, chez des patients atteints de sarcoïdose en comparaison avec des patients atteints de syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) dont l'exposition professionnelle aux métaux n'était pas différente entre les deux groupes, une réactivité lymphocytaire plus importante à différents métaux était observée (Beijer et al. 2020). L'immuno-réactivité à la silice et/ou aux métaux semble être corrélée à l'apparition d'une fibrose pulmonaire sarcoïdienne (Beijer et al. 2021). Enfin des particules de silice cristalline ont été identifiées au centre de granulomes cutanés, tandis que des dépôts de calcite étaient présents en périphérie, pouvant suggérer des rôles différents dans la constitution du granulome selon la composition de l'agent (Colboc et al. 2019; Pacheco et al. 2018).

1.4.3 Immunité innée et immunité adaptative

La physiopathologie de la sarcoïdose est complexe car elle est accompagnée de modifications de la réponse immunitaire à la fois innée et adaptative. Cette réponse immunologique est difficile à étudier car il n'existe pas de modèle de sarcoïdose permettant de résumer cette variabilité immunologique. D'autre part, les propriétés des cellules de l'immunité diffèrent selon le compartiment où elles ont été prélevées (sang périphérique *versus* LBA) ou en fonction de la présentation de la maladie (Lepzien et al. 2019; Katchar et al. 2001; Broos, Koth, et al. 2018; Grunewald et al. 2019). Ainsi, l'expression de facteurs régulant la réponse immunitaire

est différente entre les patients présentant un syndrome de Löfgren de très bon pronostic et ceux sans ce syndrome. (La description des différents acteurs cellulaires immunitaires sera abordée dans le chapitre 2.3.1.). Broos et al. ont proposé un schéma illustrant la formation du granulome pulmonaire qui est intéressant en raison de la représentation des différents compartiments (ganglions, épithélium, circulation sanguine et lymphatique, interstitium) impliqués dans l'initiation de l'inflammation et le développement du granulome (Broos et al. 2013).

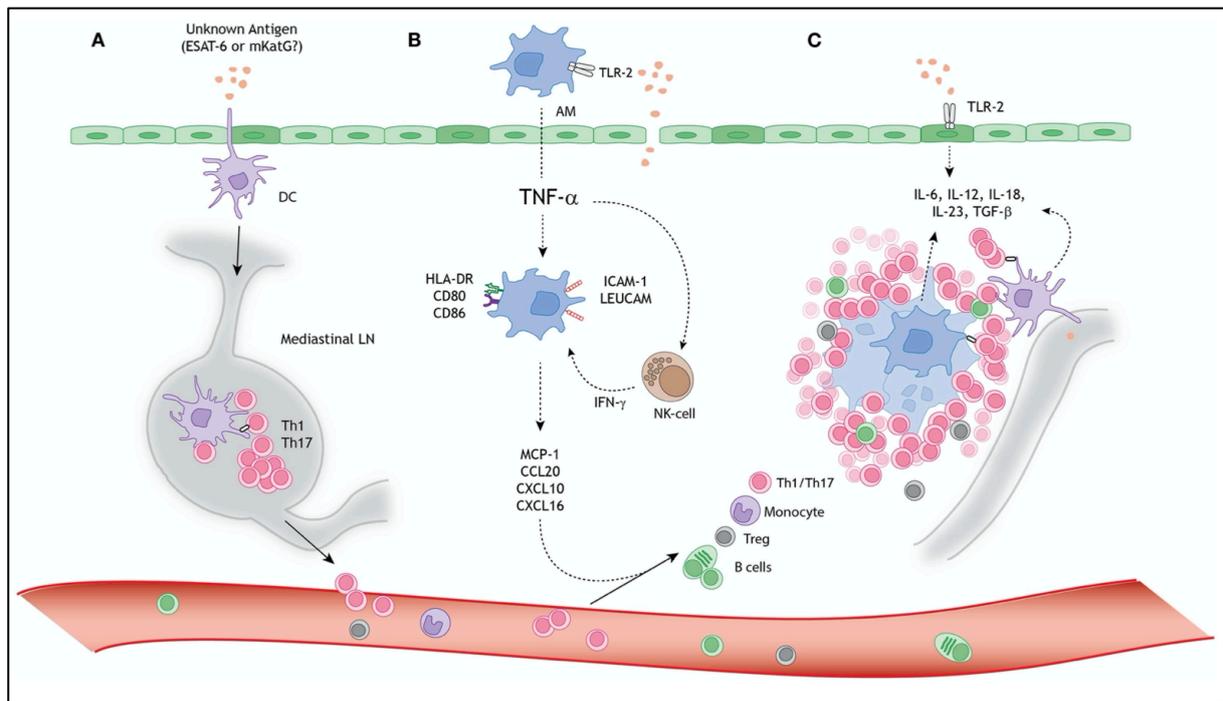


Figure 5: Formation du granulome pulmonaire

Adapté de (Broos et al. 2013). Un antigène aérien inconnu active simultanément (A) les cellules dendritiques interstitielles (DC), (B) les macrophages alvéolaires (AM) et (C) les cellules épithéliales alvéolaires de type II (vert foncé). Ce processus est initié par les ligands du récepteur TLR-2 par exemple l'ESAT-6 ou la mKatG dérivés de *Mycobacterium tuberculosis*. (A) Les DC interstitielles captent l'antigène et migrent vers les ganglions lymphatiques médiastinaux (LNs), où elles initient la différenciation et l'expansion clonale des cellules T helper (Th)1 et 17. (B) Simultanément, les AMs produisent le TNF- α , qui initie la régulation à la hausse des molécules d'activation (HLA-DR et CD80/86) et d'adhésion (ICAM-1 et LeuCAM). Les macrophages produisent des chimiokines (MCP-1, CCL20, CXCL10 et CXCL16) sous la stimulation du TNF- α et de l'interféron- γ (IFN- γ) dérivé des NK, attirant ainsi les cellules Th1/Th17, les monocytes, les cellules T régulatrices (Tregs) et les cellules B. (C) L'environnement pulmonaire est caractérisé par la présence de cytokines favorisant les Th1 et Th17, et TH17.1 telles que IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 et TGF- β , produites par les macrophages, les DC périlymphatiques et les cellules épithéliales alvéolaires. Une stimulation persistante, médiée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), entraîne un recrutement cellulaire continu vers le site de l'inflammation, ce qui conduit à la formation de granulomes. Les Tregs qui infiltrent le granulome ne parviennent pas à diminuer la réponse immunitaire exagérée, contribuant ainsi à la persistance et à l'intégrité du granulome.

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense de l'organisme face à des agents pathogènes. Elle est probablement importante dans la sarcoïdose mais moins étudiée que la réponse immunitaire adaptative. Les études portent principalement sur le rôle des macrophages, néanmoins les polynucléaires neutrophiles, ou les cellules Natural Killer (NK) participent possiblement à la pathogénie et leur nombre dans le LBA est corrélé à la sévérité

des formes pulmonaires (Tutor-Ureta et al. 2006; Ziegenhagen et al. 2003). Plus récemment la *neutrophil gelatinase-associated lipocain* (NGAL) sécrétée par les neutrophiles activés était associée à une sévérité de la maladie et à un recours à la corticothérapie (Kato 2018).

Les monocytes et les cellules dérivées des monocytes jouent un rôle dans l'inflammation granulomateuse. Les monocytes intermédiaires CD14+/CD16+, indiquant une inflammation systémique sont plus élevés dans le sang et le LBA de patients atteints de sarcoïdose et dans des formes chroniques (Lepzien et al. 2021; Fraser et al. 2016). Le monocyte est probablement un acteur cellulaire majeur responsable de l'augmentation de la production alvéolaire de TNF α , cytokine dont le rôle est important dans la sarcoïdose (Lepzien et al. 2021). Une étude transcriptomique « *single cell* » sur des monocytes classiques a montré une augmentation des marqueurs d'activation incluant les molécules d'adhésion, les PRR et les récepteurs de chimokines chez les patients atteints de sarcoïdose (Garman et al. 2020).

Les macrophages alvéolaires et ceux dérivés des monocytes sanguins peuvent être activés via des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires : PRR. Le CD14 qui est un marqueur utilisé pour la reconnaissance des macrophages est également le premier PRR qui a été identifié (Zanoni et Granucci 2013). D'autres PRR incluent les *toll like receptor* (TLR), ou les récepteurs intra-cellulaires de type *nucleotide-binding oligodimerization domain protein* (NOD)-like receptor (NLR). Cette activation macrophagique peut s'accompagner d'une modification du phénotype et de la fonction du macrophage ainsi que d'une modification de sa polarisation (cf chapitre 2.3.1.1.4) (Lee et al. 2020). Les PRR sont capables de reconnaître des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes (*Pathogen associated molecular patterns* (PAMP)) comme les peptides de mycobactérie identifiés dans la sarcoïdose (mKATG, ESAT6, SODA) et des motifs moléculaires associés aux dommages (*dommage associated molecular pattern* (DAMP)) (Bianchi 2007). Au cours de la sarcoïdose une signalisation modifiée des PRR a été retrouvée dans des études immunologiques et génétiques (Veltkamp et al. 2007; Chen et al. 2010; Besnard et al. 2018; Gabrilovich et al. 2013; Wikén et al. 2009). Par exemple, en comparaison avec des sujets témoins, les macrophages alvéolaires ou les macrophages dérivés de monocytes sanguins de patients atteints de sarcoïdose surexpriment les TLR2, TLR4, TLR9 et NOD-2 (Chen et al. 2010; Wikén et al. 2009; Schnerch et al. 2016). L'activation du TLR2 par un peptide mycobactérien (ligand 19-kDa *lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis*) induit une sécrétion plus importante de TNF α et d'interleukine-6 (IL-6) chez les macrophages alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose que chez ceux issus de témoins sains (Gabrilovich et al. 2013).

La *serum amyloid A* (SAA) est une protéine qui fait partie des DAMPs et qui est augmentée au cours des réactions inflammatoires, notamment chez les patients atteints de sarcoïdose (Bargagli et al. 2011). Le taux de SAA dans le sérum de patients atteints de sarcoïdose est corrélé au déclin de la fonction respiratoire (Bargagli et al. 2011). La SAA potentialiserait la formation et la pérennisation du granulome en piégeant des peptides bactériens et en activant la voie NF- κ B via une liaison aux TLR des macrophages (Chen et al. 2010). Le variant SAA1 pourrait être directement sécrété par les macrophages et les cellules dérivées au niveau des tissus atteints (Jumeau et al. 2019). Parmi la famille des récepteurs de type NOD-like, se trouve NLRP3 impliqué dans le processus de l'inflammasome. Ce complexe de l'immunité innée favorise la maturation des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18 en les clivant via l'activation de la caspase 3 (Evavold et Kagan 2019). Une augmentation de la voie de l'inflammasome NLRP3 et de l'IL-1 β a récemment été observée au cours de la sarcoïdose dans plusieurs travaux, et pourrait être un facteur associé à la sévérité de la pathologie (Huppertz et al. 2020; Kron et al. 2019; Talreja et al. 2019) (*cf* chapitre 1.4.1).

Le rôle de barrière cellulaire est aussi un élément de défense important au cours de l'immunité innée et pourrait être altérée/activée dans la sarcoïdose (Broos et al. 2013). Ainsi, des lésions endothéliales et épithéliales de la barrière alvéolo-capillaire ont été observées en microscopie électronique en dehors des zones granulomateuses dans des biopsies pulmonaires de sarcoïdose (Planès et al. 1994). Ces lésions étaient présentes dans des zones semblant indemnes d'inflammation en microscopie optique ce qui pourrait suggérer que l'altération de la barrière est un phénomène potentiellement important dans l'initiation de la maladie (Planès et al. 1994).

Le pont entre les systèmes de réponse innée et adaptative implique la participation des cellules présentatrice d'antigène (CPA) représentées au cours de la sarcoïdose par (i) les cellules dendritiques dont les études sont rares et parfois discordantes (Berge et al. 2012; Ota et al. 2004; Zaba et al. 2010; Kawanami et al. 1981) et (ii) les macrophages notamment alvéolaires (Broos et al. 2013). En effet, une étape essentielle dans la génération de réponses spécifiques des cellules T est l'activation des lymphocytes par la reconnaissance d'un antigène, un processus qui dépend des CPAs. Les cellules T reconnaissent l'antigène par leur récepteur TCR (ou *T cell receptor*) uniquement lorsque l'antigène est présenté via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Par conséquent, l'antigène doit être ingéré par la CPA, inséré dans la molécule du CMH, et transporté à sa surface pour être présenté aux cellules T. L'activation du lymphocyte T requiert la présence de signaux de co-stimulation délivrés à la cellule T par les CPA. Il existe de nombreux polymorphismes d'HLA de classe II associés à un risque accru d'apparition de la maladie et à certains phénotypes de sarcoïdose

(Calender et al. 2020; Schürmann et al. 2001). Les macrophages alvéolaires de sarcoïdose présentent des capacités de présentation antigénique augmentées induisant une prolifération lymphocytaire T plus importante (Lem et al. 1985; Broos et al. 2013). Les molécules de costimulation ou d'inhibition qui sont un deuxième signal nécessaire pour activer le lymphocyte présentent une expression modifiée dans la sarcoïdose par exemple pour le *programmed death-1* (PD-1) sur les lymphocytes T CD4 et son ligand PD-L1 sur les macrophages alvéolaires (Braun et al. 2014), pour CD80 ou CD86 molécules de costimulation du macrophage se liant à CD28 sur les lymphocytes T (Agostini et al. 1999) ou sur la *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) à la fonction d'inhibition pour les lymphocytes T (Broos, van Nimwegen, In 't Veen, et al. 2015), pour BTNL2 (Valentonyte et al. 2005) et pour l'*Inducible T-cell COStimulator* (ICOS) molécule de costimulation exprimée à la surface des lymphocytes T activés et son ligand ICOSL (Sakthivel et al. 2016). En absence de second signal les lymphocytes T deviennent anergiques, c'est-à-dire incapables de répondre à une nouvelle stimulation, ou entrent en apoptose. Les molécules co-inhibitrices, sont là afin de maintenir la tolérance du soi et éviter un emballement de la réponse immunitaire. De façon intéressante, les nouveaux inhibiteurs de *check-points* ciblant CTLA4, PD-1 ou PD-L1 induisent des réactions *sarcoid-like* dont la clinique et les données histologiques sont similaires à la sarcoïdose (Gkiozos et al. 2018). Enfin, le troisième signal d'activation du lymphocyte est médié par l'environnement cytokinique (IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23) auquel participe de façon importante le macrophage au cours de la sarcoïdose pour induire une réponse Th1, Th17, Th17.1 (Herbert, Ahmadzai, et Thomas 2017; Robinson, McLemore, et Crystal 1985; Sahashi et al. 1994, 6; Shigehara et al. 2001; Judson et al. 2012, 23).

Il n'est pas certain que les macrophages alvéolaires puissent passer la membrane alvéolo-capillaire (Broos et al. 2013; Cohen et al. 2018). Ces cellules ne migrent probablement pas vers les ganglions lymphatiques pour induire une activation dans des lymphocytes T naïfs, ce qui en fait des cellules présentatrices d'antigène « faibles » mais elle pourraient néanmoins contribuer à la présentation locale de l'antigène, en augmentant la prolifération des lymphocytes T mémoires recrutés par les chimiokines sécrétées (Broos et al. 2013) et en activant les lymphocytes grâce à l'expression des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40L) (Nicod et Isler 1997). En même temps que les cellules présentatrices d'antigènes résidentes dans les tissus, telles que les cellules dendritiques ou les macrophages alvéolaires, les monocytes sanguins agissent comme des sentinelles pour la détection de menaces potentielles pour l'hôte et sortent de l'espace vasculaire pour "patrouiller" dans l'espace interstitiel des poumons (Jakubzick et al. 2013). Au cours de la sarcoïdose, les monocytes et cellules dérivés des

monocytes sanguins présents dans le lavage broncho-alvéolaire ont possiblement des capacités migratoires importantes grâce à une augmentation d'expression de *C-C chemokine receptor type 7* (CCR7), récepteur de chimokines facilitant leur potentiel de migration dans les ganglions). Ces monocytes expriment également des marqueurs de maturité tels que HLA-DR et CD80 (Lepzien et al. 2019).

La réponse immunitaire adaptative connue est principalement de type Th1, Th17 et Th17.1 avec une réduction ou un dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs (*cf* chapitre 2.3.1.2 et 2.3.3). Néanmoins d'autres acteurs de la réponse adaptative pourraient être impliqués comme les lymphocytes Th2 ou les lymphocytes B. Cette réponse adaptative est médiée via la production de cytokines pro-inflammatoire comme le TNF α , IL-12, IL-18, INF- γ , IL-2 et IL-17A et via la modulation de cytokines régulatrices comme le TGF β et l'IL-10 (Herbert, Ahmadzai, et Thomas 2017; Zhou et Arce 2020; Grunewald et al. 2019), induisant le recrutement, l'activation et la prolifération de nombreuses cellules menant à l'inflammation puis à la formation de granulomes.

1.4.1 Autres mécanismes immunologiques et nouvelles voies de signalisation impliquées dans la pathogénie de la sarcoïdose

Plusieurs mécanismes relatifs à l'auto-immunité ont été associés à la sarcoïdose (Starshinova et al. 2020). La vimentine, protéine de filaments intermédiaires constituant le cytosquelette des cellules du tissu conjonctif a été identifiée dans les corps astéroïdes intra-macrophagiques de granulomes (Cain et Kraus 1983). Dans le syndrome de Löfgren, chez des patients porteurs d'un polymorphisme HLA-DR3, des techniques protéomiques ont identifié la vimentine, comme un autoantigène possible pouvant s'insérer parfaitement dans les molécules HLA sur des macrophages pulmonaires (Wahlström et al. 2007). De même, sur du tissu splénique homogénéisé ayant été utilisé pour des tests de Kveim, la vimentine a été identifiée comme étant l'antigène induisant une réponse lymphocytaire T avec la production d'INF γ spécifiquement chez les PBMC de patients atteints de sarcoïdose (Eberhardt et al. 2017). L'association de la sarcoïdose à d'autres maladies auto-immunes comme le syndrome de Goujerot-Sjögren (Starshinova et al. 2020), la présence d'auto anticorps (Kobak et al. 2014), ou la participation de l'immunité humorale (Kamphuis et al. 2013; Saussine et al. 2012; Phalke et al. 2020) sont d'autres arguments pour suggérer l'implication d'une auto-immunité.

Trois voies de signalisation ont très récemment été étudiées au cours de la sarcoïdose : la voie de mTOR, la voie de l'inflammasome et la voie de signalisation JAK-STAT.

La voie mTORC1

Dans un modèle murin de délétion dans la lignée myéloïde de l'inhibiteur *tuberous sclerosis complex 2* (*Tsc2*) activant le complexe mTORC1, des granulomes ont été observés dans de multiples organes (poumons, peau, ganglions) (Linke et al. 2017). Les macrophages délétés pour le gène *Tsc2* présentaient une prolifération plus importante, une inhibition de l'apoptose, une augmentation de la glycolyse et une transformation en cellules épithélioïdes hypertrophiques (Linke et al. 2017). Les auteurs ont identifié une signalisation mTORC1 activée dans un tiers des granulomes obtenus à partir de 27 biopsies de patients, associée à des marqueurs de prolifération, et la voie mTORC1 était significativement enrichie dans la population présentant une maladie progressive par rapport à une maladie plus limitée. Cette étude souligne le rôle possible de la voie mTORC1 dans les formes chroniques et les granulomes persistants. Ces résultats ont été soutenus par une étude génétique sur cinq familles françaises, mettant en relation la voie de signalisation mTOR et l'autophagie (Calender et al. 2019) qui pourraient être à l'origine d'une diminution de clairance antigénique favorisant la formation de granulomes et la différenciation en Th17 dans la sarcoïdose (Pacheco et al. 2020).

La voie de l'inflammasome

Huppertz et al. ont étudié la voie de l'inflammasome NLRP3 chez des patients atteints de sarcoïdose et dans un modèle murin utilisant des peptides de mycobactérie (Huppertz et al. 2020). Les auteurs ont retrouvé dans les cellules épithélioïdes de granulomes sarcoïdiens la co-expression de Caspase-1 activée et d'IL-1 β qui sont des composants de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les patients présentant une sarcoïdose « sévère » (active et nécessitant un traitement immunosuppresseur) présentaient une augmentation spontanée du taux de l'IL-1 β dans leur LBA ainsi qu'un immunomarquage plus important dans les cellules épithélioïdes des granulomes. Dans les macrophages alvéolaires sarcoïdiens par rapport à des témoins sains, la transcription du miR-223 (un inhibiteur de NLRP3) diminuait, tandis que le taux d'expression de l'ARNm du NLRP3 augmentait. Une implication de la voie de l'inflammasome était également retrouvée dans le modèle murin.

La voie JAK-STAT

Plusieurs cas cliniques (dont le premier issu de notre équipe) ont rapporté l'efficacité majeure d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant différentes JAK dans des formes sévères chroniques résistantes à plusieurs lignes de traitement immunosuppresseurs (Rotenberg et al. 2018; Damsky et al. 2018; 2020). Rotenberg *et al.* ont rapporté une amélioration spectaculaire

notamment respiratoire d'une sarcoïdose avec des poussées multiviscérales réfractaires aux corticostéroïdes associées à une polycythémie associée à une forme mutée de JAK2 en utilisant le ruxolitinib (un inhibiteur de JAK 2 et JAK1). L'étude histologique de biopsies cutanées a montré qu'un traitement par inhibiteur de JAK (tofacitinib inhibiteur de JAK et JAK3) a entraîné la disparition des granulomes et une régression de l'infiltrat inflammatoire associé à une diminution de l'immunomarquage des formes phosphorylées STAT1 et STAT3 ainsi que le taux d'ARNm d'*IFN-γ*, du *TNF-α*, de *l'IL-6*. L'implication de cette voie est également étayée par les analyses transcriptomiques retrouvant une surexpression de la voie JAK/STAT dans des PBMCs de patients atteints de sarcoïdose (Zhou et al. 2017).

1.5 Activité de la maladie

1.5.1 Définitions

Le terme « d'activité » de la sarcoïdose est largement employé au cours de la pratique et des études cliniques. Néanmoins, il n'y a pas de définition précise ni consensuelle de l'activité de la maladie (« Consensus conference: activity of sarcoidosis. Third WASOG meeting, Los Angeles, USA, September 8-11, 1993 » 1994).

Par ailleurs, il n'existe pas de marqueurs cliniques ou biologiques avec une sensibilité ou spécificité excellentes. Le TEP-scanner au ¹⁸F-FDG permet d'identifier avec précision les organes présentant un hypermétabolisme et donc une activité mais il s'agit d'un examen irradiant et coûteux.

Une définition a été proposée en 1994 par la WASOG : « En cas de maladie active, les patients peuvent présenter des signes cliniques d'activité, et/ou des marqueurs biologiques/immunologiques d'activité, et/ou une formation de granulomes actifs, et/ou de progression active vers la fibrose. Dans la maladie inactive, les signes cliniques régressent ou restent stables, et les marqueurs biologiques/immunologiques sont dans la fourchette normale ». (« Consensus conference: activity of sarcoidosis. Third WASOG meeting, Los Angeles, USA, September 8-11, 1993 » 1994). La forme active implique donc 1) une inflammation en cours, 2) un processus où la formation du/des granulomes évolue et 3) avec une progression possible vers la fibrose. Cette définition traduit un instantané et ne prend pas en compte le devenir de la maladie (par exemple un syndrome de Löfgren est une forme active mais de bon pronostic) ou la nécessité de débiter un traitement. Plus récemment, Prasse et al. ont proposé une classification, « *sarcoid clinical activity classification* », basée sur 3 critères : (1) le mode du début de l'entrée de la maladie (aiguë ou non aiguë) ; (2) la nécessité d'un

recours à un traitement; (3) la nécessité d'un recours à un traitement au long cours (Prasse et al. 2008). Ce score permettrait en outre de mieux discriminer les formes actives biologiques que la classification de Scadding (Prasse et al. 2008).

1.5.2 *Marqueurs cliniques*

Certains signes sont évocateurs d'une atteinte active de la sarcoïdose : uvéite, érythème noueux, lupus pernio, fièvre, polyarthralgie, splénomégalie, adénopathie périphérique, atteinte des glandes salivaires ou lacrymales, signes cliniques en rapport avec une hypercalcémie (ATS/ERS/WASOG 1999).

Les symptômes respiratoires comme la dyspnée sont peu spécifiques et peuvent être en rapport avec des séquelles pulmonaires. Par contre l'aggravation de la dyspnée et de la toux sont plus évocateurs d'une atteinte respiratoire active. L'absence de toux est en défaveur d'une exacerbation de la maladie pulmonaire (Panselinas et Judson 2012).

1.5.3 *Marqueurs biologiques*

Des perturbations biologiques sont observées au cours de la sarcoïdose comme la lymphopénie qui pourrait être corrélée à la sévérité de la maladie (Sweiss et al. 2010), l'hypergammaglobulinémie suggérant une participation des lymphocytes B (Kamphuis et al. 2013), ou l'hypercalcémie liée à une augmentation de l'activité de la 1-alpha hydroxylase des macrophages du granulome, convertissant la 25-OH vitamine D en 1.25-diOH vitamine D (forme active favorisant l'absorption digestive du calcium) (Saidenberg-Kermanac'h et al. 2014).

La plupart des biomarqueurs étudiés dans la sarcoïdose sont issus d'une production par les cellules constituant le granulome. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui est le plus connu des biomarqueurs est une glycoprotéine qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II. Cette enzyme est produite par les macrophages de patients et a été identifiée en immunohistochimie dans les cellules épithélioïdes des granulomes sarcoïdiens (Silverstein, Pertschuk, et Friedland 1979) mais son rôle dans la pathogénie de la granulomatose n'est pas connu. La sensibilité diagnostique de ce marqueur est comprise entre 22 et 86% et la spécificité entre 54 et 95% selon les séries (Kraaijvanger et al. 2020). L'ECA peut en effet être élevée en cas de tuberculose, béryllose, histoplasmose, maladie de Gaucher, lymphome. Ce marqueur est par contre utile pour le suivi de l'activité de la maladie des patients notamment sous traitement (Vorselaars et al. 2015). La chitotriosidase (CTO) est une enzyme qui dégrade la

chitine, un polymère que l'on trouve dans les parois cellulaires des champignons et les exosquelettes des insectes et des crustacés. Les neutrophiles pulmonaires et les macrophages peuvent sécréter de la CTO via une stimulation des récepteurs TLR par l'IFN- γ , le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF). L'élévation des taux sériques de CTO est un marqueur d'activité et a été constaté chez des patients présentant une maladie évolutive (Bennett et al. 2020). En tant que marqueur diagnostique, les dosages de CTO sont moins utiles en raison de leur faible spécificité (Kraaijvanger et al. 2020). L'augmentation des niveaux du récepteur sérique soluble de l'interleukine 2 (sIL-2R) est considérée comme un marqueur de l'activation des cellules Th1 dans la formation et la perpétuation du granulome. C'est également un marqueur non spécifique de sarcoïdose. Néanmoins, lorsqu'il est combiné à d'autres biomarqueurs (d'imagerie) et à des caractéristiques cliniques, il peut être utile au diagnostic (Eurelings et al. 2019). D'autres marqueurs biologiques comme le lysozyme, la néoptérine sécrétés par le macrophage ou le YKL-40 par les neutrophiles sont également des marqueurs d'activité de la maladie utilisés dans le cadre de la recherche (Kraaijvanger et al. 2020).

1.5.4 *Imagerie*

Le TDM peut également donner des arguments en faveur d'une activité thoracique de la sarcoïdose. Plusieurs travaux ont permis de classer les lésions de sarcoïdose au TDM selon leur réversibilité, spontanée ou sous traitement (Akira et al. 2005; Brauner et al. 1992; Murdoch et Müller 1992; Remy-Jardin et al. 1994), permettant ainsi de discriminer les lésions granulomateuses des lésions de fibrose. Les lésions réversibles parenchymateuses les plus fréquentes et les plus évocatrices sont les micronodules de distribution lymphatique ; les épaississements péribronchovasculaires sont également fréquents. Les lésions dont la réversibilité est indéterminée sont les opacités en verre dépoli, les lignes septales, les opacités nodulaires pouvant confluer et prendre l'aspect soit de condensation soit de masse. Deux scores d'activité du scanner thoracique ont été mis au point dans la sarcoïdose (Oberstein et al. 1997; Benamore et al. 2016). Le plus récent est le *computed tomography activity score* (CTAS) qui a été développé par Benamore *et al.* et qui consiste en une évaluation de l'étendue (ou la présence pour le score simplifié) de lésions potentiellement réversibles comme les nodules, le verre dépoli, les condensations et les épaississements péribronchovasculaires. Le CTAS permettrait de prédire la réponse au traitement évalué par l'amélioration de la capacité vitale forcée (CVF). Le CTAS présente en outre l'avantage d'une concordance inter-observateur élevée (Benamore

et al. 2016). Sa valeur prédictive de ce score a été confirmée par une autre équipe (Duan et al. 2018). Enfin, des scores élevés du CTAS ont été corrélés avec l'ECA sérique (Duan et al. 2018). Le TEP scanner est une technique d'imagerie médicale fonctionnelle métabolique qui est basée sur le transfert transmembranaire du ^{18}F -FDG et sa captation intracellulaire du fait d'un fonctionnement exagéré de la glycolyse au sein de la cellule, et via une expression accrue des transporteurs du glucose (GLUT) (Love et al. 2005). Le ^{18}F -FDG entre en compétition avec le 2-déoxyglucose vis-à-vis du transporteur trans-membranaire en excès, et pénètre dans la cellule. Métabolisé en ^{18}F -FDG -6-Phosphate par l'hexokinase, il ne peut alors pas être transformé par les étapes suivantes de la glycolyse et s'accumule dans la cellule. Les cellules composant les granulomes (macrophages, lymphocytes) présentent un hypermétabolisme de type glycolyse aérobie comme dans le phénomène de Warburg (Piekarski, Benali, et Rouzet 2018) (cf chapitre 2.1.3).

L'intérêt du TEP scanner dans la sarcoïdose est multiple, cette imagerie est utile pour l'évaluation de l'activité avec une meilleure sensibilité que l'ECA, le *staging* de la maladie, il pourrait permettre aussi de suivre l'évolution sous traitement ou de prédire la réponse thérapeutique (Keijsers et Grutters 2020). Néanmoins en raison de son coût et du fait de l'irradiation les indications du TEP scanner au ^{18}F -FDG sont limitées aux indications suivantes (Valeyre et al. 2014):

- Besoin d'identification d'un site occulte, possiblement biopsiable en l'absence de confirmation histologique aisée.
- Recherche d'une localisation cardiaque active.
- Évaluation de l'activité associée à la présence d'une fibrose pulmonaire. En effet dans cette situation la visualisation de signe d'activité au scanner au sein des lésions de fibrose peut être difficile.
- Bilan d'une fatigue intense lors d'une maladie semblant non évolutive avec des tests biologiques normaux pour préciser définitivement si une activité est encore présente guidant l'initiation d'un traitement.
- En cas d'hypertension pulmonaire, à la recherche d'un hypermétabolisme de ganglions médiastinaux devant une compression des vaisseaux pulmonaires (Boucly et al. 2017).

1.6 Histoire naturelle

1.6.1 Résolutive/spontanée et maladie chronique

L'évolution naturelle de la maladie est également très variable allant de résolutions spontanées à des atteintes d'organes récalcitrantes nécessitant une greffe. On différencie les formes d'évolution courte, des formes persistantes selon qu'elles durent moins ou plus de 5 ans (Baughman, Nagai, et M. Balter 2011). Dans la moitié des cas la sarcoïdose est spontanément résolutive 2 ans après le diagnostic (Valeyre et al. 2014a). Certains paramètres sont prédictifs d'une résolution rapide : un syndrome de Löfgren, une uvéite aiguë, un stade I, et certains haplotypes (*HLA-DRB1*03*). D'autres prédisent une évolution chronique : un âge de début > 40 ans, une origine afro-caribéenne, le stade IV, certaines atteintes extra-thoraciques (cardiaque, neurologique, rénale, ORL, lupus pernio, uvéite postérieure, splénomégalie, néphrocalcinose), l'atteinte multiviscérale de plus de 3 organes (Neville, Walker, et James 1983; Valeyre et al. 2014a; Mañá, Salazar, et Manresa 1994).

1.6.2 Morbi/mortalité

Certaines comorbidités sont associées à la sarcoïdose. Le risque relatif de maladie thromboembolique, d'insuffisance cardiaque, de processus néoplasique, de lymphoprolifération et de pathologie auto-immune (syndrome de Sjögren) est augmenté dans la sarcoïdose (Valeyre et al. 2014a; Wu et al. 2017; Larsson et al. 2020; Jeon et al. 2020; Brito-Zerón et al. 2018). Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil et les infections sévères sont également accrues mais d'origine multifactorielle (Bosse-Henck et al. 2017; Rossides et al. 2020). Deux études récentes sur la mortalité ont retrouvé que les néoplasies étaient la première cause de décès chez les patients et ce de façon plus importante que dans la population générale (Larsson et al. 2020; Jeon et al. 2020).

Le pronostic de la sarcoïdose est favorable dans 80% des cas avec ou sans traitement. Dix à 20% des patients vont garder des séquelles et 1-5% des patients vont décéder de leur sarcoïdose (Valeyre et al. 2014a). Une étude de la réduction de l'espérance de vie, concentrée sur un sous-groupe de patients atteints de sarcoïdose, montre que la première cause de décès est liée aux atteintes pulmonaires sévères suivies par les atteintes cardiaques (Reich 2002; Gribbin et al. 2006; Jamilloux et al. 2016). Globalement, la sarcoïdose entraîne une diminution de l'espérance de vie de près de 6 ans (Jamilloux et al. 2016) et une augmentation de la mortalité par rapport à la population générale (Larsson et al. 2020; Gribbin et al. 2006; Jeon et al. 2020; Rossides, Kullberg, et al. 2018). Une étude suédoise a montré le contraste entre patients ne nécessitant

pas de traitement pour lesquels il n'y a pas de surmortalité et les patients ayant une nécessité d'être traités pour lesquels la mortalité est augmentée (Rossides, Kullberg, et al. 2018). Dans les formes pulmonaires, la diminution de la fonction pulmonaire évaluée par un *composite physiologic index* (CPI) >40 (formule prenant en compte la CVF, le volume expiré maximal en une seconde (VEMS) et la DLCO), la diminution de la DLCO, l'extension de la fibrose >20% au scanner, et la présence d'une hypertension pulmonaire ou l'origine afro-caribéenne sont des facteurs de risques reconnus de surmortalité (Walsh et al. 2014; Kirkil, Lower, et Baughman 2018; Jeny, Uzunhan, et al. 2020; Baughman et al. 2018; Kouranos et al. 2020)

1.7 Traitement et nouvelles cibles thérapeutiques

1.7.1 Principes du traitement

Le traitement de la sarcoïdose reposant sur des médicaments anti-inflammatoires (corticostéroïdes ; immuno-suppresseurs ; anti-TNF α) n'est pas curatif, mais suspensif sur les manifestations en contrôlant la réaction granulomateuse. Le traitement n'a aucun effet sur la fibrose une fois installée. L'influence du traitement sur l'histoire naturelle de la maladie et notamment l'évolution vers la fibrose reste une question débattue. La corticothérapie est le traitement de première ligne, mais pourvoyeuse de nombreux effets indésirables. Il n'y a pas de consensus sur la dose initiale ni sur la durée du traitement (le plus souvent 12 mois ou plus) et les modalités de décroissance. Des rechutes sont fréquentes lors de la diminution des doses, et surtout après l'arrêt du traitement. En dehors de la corticothérapie, les autres molécules disponibles ont un délai d'action retardé de plusieurs mois. Chaque traitement devra être encadré par une prévention de ses effets secondaires. Des traitements symptomatiques ou dirigés sur certains organes peuvent aussi être nécessaires et compléter le traitement de la sarcoïdose.

1.7.2 Indications

La mise en œuvre d'un traitement peut ne pas être nécessaire s'il n'y a pas d'atteinte sévère ou de syndrome parasarcoïdien ou être nécessaire d'emblée ou de façon différée devant une progression secondaire. Le traitement n'est pas systématique et la décision de traiter nécessite de répondre à certaines questions au préalable : 1) le patient est-il symptomatique ? 2) les symptômes peuvent-ils être contrôlés par une thérapeutique locale ? 3) existe-t-il une atteinte d'organes vitaux ? 4) le patient présente-t-il une forme chronique de la maladie ? 5) le patient présente-t-il des contre-indications au traitement ? Enfin il est important de prendre en compte

l'adhésion au traitement sur laquelle repose notamment une meilleure évolution de la qualité de vie sous traitement (Sharp et al. 2020).

1.7.3 *Outils thérapeutiques*

La corticothérapie est le traitement général de référence. Les glucocorticoïdes diffusent à travers la membrane cellulaire, puis se fixent et activent un récepteur intra-cytoplasmique. Ce complexe activé, passe la membrane nucléaire et s'associe au *glucocorticoid response element* (GRE) pour activer des gènes codant pour des protéines anti-inflammatoires (annexine 1, IκB qui inhibe NF-κB, ou le récepteur de l'IL1) ou inhiber la transcription de gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires (IL-1β, TNFα, molécules d'adhésions). Le mécanisme d'action des corticoïdes peut également être direct en inhibant la voie NF-κB (Grutters et van den Bosch 2006). La corticothérapie est en règle générale prolongée sur 12 mois ou plus. Des doses de prednisone orale de 0,5 mg/kg sont prescrites à l'initiation du traitement. En cas de sarcoïdose pulmonaire, deux études récentes ont montré qu'une réponse était obtenue en un mois ou moins, et qu'une décroissance rapide des corticoïdes avait une efficacité satisfaisante moyennant une prise de poids moindre, qu'une décroissance plus lente (Broos, Poell, et al. 2018; Broos, Wapenaar, et al. 2018).

D'autres molécules peuvent être prescrites, en cas de contre-indication, échec ou mauvaise tolérance des corticoïdes ou bien à titre d'épargne cortisonique lorsque la dose seuil dépasse durablement 10 voir 7 mg/j (James et Baughman 2018) :

Les antipaludéens de synthèse (hydroxychloroquine) notamment grâce à leur inhibition de l'acidification du lysosome nécessaire à la présentation antigénique et à l'activation des TLR peuvent être utilisés pour les atteintes cutanées modérées et en cas d'hypercalcémie. Le méthotrexate à faible posologie hebdomadaire est l'immunosuppresseur le plus choisi en deuxième ligne (Rahaghi et al. 2020). Il agit sur la synthèse de l'ADN, la réparation et la réplication cellulaire via l'inhibition de la dihydrofolate reductase. Il a des propriétés anti inflammatoires via une augmentation de l'adénosine et par un mécanisme mal connu qui inhiberait le TNFα. via la voie NF-KB (Iannuzzi et Fontana 2011). Ses complications sont d'ordre hématologique, hépatique, pulmonaire et rénal. L'azathioprine autre molécule de deuxième ligne, inhibe la prolifération des lymphocytes en bloquant la synthèse des purines. Dans certaines formes graves résistant à ces traitements, les anti TNF-α (infliximab voire adalimumab) peuvent être envisagés et ont montré, leur efficacité pour les cas de sarcoïdose chronique réfractaire (particulièrement lupus pernio, neurosarcoïdose, et atteinte oculaire). L'efficacité est prouvée pour les atteintes pulmonaires mais avec un effet modeste (James et

Baughman 2018; Baughman et al. 2006). Ce traitement induit notamment une apoptose des leucocytes exprimant le TNF α .

En cas d'atteinte respiratoire pourront être prescrits selon la nécessité : une oxygénothérapie, le traitement d'infections pulmonaires surajoutées de bronchectasies (très fréquentes dans les formes avancées) ou aspergillaires et de leurs complications, le traitement des sténoses bronchiques par dilatations et stents. Une réhabilitation peut être particulièrement intéressante avec une augmentation de l'activité physique journalière et une diminution de la fatigue (Strookappe et al. 2015). Les hémorragies liées à une infection aspergillaire ou non peuvent bénéficier de la radiologie interventionnelle. La greffe d'organe peut être envisagée en cas de stade terminal de la maladie respiratoire après avoir épuisé toutes les options médicamenteuses. Trois composantes de type fibrose pulmonaire, hypertension pulmonaire et obstruction des voies aériennes conjuguent en proportions différentes. La survie post transplantation pulmonaire est identique à la plupart des autres causes de transplantation pulmonaire et meilleur qu'en cas de fibrose pulmonaire idiopathique (Taimeh et al. 2016; Le Pavec et al. 2021). La survie post transplantation est diminuée chez les sujets plus âgés et en cas de fibrose plus étendue.

Avec une meilleure connaissance des voies de signalisations induites, des alternatives thérapeutiques sont actuellement à l'essai dans la sarcoïdose testant par exemple l'efficacité du sirolimus (inhibiteur de mTOR) dans les formes cutanées (EudraCT Number: 2017-004930-27), de traitement inhibiteur de IL-1 β dans la sarcoïdose cardiaque (ClinicalTrials.gov NCT04017936) ou dans les formes pulmonaires (NCT02888080), des inhibiteurs de la voie JAK-STAT (Tofacitinib) pour des atteintes pulmonaires corticodépendantes (NCT03793439). Des cas rapportés ont également suggéré que les anti-IL-6 (Tocilizumab) pourraient être intéressants dans des formes de sarcoïdose réfractaire. L'IL6 est une cytokine connue pour son action pro inflammatoire au cours de l'immunité innée et pour son activation de la voie JAK-STAT. Le nintedanib (inhibiteur de tyrosine kinase ciblant les récepteurs du *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) et *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) dans l'analyse en sous-groupe sur 12 patients atteints de sarcoïdose fibrosante de l'essai INBUILD, ralentissait le déclin de la CVF (Flaherty et al. 2019). Un autre anti fibrosant de type pirfenidone est actuellement en cours d'essai (NCT03260556).

2. Le granulome sarcoïdien

2.1 Définitions

2.1.1 *Granulomes*

Des structures diverses sont appelées « granulomes », terme vague, vrai mot-valise recouvrant par exemple le granulome dentaire ou granulome pyogénique/ botryomycome, d'où la nécessité de bien définir ce dont il s'agit. Ainsi en reprenant les mots de William Epstein : « le granulome sarcoïde ou tuberculoïde est pathologiquement distinct. On y voit de façon caractéristique des cellules épithélioïdes et géantes organisées pour former des nodules » (Epstein, Skahen, et Krasnobrod 1963).

Le **granulome dit « immun »** à cellules épithélioïdes dont fait partie le granulome sarcoïdien et dont nous parlerons est défini comme : un agrégat organisé et compact, principalement composé de cellules dérivées de macrophages (c'est-à-dire appartenant au système des phagocytes mononuclées (van Furth, Raeburn, et van Zwet 1979) matures de type cellules épithélioïdes et cellules géantes multinucléées pouvant être accompagnées de nécrose ou associées à d'autres cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes au centre et en périphérie, plasmocytes en périphérie) (Adams 1976). Selon Adams et al., ce qui différencie le granulome d'un agrégat de cellules au cours d'une inflammation chronique est l'organisation cellulaire en une structure compacte et la présence de ces cellules matures (macrophages matures et/ou cellules épithélioïdes et/ou cellules géantes) (Adams 1976). Une multitude de facteurs- agents infectieux (*Mycobacterium tuberculosis*) et corps étrangers - ainsi que de nombreuses maladies inflammatoires et/ou auto-immunes d'étiologie inconnue peuvent entraîner la formation de granulomes. Il faut donc distinguer, et ceci est important lors de la construction d'hypothèses causales, les granulomes dits à corps étrangers des granulomes immuns à cellules épithélioïdes (Figure 6). **Les granulomes à corps étrangers** dont un exemple est celui observé dans la silicose chronique avant la formation d'un nodule fibrohyalin, sont constitués de regroupements de macrophages sans architecture concentrique régulière, contenant des particules minérales (les corps étrangers), sans association avec des lymphocytes et ayant une évolution fibrosante par leur centre (« Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. Silicosis and Silicate Disease Committee » 1988). Dans certains cas, des cellules géantes particulières sont leur principal composant cellulaire comme par exemple dans les granulomes associés à l'aluminium ou les silicomes associés aux ruptures de prothèses mammaires (Travis, Balogh, et Abraham 1985; Erdohazi et Newman 1971). Ainsi on peut résumer que ces granulomes à « corps étranger » sont à distinguer des granulomes « immuns » par leur

composition à type de macrophages matures, et cellules géantes multinucléées sans cellules épithélioïdes et l'absence d'association évidente *in situ* avec d'autres cellules impliquées dans un processus d'immunité adaptative (Soler et Bernaudin 1993; Pagán et Ramakrishnan 2018; Shah, Pritt, et Alexander 2017).

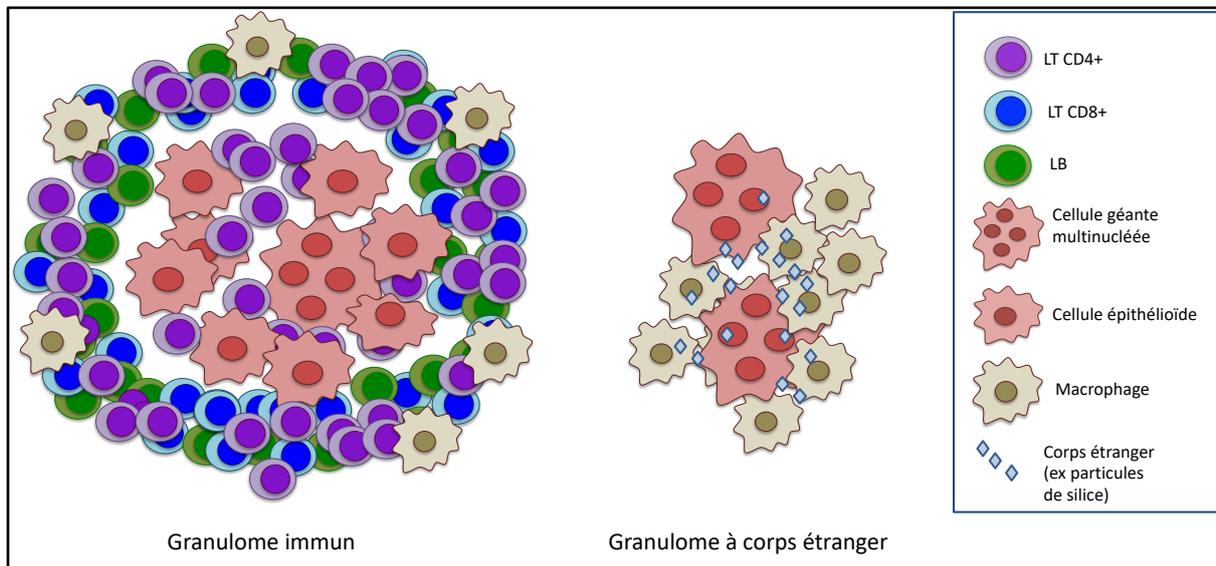


Figure 6: Représentation schématique des granulomes immuns et à corps étranger
Abréviations : LT : lymphocyte T ; LB lymphocyte B

2.1.2 Fonction des granulomes

Selon l'hypothèse encore privilégiée, la formation des granulomes reflèterait l'échec de la rencontre initiale entre les phagocytes et des particules/antigènes avec absence de dégradation de ces derniers (Pagán et Ramakrishnan 2018).

Il est difficile de savoir si la fonction du granulome est « bénéfique » ou « néfaste » pour l'individu. Néanmoins, cette structure étant conservée entre les espèces des invertébrés jusqu'à l'Homme, on peut supposer que son rôle soit favorable (Pagán et Ramakrishnan 2018). En effet, le « but » du granulome serait d'isoler une particule potentiellement néfaste du reste de l'organisme, grâce à des barricades cellulaires et fibreuses (Pagán et Ramakrishnan 2018) puis de l'éliminer (Figure 7). Néanmoins dans certaines infections comme la tuberculose, les granulomes peuvent, au moins dans un premier temps, favoriser la dissémination du pathogène par recrutement de nouveaux macrophages (Davis et Ramakrishnan 2009). Au cours de la sarcoïdose, on peut penser que cette réponse immunologique particulière est disproportionnée, les granulomes formés pouvant entraîner une dysfonction de l'organe atteint.

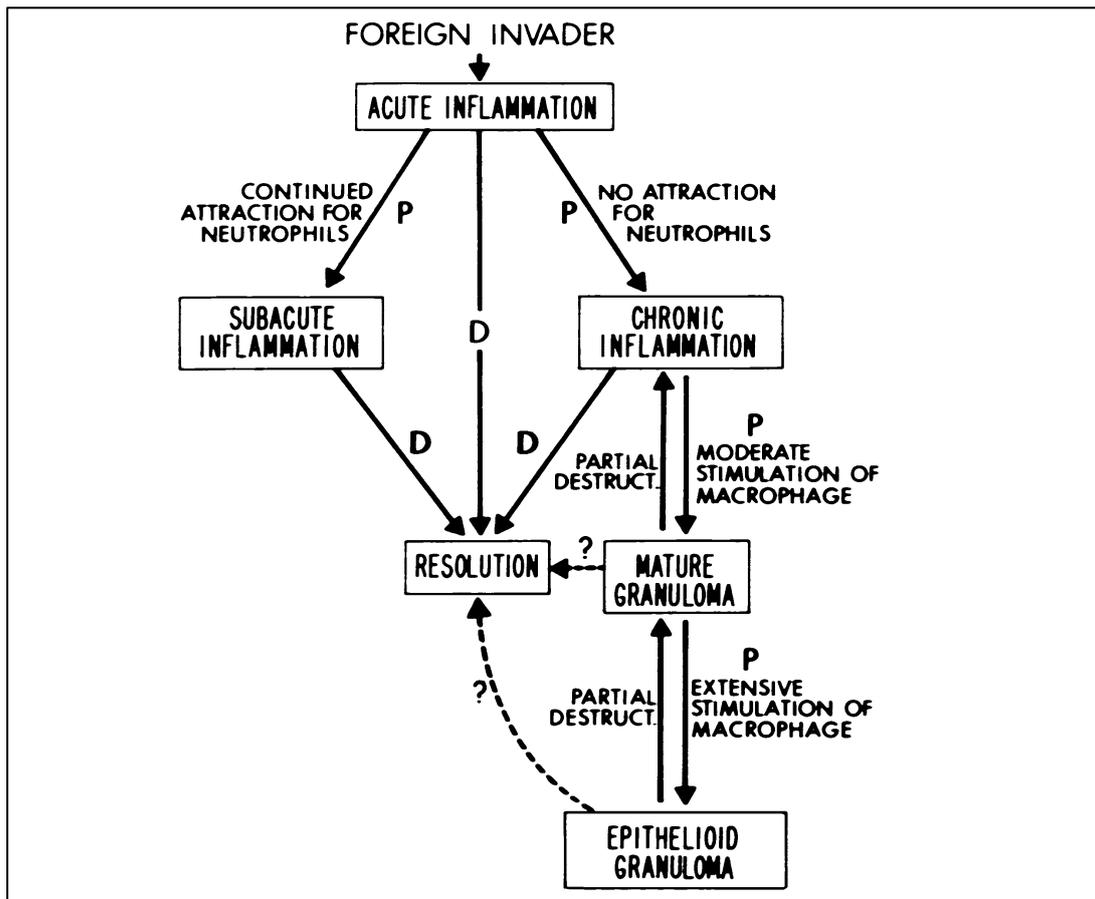


Figure 7: Modèle conceptuel de formation de l'inflammation granulomateuse

Selon (Adams 1976). Un agent étranger va entraîner s'il n'est pas éliminé une inflammation chronique. Cette inflammation va stimuler le macrophage, menant à la formation d'un granulome mature qui va par la suite évoluer vers un granulome épithélioïde avec la présence de cellules épithélioïdes. Le but du granulome sera de détruire et d'isoler l'agent étranger. P : persistance de l'agent « étranger » ; D : destruction de l'agent

2.1.3 Granulome sarcoïdien, particularités histologiques et métaboliques

Le granulome sarcoïdien est typiquement « bien formé », compact, sans nécrose caséuse, associant des cellules épithélioïdes et des cellules géantes multinucléées au contact de lymphocytes T CD4+ en son centre constituant le follicule central (Bernaudin et al. 2019; Rossi, Cavazza, et Colby 2015). En périphérie, les lymphocytes T CD4+ sont également présents (Bernaudin et al. 2019) avec l'identification de LT régulateurs CD4+ *Forkhead-Box-Protein 3* (FOXP3)+ (Miyara et al. 2006), des Th17 (Facco et al. 2011) des Th1 (Kriegova et al. 2011), ou des Th2 (Nguyen et al. 2018) ainsi que d'autres cellules comme les lymphocytes T CD8+ (Shamaei et al. 2018), des cellules dendritiques (Ota et al. 2004), des lymphocyte B (Kamphuis et al. 2013) ou des plasmocytes principalement à immunoglobulines A (IgA) (Kamphuis et al. 2013) (Figure 8).

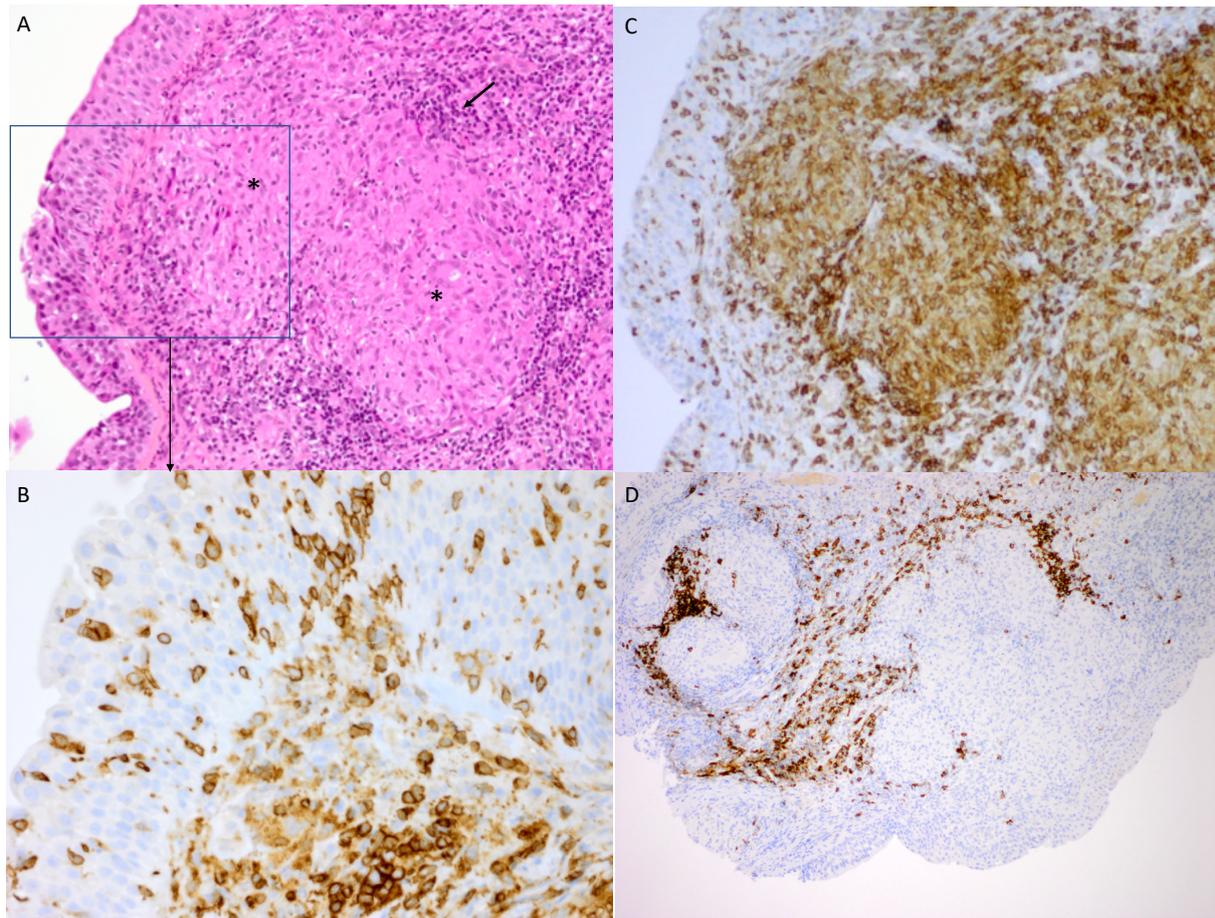


Figure 8: Microscopie optique et immunohistochimie sur biopsies bronchiques d'un patient atteint de sarcoïdose (A) Deux granulomes immuns épithélioïdes typiques (*) entourés de lymphocytes (flèche) dans le tissu conjonctif sous l'épithélium. Coloration éosine hématoxyline. (B et C) immunomarquage avec un anticorps anti-CD4+. (B) agrandissement correspondant à l'encadré (A) Noter la présence de lymphocytes CD4+ en périphérie du granulome et dans l'épithélium bronchique. (C) présence de lymphocytes TCD4+ dans le follicule central et en périphérie du granulome. (D) immunomarquage avec un anticorps anti CD-19 marquant les lymphocytes B en périphérie du granulome. Grossissement (A et C) x100 ; (B)x200 ; (D)x50. Adapté de (Bernaudin et al. 2019)

Une nécrose centrale focale mais sans composante caséuse peut être associée à ces granulomes. Le granulome peut également contenir des inclusions cytoplasmiques comme des calcifications concentriques basophiles connues sous le nom de corps de Schaumann (lysosomes dégénérés) ou des inclusions étoilées appelées corps astéroïdes (fragments de collagène ou de vimentine emprisonnés) (Rossi, Cavazza, et Colby 2015; Bernaudin et al. 2019). Enfin une couronne de fibrose est le plus souvent associée à la périphérie du granulome en organisation lamellaire concentrique, pouvant progresser jusqu'à une hyalinisation complète du granulome et vers une extension dans les tissus-hôtes. L'épaisseur de cette couronne paraît être en rapport avec l'âge du granulome (Figure 9).

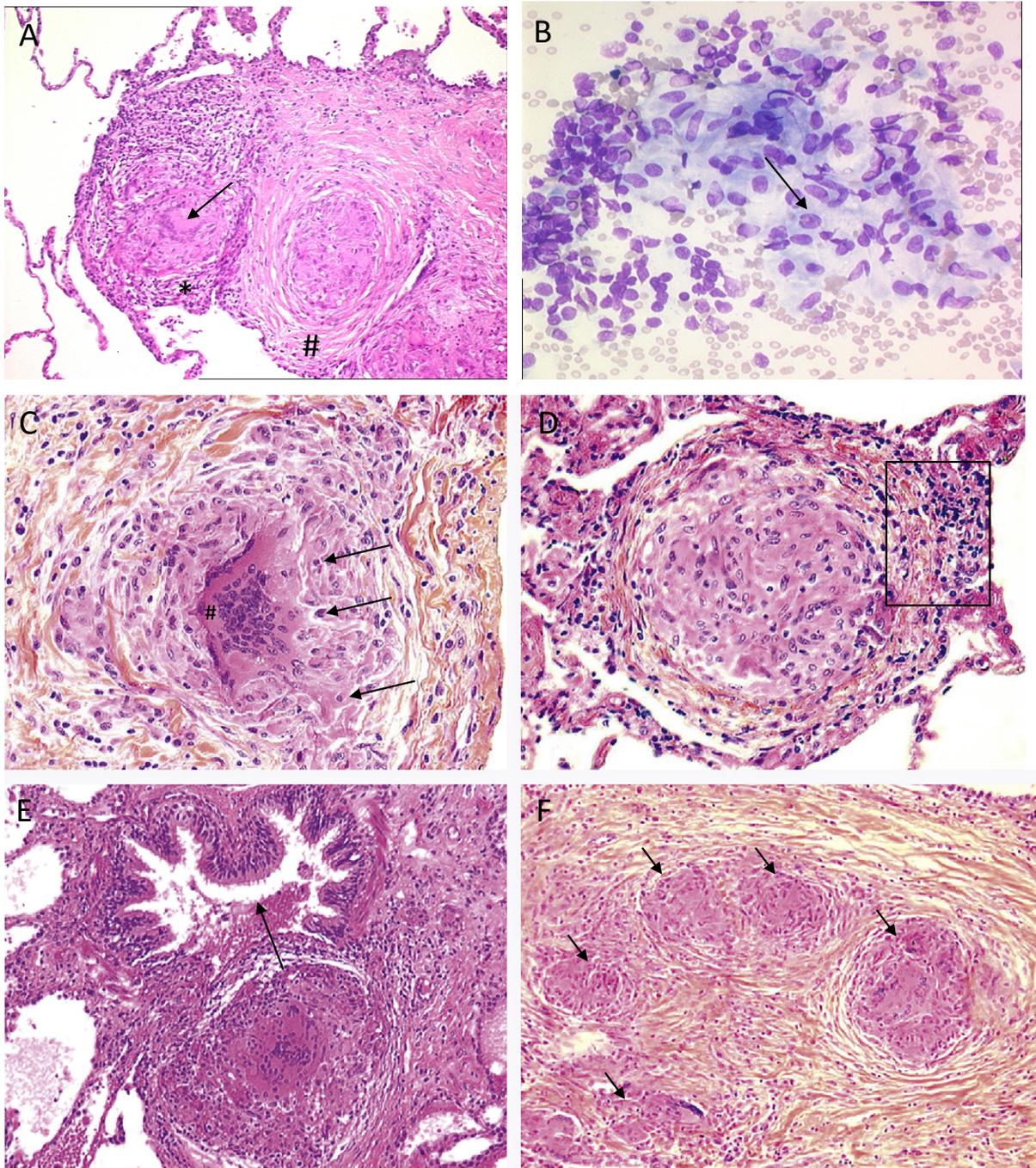


Figure 9: Exemples de granulomes observés dans plusieurs situations de granulomes médiastino-pulmonaires (A ; C-E) Coloration hématoxyline éosine et (C,D,F) safran de biopsies pulmonaires de patients atteints de sarcoïdose (A) Deux granulomes pulmonaires d'âges différents, un « jeune » entouré d'une couronne lymphocytaire (*) et l'autre plus ancien entouré d'une couronne fibreuse (#). La flèche montre une cellule géante de Langhans. (B) granulome d'un ganglion médiastinal obtenu par aspiration transbronchique à l'aiguille fine lors d'une écho-endoscopie bronchique. La flèche montre des cellules épithélioïdes. Coloration May-Grünwald-Giemsa. (C) Granulome typique sarcoïdien composé d'une cellule géante centrale (#) et entouré de cellules épithélioïdes (flèche). (D) Granulome pulmonaire entouré d'une couronne fibreuse de collagène et lymphocytes (encadré) ; (E) Paroi d'une bronchiole (flèche) dont la lumière est diminuée de calibre en raison d'un granulome sarcoïdien. (F) Cinq « vieux » granulomes (flèches) coalescents entourés de couronnes fibrotiques. (A ; C-E) issus du Dr Marianne Kambouchner (département d'anatomopathologie Hôpital Avicenne) (B) issu du Dr Jocelyne Fleury-Feith, (département d'Histologie-biologie tumorale Hôpital Tenon).

Les granulomes sont des structures métaboliquement actives. Par exemple ils produisent l'enzyme de conversion de l'angiotensine du système rénine angiotensine (Silverstein, Pertschuk, et Friedland 1979), la 1 α -hydroxylase qui convertit la 25-hydroxy vitamine D (25-(OH)D) en forme active 1,25-dihydroxy vitamine D(1,25(OH)₂D) (Kamphuis et al. 2014) ou la *parathyroid hormone-related protein* (PTH-rP) pouvant induire une hypercalcémie (Kamphuis et al. 2014). Ces propriétés métaboliques sont illustrées par la captation du ¹⁸F-FDG possiblement liée à l'augmentation de l'expression du transporteur du glucose GLUT-1 dans les cellules immunitaires et au cours de la sarcoïdose (Talreja et al. 2019; Kubota et al. 1992; Brewer et al. 2008) et à un effet Warburg (glycolyse aérobie) défini par une augmentation de la glycolyse et une diminution de la phosphorylation oxydative (Wilson, Mayr, et Weichhart 2019). L'effet Warburg a initialement été observé dans les cellules cancéreuses qui augmentaient leur consommation de glucose avec production d'acide lactique même en présence d'oxygène (Warburg 1956). Ce changement de métabolisme a également été associé aux macrophages polarisés de type M1 (activation classique par des cytokines pro inflammatoires ou produits microbiens) (cf chapitre 2.3.1.1.4) (Nonnenmacher et Hiller 2018) et retrouvé dans des modèles murins *in vivo* de tuberculose (Shi et al. 2015).

2.2 Exemple du granulome sarcoïdien pulmonaire

Le poumon est l'organe le plus fréquemment atteint dans la sarcoïdose. Les granulomes sarcoïdiens prédominent dans les régions supérieures des poumons et ont la particularité d'être organisés le long des trajets lymphatiques (plèvre, septa interlobulaires, axes bronchovasculaires) (Bernaudin et al. 2019). La plupart des granulomes sarcoïdiens intra et périlobulaires sont associés en conglomérats et au contact d'un ou plusieurs lymphatiques (Kambouchner et al. 2011; Soler et al. 1976). Les granulomes intra-lobulaires sont également associés à un réseau lymphatique intra lobulaire récemment mis en évidence (Kambouchner et al. 2011). Les lymphatiques pulmonaires interviennent dans la régulation du drainage du liquide alvéolaire, et de ce fait des particules inhalées (organiques ou non) avec un impact possible dans la pathogénie de la sarcoïdose (Kambouchner et al. 2011; Izbicki et al. 2007). Ces lymphatiques permettraient également aux cellules de l'immunité, lymphocytes et monocytes, de transiter entre la périphérie du granulome et les ganglions médiastinaux (Soler et al. 1976; Kambouchner et al. 2011)

Les granulomes sont également retrouvés dans les voies aériennes, en particulier dans la muqueuse des bronchioles, pouvant obstruer totalement la lumière bronchique/bronchiolaire

(Figure 9). Ils peuvent enfin être localisés le long des parois extérieures des vaisseaux pulmonaires. En revanche les capillaires sanguins sont absents ou altérés au centre des granulomes, avec des cellules endothéliales endommagées et un collapsus des capillaires. Les capillaires sanguins fonctionnels ne sont donc présents qu'en périphérie du granulome (Figure 10). Dans ces capillaires transitent des hématies, monocytes et lymphocytes (Soler et al. 1976).

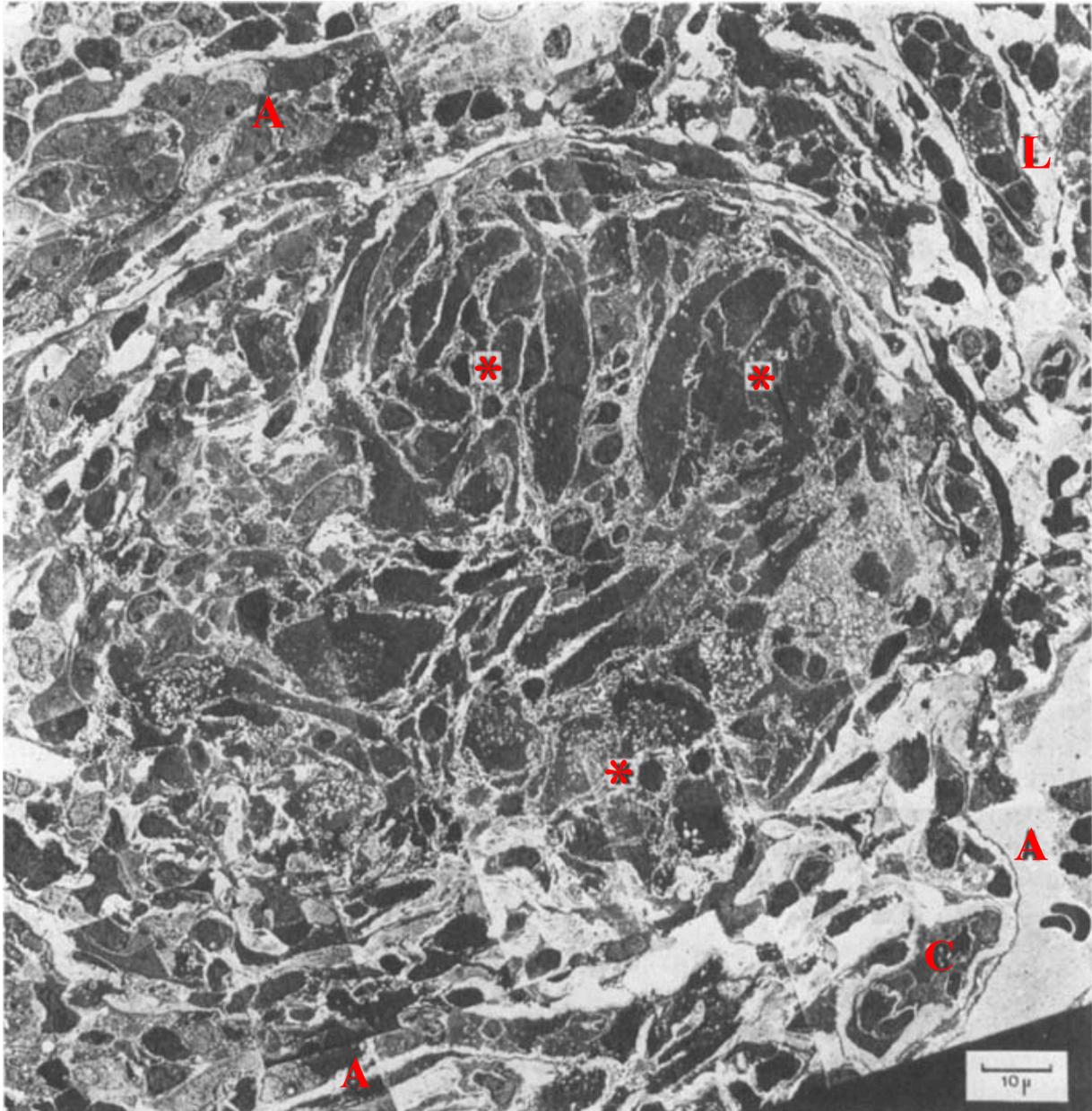


Figure 10: Montage d'une section de granulome pulmonaire en microscopie électronique par transmission
Adapté de (Soler et al. 1976) A = alvéoles, L = lymphatiques,
C = capillaires, and * = subdivision du follicule

Une particularité des granulomes pulmonaires est d'être entourés d'une couronne fibreuse avec des dépôts lamellaires de collagène (Xu, Kligerman, et Burke 2013). Les granulomes pulmonaires sarcoïdiens peuvent être très florides et s'agréger les uns aux autres entraînant une

fibrose pouvant être massive (Bernaudin et al. 2019; Rossi, Cavazza, et Colby 2015; Travis et al. 2002) (Figure 9). Comme nous le verrons plus loin au chapitre 2.3.2, la formation de granulomes est précédée d'une phase inflammatoire sous forme d'alvéolite et d'inflammation interstitielle (Hunninghake 1985; Rosen et al. 1978; Lacronique et al. 1983). Une inflammation peut être également observée associée aux granulomes obstruant les bronchioles (Rossi, Cavazza, et Colby 2015).

2.3 Dynamique de formation et physiopathologie du granulome sarcoïdien

2.3.1 Les acteurs cellulaires

2.3.1.1 Macrophages, cellules épithélioïdes, cellules géantes

2.3.1.1.1 Définitions

Un des acteurs principaux intervenant dans la formation et la constitution du granulome est le macrophage et les cellules qui en dérivent. Le terme de macrophage fut prononcé la première fois à la fin du 19^e siècle par Elie Metchnikoff, père de l'immunité cellulaire, suite à ces observations sur des larves d'étoiles de mer auxquelles il faisait « engloutir » des épines de rosier (Gordon 2016a). **Les macrophages** sont une population de globules blancs infiltrant les tissus et dont la principale fonction est la phagocytose, leur nom provient du grec : *μάκρος*, *makros* = *grand* et *φαγεῖν*, *phagein* = *manger*. Les macrophages matures ont une grande taille (20 à 50µm) et sont dotés de nombreux organites cytoplasmiques, reflétant probablement leur augmentation en capacités phagocytaire, microbicide et sécrétoire (Adams 1976) (Figure 11). Contrairement aux monocytes qui ont une demi-vie relativement courte (2-3 jours), celle des macrophages est de plusieurs jours à plusieurs mois. Les macrophages constituent une population extrêmement hétérogène, pouvant adopter une morphologie, une fonction et un phénotype particuliers notamment en fonction de leur localisation (macrophages alvéolaires du poumon, cellules de Küpffer du foie, ostéoclastes de l'os...), de leur environnement cellulaire et cytokinique et de leur origine (cellules auto répliquées d'origine embryonnaire versus cellules dérivées de monocytes) (Gordon et Martinez-Pomares 2017). Ces cellules s'adaptent aux exigences physiologiques de l'organisme ou situations pathologiques et sont extrêmement plastiques (Mosser et Edwards 2008). Dans le tissu conjonctif, les macrophages sont également nommés histiocytes.

Dans les granulomes « immuns », les macrophages présents en périphérie hors du granulome proprement dit possèdent de nombreux phagosomes et phagolysosomes contenant des débris cellulaires, alors que les macrophages du follicule n'ont pas ou très peu de phagosomes mais

présentent des organites développées (appareil de Golgi, lysosomes, réticulum endoplasmique et mitochondries) (Soler et al. 1976), suggérant des fonctions et un degré de maturation différents.

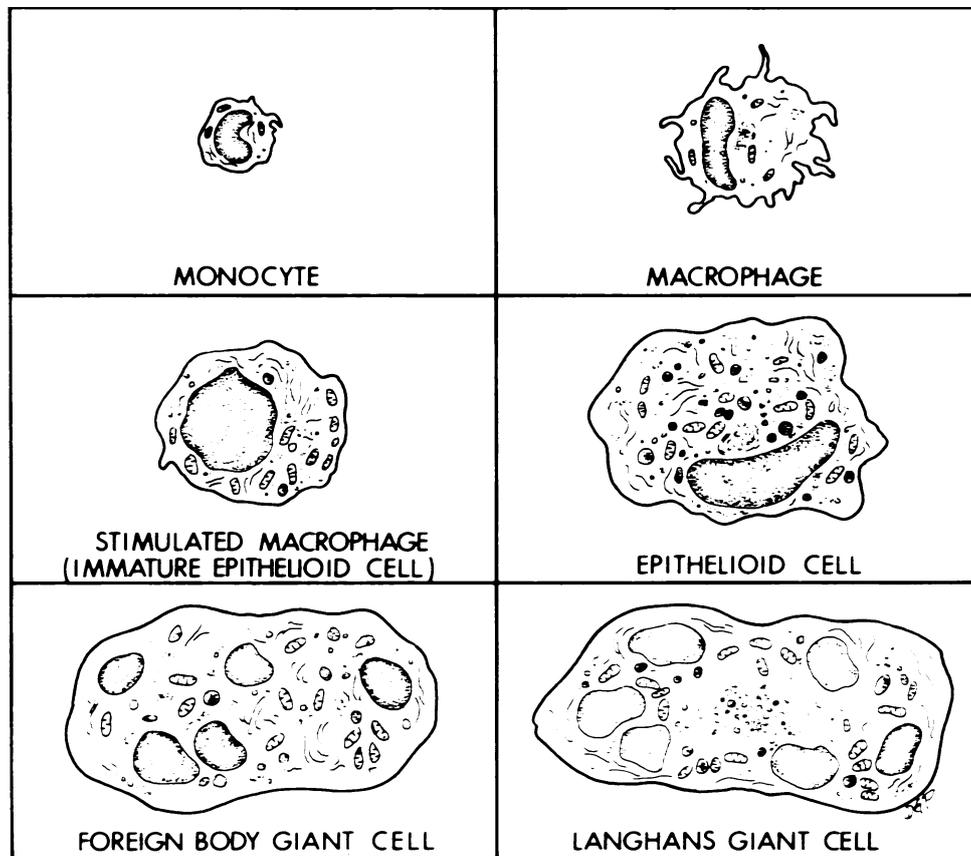


Figure 11: représentation schématique de la morphologie des différents éléments du système phagocytaire mononucléé

Adapté de (Adams 1976). *Stimulated macrophage* : macrophage stimulé ; *epithelioid* : épithélioïde, *Foreign body giant cell*: cellule géante à corps étranger; *Langhans giant cell*: cellule de Langhans

Les cellules épithélioïdes proviennent de la transformation des macrophages et de leur activation (Adams 1976). Elles tiennent leur nom de leur ressemblance très lointaine dans leur forme avec les cellules épithéliales et du fait d'organisation juxtaposée des cellules d'où leur appellation d'épithélioïdes. Les cellules épithélioïdes sont de grande taille, aux limites cytoplasmiques peu nettes possédant un noyau ovalaire, excentré à chromatine peu condensée (Pagán et Ramakrishnan 2018). Les cellules présentent de nombreuses projections cytoplasmiques interdigitées, un profil non phagocytaire (absence de phagolysosome) mais sécrétoire avec un métabolisme actif (Soler et al. 1976). Ces cellules n'ont pas de marqueurs spécifiques de surface mais expriment le CD68 (marqueur de la lignée monocyttaire et macrophagique) (Ueda-Hayakawa et al. 2013). Les cellules épithélioïdes ont une fonction sécrétoire prédominante avec l'expression entre autre du $TNF\alpha$ (Yanagishita et al. 2007; Myatt et al. 1994), du $TGF\beta 1$ (Shigehara et al. 1998) de la cathepsine K, une protéase probablement

impliquée dans la formation des granulomes (Bühling et al. 2001), de l'ECA (Stanton et al. 2003) ou l'ostéopontine qui pourrait jouer un rôle dans la régulation de la migration des macrophages tissulaires, l'adhérence cellulaire et les fonctions cellulaires, y compris la phagocytose (Carlson et al. 1997).

Les cellules géantes multinucléées pourraient être la résultante d'une fusion cellulaire de cellules épithélioïdes et jouer un rôle dans des mécanismes d'apoptose au sein du granulome (van Maarsseveen, Vos, et van Diest 2009). Néanmoins, une équipe a récemment retrouvé qu'un signal persistant et activant les TLR2 conduirait à la formation de cellules géantes multinucléées par division cellulaire en induisant un stress réplicatif et en activant la réponse aux dommages de l'ADN, comme ce qui peut être observé dans des pathologies tumorales (Herrtwich et al. 2016). Le γ H2AX, marqueur de dommage à l'ADN est exprimé dans les cellules géantes multinucléées de granulomes sarcoïdiens (Herrtwich et al. 2016). Les cellules géantes multinucléées sont définies par un nombre de noyaux supérieur ou égal à 3, ces noyaux sont parfois disposés de façon aléatoire (à corps étranger) ou disposé en périphérie en forme de fer à cheval (cellule de Langhans) (Adams 1976) (Figure 11). La fonction des cellules géantes est obscure et d'autant plus dans la sarcoïdose. Ces cellules conserveraient dans des modèles *in vivo* et *in vitro* leur activité phagocytaire et microbicide et sécrèteraient des cytokines (IL-1 α , TNF α et TGF- β) contribuant à la dynamique cellulaire des granulomes (Hernandez-Pando et al. 2000). Les cellules géantes sont capables de séquestrer des matériaux non dégradables ou des agents pathogènes persistants et de générer des espèces réactives de l'oxygène via une activation de leur NADPH oxydase, entraînant une inflammation, la destruction de l'agent pathogène et participerait à la fusion cellulaire (Hernandez-Pando et al. 2000).

2.3.1.1.2 Origine des cellules constituant le granulome pulmonaire

Le macrophage appartient au système des phagocytes mononucléés, ensemble de cellules dérivées de la moelle hématopoïétique intervenant dans le développement, le nettoyage, les défenses anti-pathogènes, et l'inflammation (van Furth, Raeburn, et van Zwet 1979). Ce système comprend les précurseurs médullaires, les monocytes circulants, les macrophages résidents et les cellules dendritiques (Guilliams et al. 2014). Les macrophages sont classés en fonction de leur origine, soit dérivés de précurseurs embryonnaires/fœtaux qui s'auto-renouvellent en grande partie localement et persistent tout au long de la vie, soit de monocytes sanguins adultes qui se développent à partir de cellules souches progénitrices hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Misharin et al. 2017). Dans le poumon, deux populations macrophagiques résidentes ont été identifiées : les macrophages alvéolaires et les macrophages

résidents du secteur interstitiel. Les macrophages alvéolaires ont principalement une origine embryonnaire, mais en cas d'agression pulmonaire des macrophages intra alvéolaires dérivés de monocytes circulants sont recrutés (Misharin et al. 2017; Morales-Nebreda et al. 2015). L'origine des macrophages interstitiels est moins bien étudiée et probablement mixte. A l'état stable ils proviennent en partie du recrutement de monocytes sanguins classiques par le biais d'un monocyte intermédiaire pulmonaire et en partie de l'entretien local ; une origine embryonnaire, semble plus incertaine (Liegeois et al. 2018; Evren, Ringqvist, et Willinger 2020).

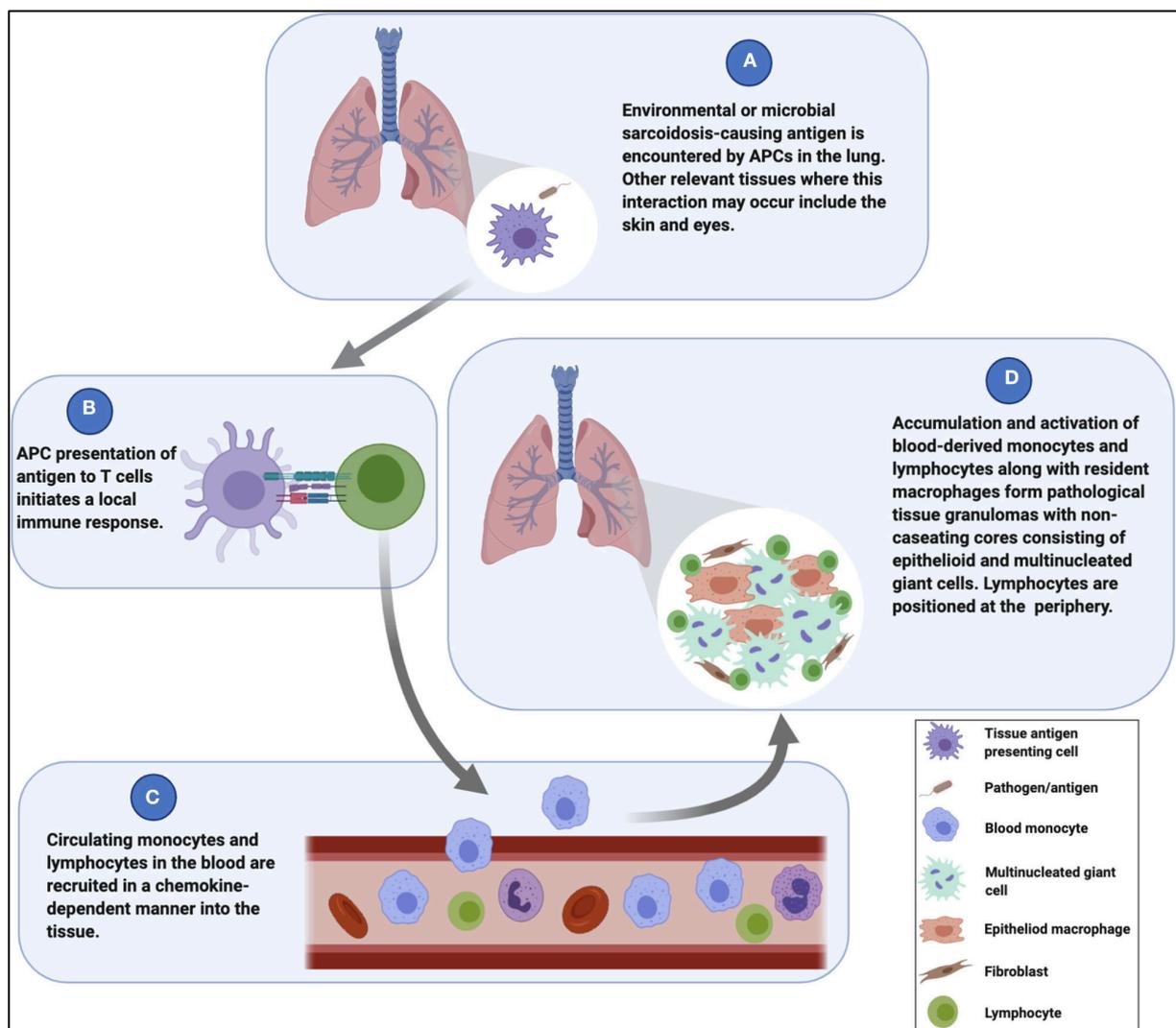


Figure 12: Mécanismes sous-jacents à l'initiation et à l'évolution de la formation de sarcoïdose granulomateuse impliquant les cellules périphériques

Lorsqu'ils sont activés par un signal de danger (par exemple, des antigènes bactériens) (figure A), les monocytes établissent leur résidence dans le tissu pulmonaire. La présentation ultérieure d'antigènes aux cellules T par les monocytes ou les cellules présentatrices d'antigène résidant dans le tissu (figure B) entraîne une réponse immunitaire localisée qui stimule le recrutement et l'activation de monocytes et de lymphocytes circulants dans le tissu (figure C). Le granulome précoce commence à être assemblé par ces cellules infiltrées avec les cellules

résidant dans le tissu pour éliminer l'agent pathogène et protéger l'hôte (figure D). Ainsi, les PBMC sont essentielles à la formation de granulomes dans les poumons et dans d'autres tissus également. Adapté de (Locke, Schlesinger, et Crouser 2020)

L'origine des macrophages constituant le granulome n'est pas élucidée. Plusieurs éléments suggèrent que les cellules constituant le granulome seraient issues des monocytes circulants (Locke, Schlesinger, et Crouser 2020; Lepzien et al. 2019; 2021; Broos et al. 2013)(Figure 12). Dans le poumon, il est possible que des cellules présentatrices d'antigène, telles que les macrophages alvéolaires en interface avec les antigènes initient la réaction inflammatoire avec la sécrétion de nombreuses cytokines comme le TNF α ou des chimiokines (Broos et al. 2013; Fehrenbach et al. 2003; Zissel et Müller-Quernheim 2015) et l'activation des lymphocytes T (Venet et al. 1985; Lem et al. 1985). Une alvéolite lymphocytaire T fait ainsi partie des premières étapes dans la maladie (*cf* chapitre 2.3.2). Le rôle des macrophages alvéolaires est très probablement local, ces cellules ne passant probablement pas la barrière alvéolo-capillaire. L'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence comme l'*Intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) (Dalhoff et al. 1993) permettant de se lier aux molécules endothéliales pour transmigration, pourraient au cours de la sarcoïdose favoriser les agrégations entre macrophages (Sasaki et al. 2001) et augmenter la réponse inflammatoire locale (Fehrenbach et al. 2003).

Les monocytes sont des cellules provenant de progéniteurs médullaires gardant la capacité de se différencier dans les tissus périphériques en macrophages et/ou cellules dendritiques en particulier au cours de diverses infections ou réactions inflammatoires. Longtemps considérés uniquement comme une étape vers les macrophages, on leur reconnaît récemment des fonctions spécifiques au cours de l'inflammation. Il existe trois populations monocytaires : les monocytes « classiques » (CD14+, CD16-) population majoritaire en situation physiologique (>90%), « intermédiaires » (CD14+/CD16+) et « non classiques » (CD14 low, CD16+) (Kapellos et al. 2019). Les monocytes classiques circulent dans le sang et migrent dans les tissus où ils se différencient en monocytes intermédiaires et non-classiques (Patel et al. 2017). Les monocytes classiques et intermédiaires sont des producteurs importants de cytokines pro-inflammatoires tandis que les non-classiques ont un rôle d'immuno-surveillance (Idzkowska et al. 2015). Comme précédemment dit dans le chapitre 1.4.3, les monocytes et cellules dérivées des monocytes chez les patients atteints de sarcoïdose sont présents dans les différents compartiments thoraco-pulmonaires (ganglions, bronches, alvéoles) (Lepzien et al. 2019) et ont été observés dans les vaisseaux présents en périphérie du granulome (Soler et al. 1976). Ces cellules ont probablement des capacités migratoires importantes, expriment des marqueurs de maturité tels que HLA-DR et CD80 (Lepzien et al. 2019) et ont un potentiel sécrétoire important

(Lepzien et al. 2021). D'autre part, les monocytes circulants sont considérés comme étant probablement à l'origine des macrophages et cellules épithélioïdes constituant le granulome. En effet, chez des patients atteints de sarcoïdose ayant eu une transplantation pulmonaire et ayant développé secondairement sur le greffon une récurrence de leur sarcoïdose, les granulomes étaient constitués en majorité de cellules du receveur signant l'origine périphérique et circulante des cellules constituant le granulome (Ionescu et al. 2005; Milman et al. 2005).

2.3.1.1.3 Fonctions générales du macrophage et dans le poumon

Fonctions générales

Les rôles du macrophage sont multiples et variés, ses principales propriétés étant la phagocytose, associée à la présentation antigénique, et une capacité sécrétoire. Certaines fonctions du macrophage dépendent de sa localisation (recyclage du fer dans la rate, érythropoïèse dans la moelle, thermogénèse dans la graisse, régulation du surfactant dans l'alvéole)(Gordon et Martinez-Pomares 2017).

Ce sont des cellules mobiles, qui disposent d'un large éventail de **récepteurs** membranaires permettant de reconnaître et répondre à des ligands dérivés de l'hôte ou des ligands étrangers. Cette reconnaissance entraîne l'activation des fonctions effectrices, comme la phagocytose et la production de cytokines, de chimiokines et d'autres médiateurs nécessaires à la destruction du microbe et à la coordination de la réponse inflammatoire. Les macrophages disposent (Gordon et Martinez-Pomares 2017; Gordon 2016b) : (i) de molécules d'adhérence, par exemple intégrines pour l'interaction avec la matrice extra cellulaire ; (ii) des PRR comme les TLR capables de reconnaître des PAMPS ou des DAMPS et activant le macrophage (*cf* chapitre 1.4.3) ; (iii) des récepteurs pour induire la phagocytose et la clairance de particules des microorganismes et des cellules apoptotiques. Ces récepteurs sont de type à opsonines (récepteurs au Fc des Ig ou récepteurs aux fractions du complément) ou des récepteurs non opsonines agissant comme des PRR, telles que les molécules « *lectin like recognition molecules* » ou des récepteurs *scavengers* (éboueurs) (par exemple CD36) (Gordon 2016b). Les récepteurs participant à la phagocytose travaillent en collaboration avec les récepteurs TLR pour amplifier la signalisation cellulaire induite (Gordon 2016b; Kawai et Akira 2011); (iv) ou des récepteurs pour l'endocytose de ligands solubles. Les macrophages sont également capables de reconnaître des séquences ADN d'agents microbiens pour induire par exemple la voie de l'inflammasome (Guo, Callaway, et Ting 2015).

La phagocytose est le résultat de l'internalisation puis de la destruction des microorganismes ingérés, ce qui, par la suite, entraîne une présentation antigénique et le développement de la

réponse adaptative. L'ensemble des récepteurs phagocytaires coopèrent pour la formation d'une synapse phagocytaire en permettant aux récepteurs kinases d'initier la signalisation et le remaniement du cytosquelette (Jaumouillé et Grinstein 2016). Suite à l'endocytose, les microorganismes sont séquestrés dans une vacuole appelée phagosome primaire. Le phagosome peut fusionner sélectivement avec les lysosomes entraînant son acidification ou les produits du réticulum endoplasmique ou le complexe de Golgi pour former le phagolysosome secondaire. Le phagolysosome est également acide grâce à l'action de la V-ATPase (*Vacuolar-type H-ATPase* permettant la translocation d'ions H⁺) (Gordon 2016b; Uribe-Querol et Rosales 2017). La maturation du phagolysosome entraîne la production de monoxyde d'azote (NO), de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dépendant de la NADPH oxydase ou encore de peptides et protéines antimicrobiens (défensines, lactoferrine, protéases...) (Gordon 2016b; Uribe-Querol et Rosales 2017). L'acidification progressive a pour conséquence la perméabilisation de l'enveloppe des particules phagocytées, l'oxydation de l'ADN, la digestion puis le recyclage des membranes. Suite à la dégradation, le contenu peut quitter la vacuole afin que les antigènes microbiens soient présentés par le CMH (Gordon et Martinez-Pomares 2017).

Il ne faut pas confondre la phagocytose avec l'autophagie qui n'est pas un mécanisme spécifique du macrophage et correspond à la séquestration de portions de cytoplasme contenant des organites affaiblis à détruire. Cette vacuole se nomme auto-phagosome. Le contenu sera dégradé par des enzymes lysosomales après fusion du phagosome et des lysosomes (Deretic 2016).

En plus de la phagocytose, l'interaction récepteurs/microbes sur les macrophages permet le déclenchement des fonctions effectrices adaptées. En effet, les macrophages ont une **fonction sécrétoire** importante et produisent de nombreuses molécules qui contribuent, à l'inflammation comme des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-12) et des chimiokines (CXCL1, CXCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11) permettant le recrutement d'autres cellules effectrices et la mise en place de la réponse adaptative (Arango Duque et Descoteaux 2014). Les macrophages sont également capables de ralentir la réponse inflammatoire (IL-10 ; TGF- β 1) et de participer au remodelage de la matrice extracellulaire par la sécrétion de facteurs de croissance (VEGFA, PDGF-BB, TGF β -1, FGF), protéases (*matrix metalloproteinase* (MMP 2, MMP 9)) et inhibiteurs de protéases (*Tissue inhibitor of metalloproteinase* TIMP1) (Braga, Agudelo, et Camara 2015; Selman et al. 2000; Wynn et Vannella 2016). Les macrophages produisent également des ROS ou des espèces réactives de

l'azote (RNS) (reflets de l'activité phagocytaire) , des débris cellulaires reflète de la clairance des cellules apoptotiques (Gordon et Martinez-Pomares 2017).

Dans le poumon, les macrophages alvéolaires en raison de leur position sont de véritables sentinelles et des cellules clés dans la réponse protectrice contre les bactéries, virus et infections fongiques. Ceci est rendu possible grâce à leur PRR et leur capacité phago-lysosomale. Les macrophages alvéolaires peuvent aussi orchestrer le recrutement de neutrophiles et des monocytes via la libération de l'IL1- β qui induit la production de CXCL8 par l'épithélium (Mowat, Scott, et Bain 2017). A l'inverse, ils disposent de récepteurs permettant de réguler négativement la réponse inflammatoire, comme le *signal regulatory protein α* SIRP1- α inhibant la phagocytose, ou des récepteurs de TGF β 1 et IL-10 et le CD200R permettant de maintenir un environnement anti-inflammatoire (Hussell et Bell 2014). A l'état stable les macrophages résidents interstitiels sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, ou du PDGF- β et régulent la prolifération des fibroblastes (Mowat, Scott, et Bain 2017).

Les macrophages alvéolaires participent également à l'homéostasie du poumon en régulant le niveau du surfactant pulmonaire, complexe proteolipidique synthétisé et sécrété par l'épithélium alvéolaire (Forbes et al. 2007). Ils maintiennent l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire en se débarrassant des cellules sénescents, des cellules apoptotiques qui peuvent libérer des médiateurs de l'inflammation et des particules inhalées (Mowat, Scott, et Bain 2017).

Les macrophages ont un rôle très important dans la réparation/remodelage tissulaire et dans la restauration de l'intégrité des tissus après un épisode inflammatoire (Mowat, Scott, et Bain 2017). Après une agression pulmonaire, il a été montré dans un modèle murin que les macrophages intervenant dans ces processus de réparation, impliqués dans les processus de fibrogénèse, étaient ceux dérivés des monocytes circulants (Misharin et al. 2017).

2.3.1.1.4 Polarisation macrophagique

La plasticité et l'hétérogénéité fonctionnelle sont des avantages majeurs du macrophage qui peut s'adapter à son environnement ; la stimulation des récepteurs du macrophage entraîne une modification du phénotype de la cellule. La polarisation des macrophages a été initialement subdivisée en deux sous-types, les macrophages M1 d'activation classique et les macrophages M2 d'activation dite alternative (Mantovani, Sica, et Locati 2005). Expérimentalement, des modèles *in vitro* d'activation ont été mis au point : **les macrophages classiques M1** proviennent de la stimulation du macrophage par les lipopolysaccharides (LPS), des produits de phagocytose, l'INF γ . La réponse du macrophage M1 activé est pro-inflammatoire avec la

production de NO (synthétisé grâce à l'*inducible nitric oxide synthases* (iNOS)), d'H₂O₂, TNF α , IL6, IL1, IL-12 et peu d'IL-10 induisant une réponse Th1 associée à une capacité de phagocytose et antimicrobienne accrue. Les macrophages M1 expriment fortement les molécules de présentation antigénique CMH-II, les molécules de co-stimulation CD80, CD86. Ils produisent des chimiokines impliquées dans le recrutement de Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) (Viola et al. 2019; Mantovani, Sica, et Locati 2005; Murray et al. 2014). Il existe également une augmentation de la glycolyse accompagnée d'une diminution de la consommation d'oxygène. En effet, les macrophages M1 au cours de la phagocytose, utilisent la glycolyse et la voie des pentoses phosphates pour la production de leur adenosine triphosphate (ATP) tandis que la voie de la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras sont diminués (Viola et al. 2019). Ceci est équivalent à un effet Warburg. Enfin les facteurs de transcription induits et associés au phénotype M1 sont l'*hypoxia inducible factor 1* (HIF-1), STAT1, STAT3, NF κ B (p65) (Viola et al. 2019).

Les **macrophages M2 dont l'activation est dite alternative** proviennent de l'activation *in vitro* par l'IL4 ou l'IL13, des cytokines secrétées notamment par les lymphocytes Th2. La réponse des macrophages M2 est anti inflammatoire et médiée par la production de l'IL-10 ou du TGF- β 1. Ce type de macrophage jouerait également un rôle dans le remodelage tissulaire et la réparation tissulaire qui suivrait une réponse inflammatoire (Braga, Agudelo, et Camara 2015). L'activité de l'arginase est augmentée ainsi que la phosphorylation oxydative et la beta oxydation des acides gras. Les marqueurs de surface, CD206, CD163 ou CD36 sont surexprimés. Ils ont aussi une action pro-angiogénique en produisant du VEGF-A, PDGF-BB et IL-8. Le profil induit par l'IL4 et IL13 est défini comme M2a. (Viola et al. 2019). D'autres sous-types de macrophages ont été mis en évidence selon les cytokines induisant leur polarisation (M2b, M2c, M2d ou *tumor associated macrophages*) (Mantovani et al. 2004). Néanmoins, il est difficile de transposer ce comportement cellulaire *in vitro* comme ce qui a été fait pour les lymphocytes en raison de la très grande plasticité des macrophages. Cette classification simplifiée ne reflète probablement pas l'adaptation du macrophage face à la complexité de l'environnement tissulaire, cellulaire, cytokinique auquel le macrophage est confronté. Mosser et al. propose une classification spectrale autour de 3 activités du macrophage : la défense de l'hôte, la réparation/cicatrisation et la régulation de la réponse immunitaire (Mosser et Edwards 2008). Les nouvelles techniques, par exemple le séquençage ARN sur cellule unique, permettrait de « phénotyper » au mieux ces cellules dans leur environnement (Saliba et al. 2016).

2.3.1.2 *Lymphocytes impliqués dans le granulome sarcoïdien*

La réponse immunitaire adaptative apparaît plus tardivement et constitue le support de la mémoire immunologique. Les lymphocytes B et T reconnaissent des antigènes par des récepteurs exprimés de façon clonale, appelés, « *B-cell receptor* » (BCR) et TCR respectivement. La première exposition à l'antigène, a pour conséquence la différenciation de lymphocytes naïfs en lymphocytes effecteurs et en lymphocytes mémoires. La réponse des lymphocytes mémoires, suite à une seconde exposition au même antigène sera plus efficace. Les cellules effectrices exercent, au cours d'une réponse immunitaire, diverses fonctions comme (i) la sécrétion de cytokines (lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires) ; (ii) la destruction de cellules hôtes infectées par des pathogènes (lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques) ; ou encore (iii) la sécrétion d'anticorps (via les lymphocytes B) (Marshall et al. 2018). Les lymphocytes T naïfs sont activés par trois signaux, le premier médié par le CMH et son peptide, le deuxième entre les molécules de co-stimulation et de co-inhibition et le troisième signal par les cytokines environnantes. Les lymphocytes T CD4⁺ ont trois grands rôles : la stimulation des cellules de l'immunité innée, l'activation des lymphocytes B et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en lymphocytes cytotoxiques capables de lyser des cellules tumorales ou infectées par un virus (Marshall et al. 2018).

On distingue les LT auxiliaires ou « helper », en fonction du panel de cytokines qu'ils produisent (Figure 13). Les Th1 sont identifiés notamment par l'expression de T-bet et produisent de l'IFN- γ qui active les macrophages pour éliminer les pathogènes. Les Th2 jouent un rôle dans la présentation des allergènes, favorisent l'immunité contre les parasites par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13, et sont régulées par le facteur de transcription GATA3. Ils interviennent également dans les mécanismes fibrosants (Zhang et Zhang 2020). Les Th17 sécrètent de l'IL-17A, l'IL-21, l'IL-22, expriment le facteur de transcription principal ROR γ t, et favorisent l'inflammation en réponse aux infections. Les Tregs suppriment la fonction effectrice des acteurs de l'immunité par la sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 et TGF- β 1 ou par via des molécules de contrôle inhibitrices telles que CTLA-4. Les Th17 ont été incriminés dans des mécanismes d'auto-immunité, carcinogenèse et l'immunité antitumorale, tandis que les Tregs sont essentiels à la tolérance immunitaire et il a été démontré qu'ils atténuent l'auto-immunité et l'immunité antitumorale (Knochelmann et al. 2018).

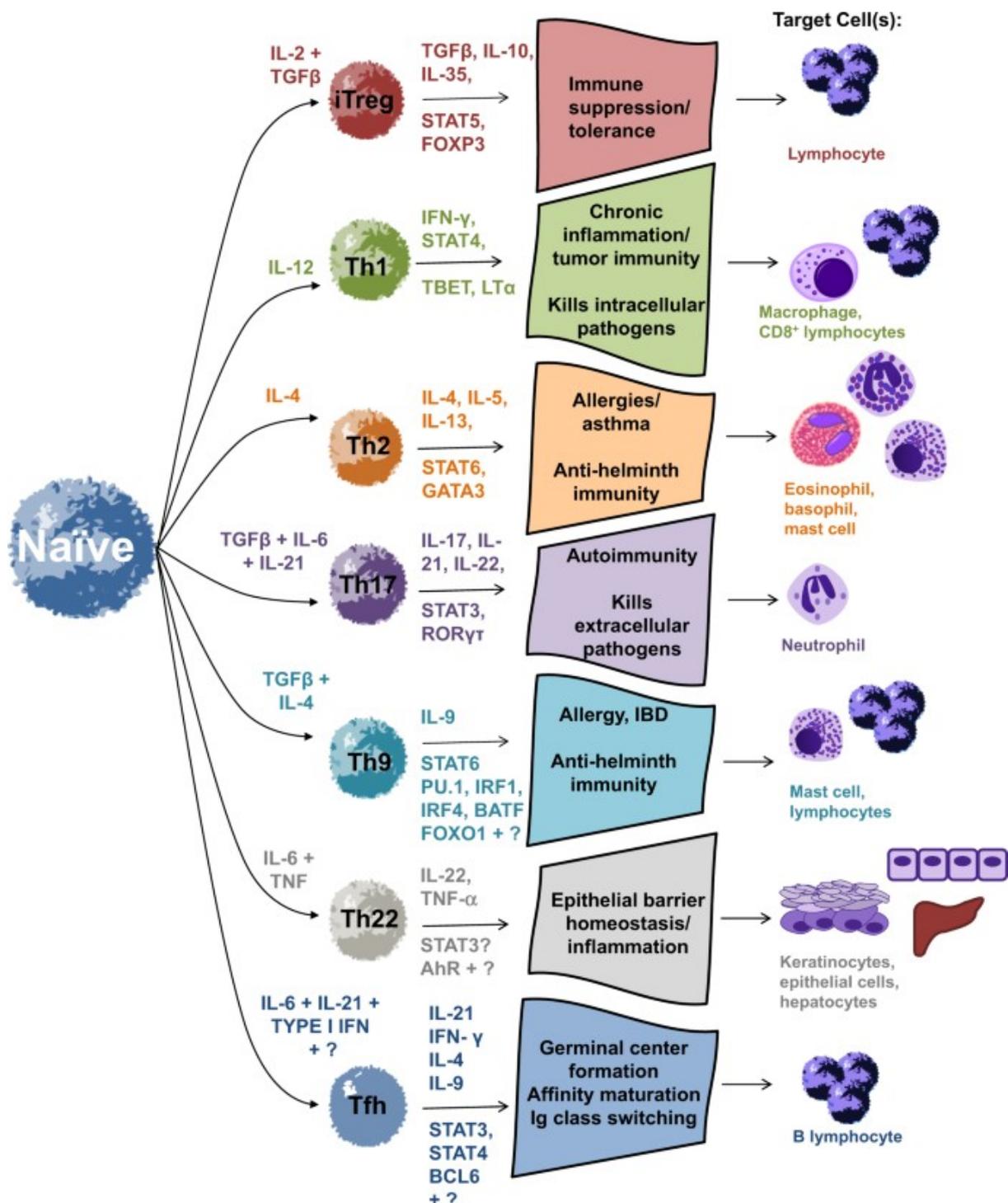


Figure 13: Sous-populations lymphocytaires CD4+

Les lymphocytes T CD4+ se différencient par la présence de diverses cytokines. Sous l'influence de l'IL-2 et du TGF-β, les cellules Treg développent et expriment les facteurs de transcription STAT5 et Foxp3 et les cytokines TGF-β et IL-10. L'IL-12 influence le développement des cellules Th1 et favorise l'immunité en présence de l'IFN-γ, STAT4, T-bet et LTα. La différenciation des cellules Th2 est induite par l'IL-4, au cours de laquelle la libération de cytokines peut se manifester dans les allergies ou l'asthme. Le développement des cellules Th17 se produit sous l'influence du TGF-β, de l'IL-6 et de l'IL-21. L'IL-1β et l'IL-23 maintiennent la stabilisation des cellules Th17 pendant l'expansion clonale. Lors de la différenciation, les cellules Th17 sont le plus souvent classées selon leur expression de RORγt et STAT3. Les cellules Th9, Th22 et T follicular helper (Tfh) ont été décrites récemment, et les facteurs de transcription contrôlant leur différenciation sont toujours en débat.

Adapté de (Knochelmann et al. 2018)

Au cours de la sarcoïdose, il existe probablement un déséquilibre (de proportion et de fonction) entre les différentes populations lymphocytaires B et T (hyperlymphocytose T au LBA), entre les différentes populations et sous-populations lymphocytaires T (hyperlymphocytose au LBA TCD4+/CD8). De même il existe probablement un déséquilibre entre les différences de répartition lymphocytaire dans l'organisme (lymphopénie périphérique sanguine et hyperlymphocytose au LBA). Un premier élément classique de la maladie est la présence d'une lymphopénie T périphérique associée à l'existence d'une hyperlymphocytose T dans les biopsies et le LBA avec une prédominance T CD4+ par rapport aux T CD8+ (Shamaei et al. 2018; Shen et al. 2016). Dans le sang des patients, il existe une augmentation des populations lymphocytaires mémoires et effectrices T CD4+ associées à une diminution des populations naïves (Lee et al. 2011).

Classiquement, la pathogénie de la sarcoïdose serait liée à une réponse inappropriée de type Th1 par rapport à une réponse Th2 ((Broos et al. 2013; Zhou et Arce 2020; Grunewald et al. 2019). En effet, chez les patients il existe une augmentation des cytokines impliquées dans la voie Th1 : IL12, TNF α IFN- γ et IL-18 dans le LBA mais sans variation de l'IL4 ou de l'IL13 cytokines impliqués dans la réponse Th2 (Moller et al. 1996; Prasse et al. 2000; Tsiligianni et al. 2005; Shigehara et al. 2000) et contrastant avec une absence de variation des cytokines Th1 dans le sang périphérique (Prasse et al. 2000). On observe également une augmentation du facteur de transcription Tbet dans les cellules du LBA corrélée avec les taux d'IFN- γ et du récepteur CXCR3 préférentiellement exprimé sur les Th1 (Kriegova et al. 2011). Possiblement, en réponse à la sécrétion d'IFN- γ , les macrophages alvéolaires et les cellules épithélioïdes des granulomes sécrètent des chimiokines de type CXCL9, CXCL10, CXCL11, se liant au CXCR3 et attirant les lymphocytes Th1 (Nishioka et al. 2007). Ces chimiokines sont également élevées dans le sang (Arger et al. 2019; 2020). Dans un modèle murin de granulomatose, le blocage de CXCR3 et CCR5 (récepteur également présent sur les lymphocytes Th1) prévient la formation de granulomes (Kishi et al. 2011).

Les Th17 jouent un rôle essentiel à la surface des muqueuses, en assurant la protection contre les bactéries et les agent fongiques pathogènes et en contribuant à la régulation du microbiote (Honda et Littman 2016). Les Th17 sont également à l'origine de la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes (McGeachy, Cua, et Gaffen 2019). Au cours de la sarcoïdose, une augmentation des Th17 dans le sang et le LBA a été observée. Les Th17 étaient identifiés en cytométrie de flux par l'expression de l'IL17A et/ou la présence de ROR γ t (Ten Berge et al. 2012; Huang et al. 2013, 1). En cas d'inflammation, les lymphocytes Th17 peuvent

se convertir en lymphocytes pathogéniques produisant de l'IFN- γ . Ce type de lymphocytes est nommé Th17.1, exprime simultanément deux récepteurs de chimiokines CCR6, molécule exprimée préférentiellement par Th17, et CXCR3, un des marqueurs proposés pour les cellules Th1 (Ramstein et al. 2016). Ces Th17.1 sont retrouvés en plus grand nombre dans le LBA et les ganglions médiastinaux de patients atteints de sarcoïdose et en proportion plus importante par rapport aux Th17 (Ramstein et al. 2016; Broos, Koth, et al. 2018). Dans le sang, en revanche il existe une prédominance Th17 par rapport aux Th17.1 (Ramstein et al. 2016). Comme les cellules T CD4⁺ Th1, les cellules T CD4⁺ Th17.1 sécrètent fortement de l'IFN- γ . et pourraient être responsable de la majeure partie de la sécrétion de cette cytokine dans la sarcoïdose (Ramstein et al. 2016). Les Th17.1 sécrètent également la cytokine pro-inflammatoire IL-17A, mais à des niveaux bien inférieurs à ceux des Th17 (Ramstein et al. 2016). Selon Broos et al. les Th17 circulants modifient leur phénotype en Th17.1 lors de leur passage dans des zones d'inflammation chronique du poumon ou des ganglions (Broos, Koth, et al. 2018).

Dans la majorité des cas, la sarcoïdose évolue spontanément favorablement, suggérant que la réponse immunitaire pourrait être régulée à la baisse. Les lymphocytes T avec une telle fonction sont nommés lymphocytes T régulateurs (Tregs) et sont identifiés par leur expression de l'IL-2R (CD25) et du facteur de transcription FOXP3. La fonction des Tregs et leur proportion au cours de la sarcoïdose sont très probablement déséquilibrées. Miyara et al. ont pu mettre en évidence une accumulation de cette population cellulaire en périphérie des granulomes mais également dans le sang et le LBA de patients présentant une sarcoïdose active (Miyara et al. 2006). De façon similaire, Broos et al. retrouvait un nombre élevé de Tregs dans le sang et le LBA de patients atteints de sarcoïdose active mais également dans les formes chroniques (Broos, van Nimwegen, In 't Veen, et al. 2015). Par contre, une autre équipe retrouvait une réduction de la proportions de Tregs dans le LBA et le sang de patients atteints de formes chroniques et également actives (Idali et al. 2008).

L'action des Tregs est probablement modifiée au cours de la sarcoïdose. Miyara et al. ont montré que les lymphocytes gardaient leurs capacités antiprolifératives mais ne permettaient pas de diminuer la production de TNF α (Miyara et al. 2006). La même équipe, dans un modèle *in vitro* de granulome, a montré que la déplétion en Treg accélère la formation de granulome quand il s'agit de cellules issus de sujets sains mais est sans conséquences lorsqu'il s'agit de cellules issus de sujets avec une sarcoïdose active (Taflin et al. 2009). Ceci suggère une perte de l'activité anti-proliférative des Tregs en cas de sarcoïdose active (Taflin et al. 2009). Une autre équipe a pu mettre en évidence une diminution de l'activité antiproliférative des Tregs

au cours de la sarcoïdose, mais pas d'action sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (Oswald-Richter et al. 2013).

D'autres cellules impliquées dans l'immunité adaptative pourraient possiblement être impliquées au cours de la sarcoïdose comme une augmentation des lymphocytes T CD8+ exprimant la perforine et des granzymes, associée à des formes non résolutive ; les NKT, les *T follicular helper* (Tfh), ou les lymphocytes B. Néanmoins, les données concernant ces populations sont rares et peu claires au cours de la sarcoïdose (Zhou et Arce 2020).

2.3.2 Réaction inflammatoire précédant la formation du granulome

Une réaction inflammatoire précède la formation du granulome. Le test de Kveim qui consistait à injecter en intradermique du matériel issu de rate ou de ganglions de patients atteints de sarcoïdose est un modèle permettant d'illustrer ce phénomène. Ce test diagnostique permettait d'observer 2 à 3 semaines après l'injection, une papule spécifiquement chez les patients atteints de sarcoïdose à l'inverse de patients atteints de tuberculose, syphilis ou béryllose (Rogers et Haserick 1954). Biopsiée, cette papule consistait en la formation de granulomes épithélioïdes. Cette technique a été abandonnée en raison du risque de transmission d'agents pathogènes comme les prions responsables de la maladie de Creutzfeld-Jacob. Un travail portant sur l'analyse histologique de biopsies itératives cutanées entre J3 et J42 après le test de Kveim a permis d'appréhender la dynamique de formation des granulomes (Rogers et Haserick 1954). De J3 à J6, une phase inflammatoire intense avec un infiltrat dense périvasculaire de monocytes et macrophages matures se constitue, associé à une zone centrale de dégénérescence du collagène infiltrée par des polynucléaires. A J10 apparaissent des cellules d'allure épithélioïde et des cellules géantes à distance des vaisseaux. Les lymphocytes apparaissent secondairement à J13 en périvasculaire. A J16 s'esquisse la formation de granulomes encore mal formés, puis bien compacts à J25 entourés de lymphocytes. Les granulomes se « dénudent » progressivement de leur couronne lymphocytaire, et peuvent persister jusqu'à 9 mois indifférenciables de ceux de la sarcoïdose (Rogers et Haserick 1954). Dans ces biopsies, il est intéressant de noter une réaction non linéaire entre la réaction inflammatoire et la présence de granulomes d'âges différents. Cette réaction inflammatoire comme première étape dans la formation du granulome est à mettre en relation avec la présence d'une alvéolite précédant la formation de granulomes pulmonaires (Lacronique et al. 1983) et serait prédictif d'une dégradation de la fonction respiratoire (Keogh et al. 1983). L'hyperlymphocytose dans le LBA est également plus importante chez les patients présentant un stade I de la classification de Scadding que chez ceux avec un stade III (Capelli et al. 2002). L'infiltration pulmonaire

interstitielle inflammatoire est présente de façon significativement plus importante au cours des stades I et la densité de l'infiltration décroît à mesure que l'infiltration granulomateuse croît (Rosen et al. 1978). Les macrophages sont les cellules prédominantes dans les phases initiales de constitution du granulome, représentant ainsi une cellule clef à cette phase (Rosen et al. 1978).

2.3.3 Formation du granulome et mécanismes de pérennisation

Les mécanismes menant à la formation du granulome, sa pérennisation ou sa résolution sont probablement multiples et non élucidés.

L'inflammation chronique est un phénomène qui pérennise et entretient la formation granulomateuse. Cette inflammation est notamment médiée par les monocytes et macrophages. La production de TNF α par les macrophages intra-alvéolaires d'origine monocyttaire (Lepzien et al. 2021) ou par les macrophages alvéolaires (Ziegenhagen et al. 2002) est associée à des formes chroniques de la maladie. Les macrophages alvéolaires sarcoïdiques produisent fortement de nombreuses cytokines IFN- γ , MIP-1 α , GM-CSF (Oltmanns et al. 2003), mais aussi en cas de forme chronique des chemokines CCL15, *macrophage stimulating protein* (MSP) (stimulant la phagocytose) (Arakelyan et al. 2009), *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) ou RANTES (Petrek et al. 2002). De façon générale, les monocytes et macrophages sécrètent également des chimiokines de type CXCL9, CXCL10, CXCL11 qui attirent les Th1. Les formes chroniques sont associées à des élévations sériques de CXCL11, CXCL10 ce dernier est corrélé au déclin fonctionnel respiratoire et CXCL9 corrélé au nombre d'organes atteints (Arger et al. 2019; 2020). De plus, les macrophages participent à l'activation des lymphocytes notamment via une modulation de leur molécules HLA dont les polymorphismes peuvent être associés à des formes résolutives ou chroniques (Grunewald et Eklund 2009; Sato et al. 2010). Les lymphocytes en retour via la sécrétion d'IFN- γ diminuent l'apoptose des macrophages en augmentant l'expression de p21/Waf1 (*cyckin dependaent kinase inhibitor 1*) qui bloque le cycle cellulaire (J et al. 2003, 21). La sécrétion de ces cytokines par le macrophage pourrait être liée à une dérégulation de récepteurs activant les macrophages, comme les TLR dont certains polymorphismes sont associés à des formes chroniques (Pabst et al. 2006). Des dérégulations des voies de signalisation du macrophages (cf chapitre 1.4.1) telles que la voie mTOR (Linke et al. 2017), les voies de l'inflammasome (Huppertz et al. 2020), JAK-STAT (Wang et al. 2020), celle du *Peroxisome proliferator-activated receptor-g* (PPAR γ) (Culver et al. 2004) ou IRAK2 et rip2 (Talreja et al. 2016) pourraient participer à cette

inflammation chronique et à la pérennisation des granulomes. La voie mTORC1 était significativement enrichie en cas de formes progressives de sarcoïdose pulmonaire (Linke et al. 2017). Néanmoins une étude plus récente portant sur 58 patients montrait que la voie mTOR était impliquée dans la formation du granulome mais n'était pas corrélée avec la sévérité ou la chronicité de la maladie (Pizzini et al. 2021).

Les macrophages alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose présentent une déficience dans la voie de PPAR γ , facteur de transcription régulant les gènes de l'adipogénèse mais aussi induisant une réponse anti inflammatoire (Culver et al. 2004). Une diminution de ABCG1 (transporteur ABC du cholestérol régulé par PPAR γ) a également été mise en évidence dans les macrophages alvéolaires de patients et pourrait être à l'origine d'une accumulation de cholestérol intracellulaire induisant une inflammation (Barna et al. 2016).

La cohésion des composants du granulome est probablement multifactorielle. Un phénotype épithélial a été observé dans les cellules épithélioïdes et les cellules géantes multinucléées exprimant l'E-cadhérine membranaire dans le cas granulomes cutanés de sarcoïdose (Wanat et al. 2014). Dans un modèle de poisson-zèbre infecté par une mycobactérie, les macrophages forment entre eux des jonctions adhérentes via l'E-cadhérine, des desmosomes, et des jonctions serrées pendant la formation du granulome (Cronan et al. 2016). La perturbation de la fonction de l'E-cadhérine dans les macrophages entraîne une désorganisation du granulome et un meilleur accès aux autres cellules immunitaires et la destruction de l'agent pathogène (Cronan et al. 2016).

Le **déséquilibre de la réponse lymphocytaire** entre les différentes sous populations des T auxillaires Th participe probablement à la pérennisation du granulome.

Le rôle dans la pathogénie de la sarcoïdose des Th17 et Th17.1 est complexe. Facco et al. ont trouvé une augmentation des Th17 et des macrophages sécrétant de l'IL-17 dans le LBA de formes actives contrairement aux formes inactives (Facco et al. 2011).

Dans le LBA de formes chroniques, les Th17.1 étaient augmentés au détriment des Th1 et des Th17 (Broos, Koth, et al. 2018). Une autre population CCR6+ double positive (CCR4+CXCR3+) intermédiaire entre les Th17 et Th17.1 hautement proliférante en cas de sarcoïdose a également été mise en évidence (Broos, Koth, et al. 2018, 1). Des lymphocytes équivalents à des Th17.1 (présentant à la fois des marqueurs Th17 et Th1) dans l'étude de Kaiser et al. étaient par contre associés à des formes résolutives (*i.e.* Syndrome de Löfgren). Mais ces cellules avaient la particularité de sécréter moins d'IFN- γ , et plus d'IL-17A dans les formes résolutives que dans les formes chroniques (Kaiser et al. 2016). Ces éléments suggèrent

une plasticité de la réponse Th17 et Th1, Th17.1 qui peut à la fois s'accompagner d'une résolution de la pathologie ou d'une chronicité (Miedema et al. 2018).

Un déséquilibre de la balance entre les **Tregs et la famille des Th17** serait également un facteur de pérennisation de l'inflammation et du granulome. Le ratio Th17/Treg dans le sang et le LBA est élevé en cas de forme active, ce ratio diminue en cas de traitement (Huang et al. 2013). Une augmentation du rapport Th17/Treg dans le sang périphérique est associée à des rechutes de sarcoïdose après l'arrêt de la corticothérapie, tandis qu'une diminution du rapport Th17/Treg dans le sang périphérique signale une rémission (Liu et al. 2016). Les formes résolutes sont accompagnées d'une restauration de la fonction suppressive des Tregs (Oswald-Richter et al. 2013).

Ce déséquilibre Th17/Treg pourrait être lié à une augmentation de l'apoptose des Tregs dans les formes actives (Broos, van Nimwegen, Kleinjan, et al. 2015) ou à la modification de récepteurs de surface modulant l'activation des lymphocytes T comme CTLA4 ou ICOS. Le CTLA4 est exprimé par les lymphocytes T et transmet un signal inhibiteur. Une réduction de l'expression de CTLA4 a été mise en évidence sur les Th17, les cellules double positives (CCR4+CXCR3+) mais également les Tregs dans les ganglions de patients atteints de sarcoïdose (Broos, Koth, et al. 2018; Broos, van Nimwegen, In 't Veen, et al. 2015). La diminution de CTLA4 sur les Th17 pourrait d'une part augmenter la prolifération de ces cellules et d'autre part réduire l'effet supprimeur des Tregs. En effet, CTLA4 est important dans la fonction répressive des Tregs (Walker et Sansom 2011). L'ICOS est une protéine de la membrane lymphocytaire qui favorise de manière préférentielle la production d'IL-10, augmentant ainsi l'efficacité des fonctions des cellules Treg. Les patients atteints du syndrome de Löfgren présentaient des niveaux plus élevés de ICOS sur leur Tregs (Sakthivel et al. 2016). Ces observations suggèrent qu'une réponse Treg intacte pour résoudre l'inflammation associée à la sarcoïdose est essentielle à la guérison, tandis qu'un Treg dysfonctionnel ne parvient pas à supprimer les réponses pro-inflammatoires.

Une **transition vers une réponse Th2** pourrait également participer à la chronicité de la maladie mais moins d'éléments étayent cette hypothèse, les données étant parfois contradictoires. Il existe une augmentation de *thymus and activation regulated chemokine* (TARC) dans le sérum de patients ayant des formes sévères (Nguyen et al. 2018). TARC est connu pour induire un phénotype Th2, et serait sécrété par les monocytes intermédiaires au cours de la sarcoïdose (Kishimoto et al. 2020). Au contraire, l'IL-13 est augmentée dans le sang et le LBA de patients de stades 0 et I de Scadding et pourraient avoir une action anti inflammatoire en réduisant la sécrétion de TNF α (Hauber et al. 2003)

La pérennisation du granulome pourrait être paradoxalement liée à une réponse immunitaire inefficace avec un épuisement de la réponse T. Une mauvaise présentation antigénique, une mauvaise stimulation des lymphocytes, ou une dysfonction des lymphocytes ne permettrait pas de générer des clones T efficaces et l'absence de dégradation de(s) l'antigène(s) ayant pour conséquence la poursuite de la croissance des granulomes (Grunewald et al. 2019; Zhou et Arce 2020). La dysfonction des Th1 pourrait être causée par une augmentation des signaux co-inhibiteurs comme CTLA4 ou PD-1, un signal TCR anormal, ou la diminution de molécules de co-stimulation sur les lymphocytes T comme CD40L (Lee et al. 2011; Braun et al. 2014; Hawkins et al. 2017; Oswald-Richter et al. 2013).

Dans les formes persistantes, au contraire des formes résolutive, il existe un « épuisement » des lymphocytes T CD4⁺ dans le LBA et le sang, avec une diminution de leur prolifération, une augmentation de leur apoptose et une augmentation de PD-1 (Oswald-Richter et al. 2013; Hawkins et al. 2017) ou de CTLA4 (Lee et al. 2011). Le blocage de PD-1 permet de restaurer les diverses fonctions du lymphocyte T CD4⁺ (Braun et al. 2014).

La stimulation du TCR dans les formes persistantes entraîne une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , ou IL2) par rapport aux formes résolutive (Oswald-Richter et al. 2013; Hawkins et al. 2017). Cette diminution de la réponse est associée à une diminution de la *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck), de la protéine kinase C- θ et de NF- κ B, médiateurs clefs de la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2 (Oswald-Richter et al. 2013). De même, la diminution de la sous unité p65 de NF- κ B sur les lymphocytes T a été retrouvée dans des formes fibrosantes pulmonaires et associée à des atteintes chroniques actives (Lee et al. 2011).

L'interaction de CD40L, présent sur les LTCD4⁺ avec CD40 sur les macrophages induit l'activation du LTCD4⁺, la production d'IL-12 ainsi que la différenciation Th1. Chez les patients avec une forme chronique les cellules T présentent une faible expression de CD40L possiblement en lien avec de faibles niveaux du *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Lee et al. 2011).

2.3.4 Évolution fibrosante

Le processus fibrotique est la conséquence d'une activation et d'une prolifération des fibroblastes, menant à la production des constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène. Au cours de la sarcoïdose, les mécanismes conduisant au développement de la fibrose sont très mal compris, les études étant concentrées sur les mécanismes des phases

précoces ou ceux favorisant la pérennisation du granulome. Le processus fibrotique semble être le continuum de l'inflammation granulomateuse, les modifications fibrotiques débutant majoritairement autour du granulome (Xu, Kligerman, et Burke 2013). Les données actuelles ne permettent cependant pas de conclure si la fibrose peut survenir à distance de l'inflammation granulomateuse et si elle dépend de mécanismes de dérégulation de la réparation cellulaire, et/ou si une inflammation persistante est requise pour induire une fibrose progressive (Patterson et al. 2012; Gupta et Baughman 2020). Les études sur explants pulmonaires de patients transplantés pour des cas de sarcoïdose pulmonaire ont pu montrer dans la majorité des cas une inflammation granulomateuse persistante et des lésions de fibrose différenciables de celles de la pneumopathie interstitielle commune (PIC), notamment par la topographie des lésions centrales et l'absence de foyers fibroblastiques jeunes (Xu, Kligerman, et Burke 2013; Shigemitsu et Azuma 2011; Zhang et al. 2016). De plus, une inflammation interstitielle chronique majeure peut persister et pourrait être associée à des formes plus rapidement progressive (Shigemitsu et Azuma 2011).

Néanmoins, des observations anatomopathologiques ont retrouvé des formes fibrosantes dépourvues de granulomes (Shigemitsu et Azuma 2011) et des associations possibles avec des profils histologiques de PIC (Nobata et al. 2006; Shigemitsu et Azuma 2011). Dans cette situation, une cicatrisation anormale pourrait être à l'origine d'une fibrose. Une autre possibilité serait que certains patients pourraient développer une autre maladie pulmonaire distincte de la sarcoïdose expliquant la fibrose, selon une hypothèse considérée à l'issue d'une récente série clinique (Collins et al. 2018) (Figure 14).

Peu de données sont disponibles concernant la pathogénie de la fibrose dans la sarcoïdose. Les mécanismes possibles, pourraient être (i) une augmentation des cytokines profibrosantes comme le VEGF, PDGF-AB, FGF2 dont les taux sériques élevés étaient associés à des formes fibrosantes (Tuleta et al. 2018), ou le TGF β dont le rôle est incertain, (ii) une transition M2/Th2 (iii) une influence de l'environnement, (iv) une modification du fonctionnement des fibroblastes et de la régulation de la matrice extra cellulaire par les MMPs.

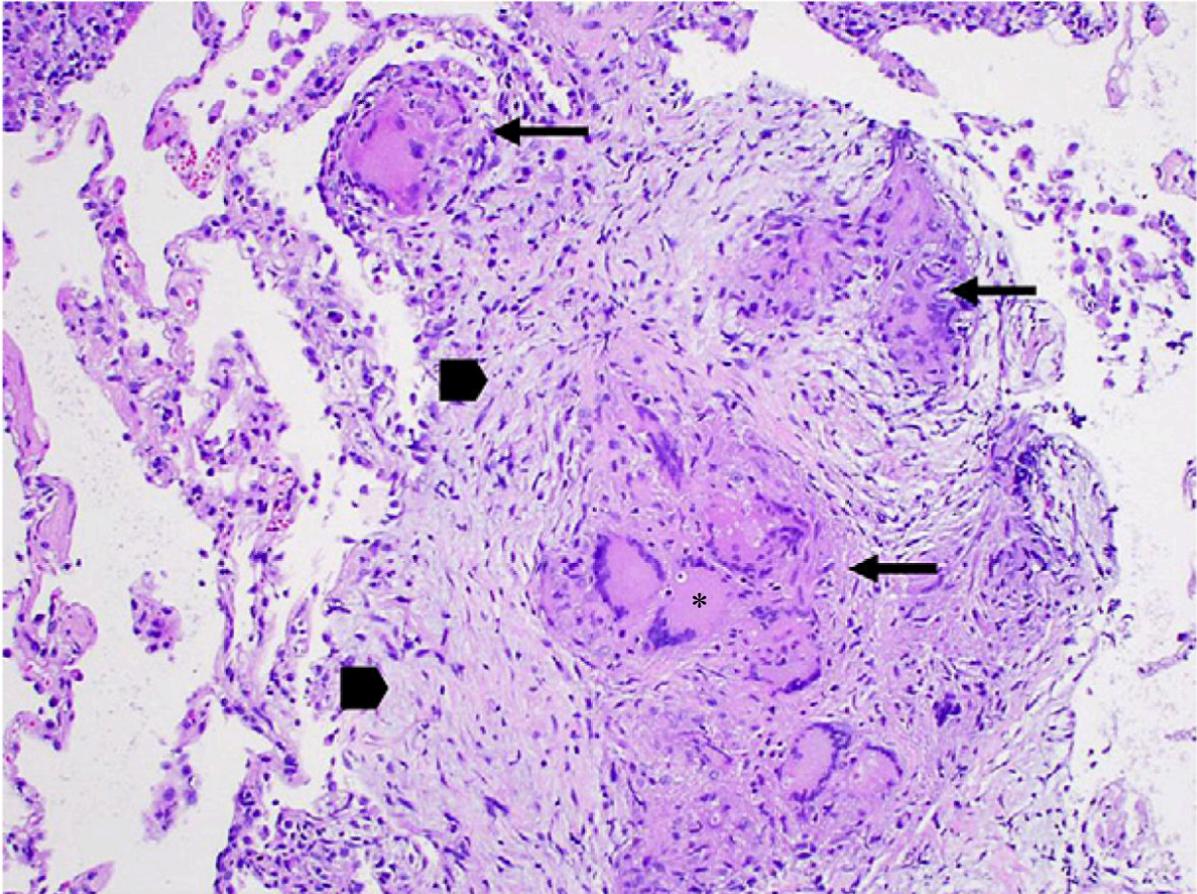


Figure 14: Lésions anatomopathologique de fibrose sarcoidienne pulmonaire
Biopsies transbronchiques montrant des granulomes bien formés (flèches longues) entourés par une par une fibrose avec dépôts de collagène autour de fibroblastes (flèches larges), (*) cellules géantes de Langhans. Il existe une inflammation interstitielle dans le tissu alvéolaire environnant. Image issu de (Patterson et al. 2012)

2.3.4.1 Rôle du TGF β

Le TGF β a un rôle complexe puisqu'il intervient à la fois dans l'homéostasie tissulaire, la diminution de l'inflammation mais a également un rôle clef dans les phénomènes de réparation tissulaire et les processus fibrotiques. Le TGF β agit sur le recrutement des fibroblastes, leur activation, leur différenciation en myofibroblastes et sur la production secondaire de collagène (Patterson et al. 2012). Malgré ce rôle pro-fibrotique, l'augmentation de TGF β 1 dans les tissus (Pabst et al. 2011; Zissel et al. 1996) ou dans le sang (Mirsaeidi et al. 2018) est associée à des formes de bon pronostic et résolutive de sarcoïdose suggérant, qu'à des stades initiaux de la maladie, le TGF β est anti-inflammatoire. Une autre étude a montré en revanche que le taux de TGF β dans le LBA était augmenté dans les formes de sarcoïdose associées à une fonction pulmonaire altérée (Salez et al. 1998). Alors que les polymorphismes de TGF β 1 sont associés avec des formes de bon pronostic (Pabst et al. 2011), des polymorphismes de l'isoforme TGF β 3 sont associés à des formes fibrosantes (Kruit et al. 2006). Il existe également des

polymorphismes de *GREM1* associés aux formes fibrosantes de sarcoïdose (Heron et al. 2011). *GREM1* code pour Gremlin1 une protéine inhibitrice de *bone morphogenic protein* BMP2 et BMP4 régulateurs de la régénération tissulaire et inhibiteurs des effet profibrotiques de TGFβ (Heron et al. 2011). Le TGFβ1 est exprimé par les cellules épithélioïdes de granulomes sarcoïdiens, et plus particulièrement dans les granulomes matures que dans les granulomes jeunes (Shigehara et al. 1998). Chez des patients atteints de sarcoïdose mais comme chez des patients atteints de FPI, les lymphocytes TCD4+ PD-1+ sanguins sont la principale source de TGFβ1 parmi les lymphocytes T CD4+ (Celada et al. 2018). Les cellules T CD4+ PD-1+ produisent à la fois TGF-β et l'IL-17A suite à l'activation de STAT3. La co-culture de lymphocytes T CD4+ avec des fibroblastes pulmonaires humains induit la production de collagène-1 ; tandis que le blocage de la voie PD-1 diminue sensiblement l'expression de STAT3, TGF-β et IL-17A, avec des réductions simultanées du collagène-1 (Celada et al. 2018).

2.3.4.2 Polarisation M2/Th2 et fibrose

Les macrophages pourraient être impliquées dans les processus de réparation et de fibrose grâce à un changement de leur polarisation. Une hypothèse serait qu'à un stade initial les macrophages présentent une polarisation de type M1, pro inflammatoire et induisant la formation du granulome et que l'évolution vers un phénotype de polarisation M2 soit à l'origine de la progression de la maladie et de l'évolution fibrosante (Cinetto et al. 2020). Dans les granulomes, des macrophages porteurs de marqueurs de polarisation M2 ont été mis en évidence dans le muscle, les ganglions, la peau, dans les macrophages alvéolaires de patients atteints de fibrose pulmonaire et dans des modèles *in vitro* de granulome utilisant des PBMC de patients atteints de sarcoïdose (Shamaei et al. 2018; Locke et al. 2019; Preusse et al. 2015; Isohisa et al. 2020). Les macrophages alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose fibrosante produisent plus de chimiokines de type CCL18, surtout s'ils ont une activation de type alternative par des cytokines de type Th2, entraînant un phénotype M2 (Prasse et al. 2006). CCL18 aurait une action profibrosante en stimulant la production de collagène par les fibroblastes et pourrait être impliqué dans la fibrose pulmonaire ou musculaire (Prasse et al. 2006; Chen 2016; Prokop et al. 2011). L'analyse des voies de signalisation a retrouvé une implication et une surexpression des voies liées à l'IL-13 dans les modèles *in vitro* de granulomatose et les tissus pulmonaires et ganglionnaires (Locke et al. 2019). L'IL-13 est associée à une réponse Th2 et à une activation alternative M2. En revanche une autre étude n'a

pas mis en évidence de modification des marqueurs de polarisation entre les macrophages alvéolaires de sujets sains et ceux de patients atteints de sarcoïdose (Wikén et al. 2010).

Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une transition Th1 vers une réponse Th2 pouvant favoriser l'apparition de fibrose, en augmentant la prolifération des fibroblastes et les dépôts de matrice extra cellulaires (Lukacs et al. 2001) et en induisant un phénotype M2 des macrophages (Zhou et Arce 2020; Patterson et al. 2012). Néanmoins, très peu de données étayent cette hypothèse au cours de la sarcoïdose. Le taux sérique d'IL5, une cytokine Th2, était significativement plus élevé dans les formes fibrosantes pulmonaires que dans les formes non fibrosantes pulmonaires (Patterson et al. 2012).

2.3.4.3 Rôle environnemental sur la fibrose

Une analyse par *microarray* sur biopsies transbronchiques a comparé le profil d'expression génique de patients atteints de FPI avec des cas de fibrose associée à une sarcoïdose ou de pneumopathie d'hypersensibilité. Un enrichissement des gènes liés à l'activation et la prolifération cellulaire en rapport avec les défenses de l'hôte contre un agent extérieur était associé à la sarcoïdose. Le profil d'expression génique des patients atteints de sarcoïdose présentait plus de similarités avec la pneumopathie d'hypersensibilité qu'avec la FPI (Lockstone et al. 2010)

Dans des modèles murins de granulomatose pulmonaire, il a été montré que la répétition au cours du temps de l'exposition antigénique (par exemple par le *P. acnes*) (Jiang et al. 2016), ou l'administration d'antigènes différents favorisait la pérennisation des granulomes pulmonaires et l'évolution vers la fibrose (Malur et al. 2019). Plus récemment, l'immuno-réactivité à la silice et/ou aux métaux semble être associée à l'apparition d'une fibrose pulmonaire (Beijer et al. 2021).

2.3.4.4 Fibroblastes et MMP

Les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de sarcoïdose présentent un phénotype caractérisé par un index de prolifération supérieur à celui des patients atteints de FPI. En cas de stimulation par des cytokines pro-inflammatoires de type IFN γ ou l'IL-1 β , la prolifération des fibroblastes est diminuée mais ils présentent un phénotype sécrétoire avec la production d'IL-6, connu pour ses propriétés pro-fibrotiques (Tamura et al. 1998; Le et al. 2014). Dans le LBA de patients atteints de fibrose *pulmonaire* sarcoïdienne, une augmentation de l'activité globale

des collagénases, et des taux MMP1, MMP8, MMP9 ont été observés ce qui pourrait initier la destruction du collagène et induire un remodelage menant à une fibrose (Henry et al. 2002).

3. Hypoxie et sarcoïdose

Les facteurs intervenant dans l'initiation et la progression de la sarcoïdose notamment vers la fibrose sont mal compris. Il a été observé que les granulomes pulmonaires sont peu vascularisés en leur centre laissant suggérer que les cellules s'y trouvant sont en hypoxie (Kambouchner et al. 2011). Cependant l'impact du facteur micro-environnemental hypoxique au cours de la sarcoïdose n'a jamais été étudié.

3.1 Hypoxie généralités

Au cours de l'Évolution, l'oxygène étant devenu indispensable à la production d'énergie par les mitochondries sous forme d'adénosine triphosphate, il a été nécessaire que les organismes se dotent de réponses adaptatives pour maintenir une homéostasie cellulaire relative au niveau d'oxygénation requis. Certains petits organismes primaires (*Salpingoeca rosetta*) s'adaptent par exemple en augmentant leur mobilité à la recherche d'un environnement plus oxygéné (Kirkegaard et al. 2016). Chez les vertébrés dont l'Homme, les grands systèmes permettant la captation et la distribution de l'oxygène aux tissus (association des appareils respiratoire et cardiovasculaire et l'érythropoïèse) sont finement régulés permettant de moduler cet apport d'oxygène.

La notion d'hypoxie a récemment été mise en lumière par le prix Nobel de Médecine 2019 ayant récompensé William G. Kaelin Jr, Sir Peter J. Ratcliffe and Gregg L. Semenza, pour leurs découvertes concernant les mécanismes d'adaptation des cellules en fonction de la disponibilité de l'oxygène. L'hypoxie est un terme récent dont la première apparition dans la littérature date de 1938 (Richalet 2021) et provient du grec υπο (hypo) = sous, moins que et oxus: οξύς (oxys) = « aigu » ou « acide » en raison des propriétés reconnues à tort par Lavoisier de l'oxygène à se combiner pour former des acides. L'hypoxie pourrait être définie comme un état d'insuffisance en oxygène pour maintenir une fonction cellulaire normale (Schödel et Ratcliffe 2019). L'hypoxie peut donc être la conséquence d'un défaut d'apport ou d'un hypermétabolisme de la cellule. Il n'existe pas de niveau précis d'oxygénation en dessous duquel on parle d'hypoxie. Chaque tissu fonctionne de manière physiologique mais avec des niveaux de pression partielle d'oxygène variables qui sont parfois très bas de l'ordre de 5 à 10 mmHg de pression partielle

en dioxygène (PO_2) (Keeley et Mann 2019). Dans le poumon, l'oxygénation varie également. La PO_2 est de 150mmHg dans la trachée, puis de 100mmHg dans l'alvéole et plus basse à ~45mmHg dans le secteur interstitiel (Keeley et Mann 2019). Les cellules de l'immunité circulantes sont exposées à toute une gamme dynamique de PO_2 (~40-90 mmHg) sur une période relativement courte (Keeley et Mann 2019)(Figure 15).

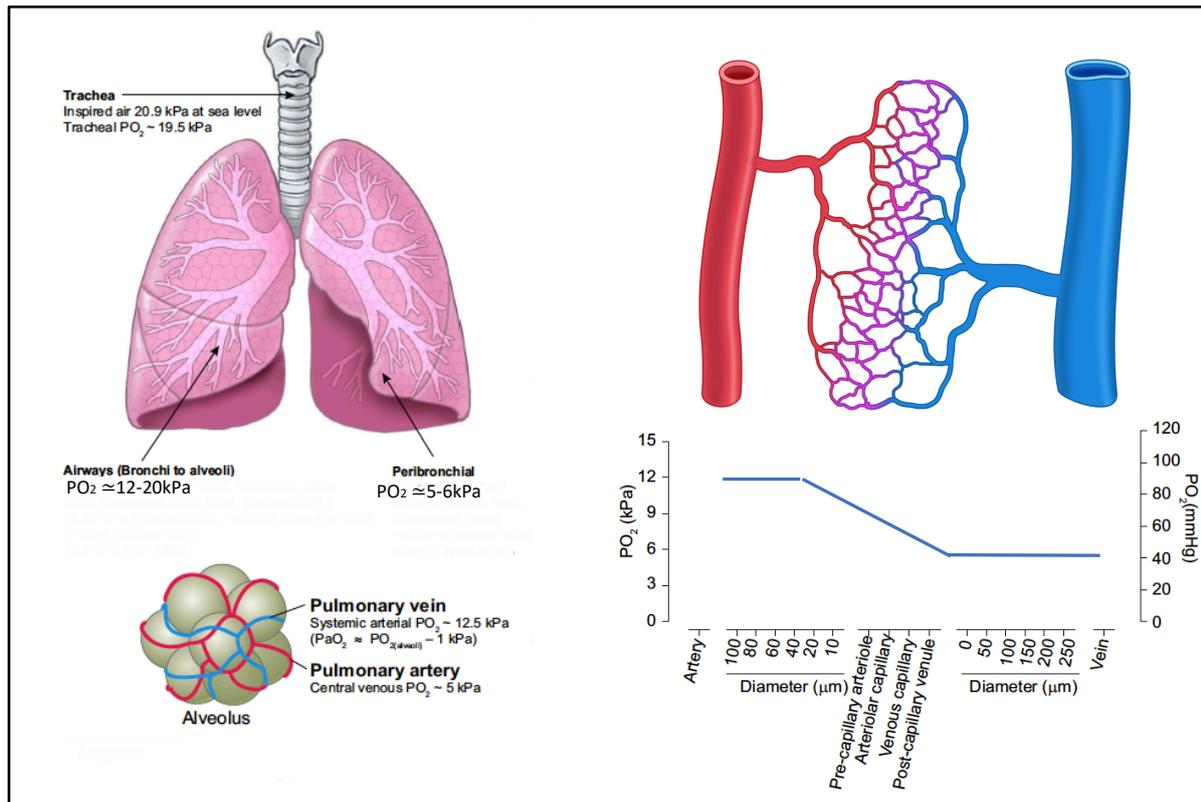


Figure 15: Représentation des différents niveaux de PO_2 dans le poumon et les vaisseaux. Adapté de (Keeley et Mann 2019).

La réponse cellulaire à l'hypoxie est caractérisée par l'activation de facteurs de transcription dits « induits par l'hypoxie » ou HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*). En réponse à l'hypoxie, un programme d'expression génique est orchestré par les HIFs qui modulent directement ou indirectement l'expression de milliers de gènes, afin d'adapter le métabolisme et l'environnement de la cellule aux conditions hypoxiques (Semenza 2011; 2019). Dans les tissus inflammatoires les cellules en plus des conditions circulatoires, sont également exposées à une hypoxie en raison de leur hypermétabolisme avec augmentation de la consommation d' O_2 . L'hypoxie en retour peut affecter activement les processus inflammatoires par la régulation des voies de signalisation sensibles à l'oxygène dans de multiples sous-types de cellules immunitaires (Taylor et al. 2016; Eltzschig et Carmeliet 2011). Les connaissances actuelles ont identifié HIFs et NF- κ B comme principaux acteurs dans la modification de l'expression

génique des cellules immunitaires en réponse à l'hypoxie : (Taylor et al. 2016; McGettrick et O'Neill 2020; Biddlestone, Bandarra, et Rocha 2015).

3.2 Voies de signalisation induites par l'hypoxie

3.2.1 Hypoxia inducible factor (HIF)

3.2.1.1 *Structure et rôle de HIF*

3.2.1.1.1 Structure et schéma des grands rôles

La découverte de HIF provient de l'observation de l'augmentation du taux d'érythropoïétine (EPO) en hypoxie. En 1991, Semenza découvre l'existence d'un facteur nucléaire induit par l'hypoxie se liant au promoteur du gène de l'*EPO* et augmentant son expression (Semenza et al. 1991). HIF est un hétérodimère comprenant une sous-unité α (HIF- α) régulée par le niveau d'oxygène et une sous-unité β (HIF- β) constitutivement exprimée dans le noyau. Le complexe HIF a été identifié comme le facteur-clé régulant la réponse transcriptionnelle à l'hypoxie (Semenza et Wang 1992; Wang et Semenza 1993).

Chez l'homme, trois isoformes de HIF- α ont été décrites : HIF-1 α codé par le gène *HIF1A* sur le chromosome 14, HIF-2 α (ou EPAS-1, *endothelial PAS domain protein 1*) codé par le gène *EPAS1* sur le chromosome 2, et plus récemment HIF-3 α codé par le gène *HIF3A* sur le chromosome 19. Il existe également deux formes de la sous-unité β : HIF-1 β (ou *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT)) qui est le partenaire principal des sous-unités α et HIF-2 β (ARNT2) (Prabhakar et Semenza 2012; Schödel et Ratcliffe 2019) (Figure 16).

Les facteurs HIF appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (*basic helix loop helix* (bHLH) et protéine *Per- Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) / *Single-mind -Sim homology* (PAS)). Les domaines bHLH-PAS sont situés dans l'extrémité N-terminale des protéines et contrôlent la dimérisation du complexe HIF et sa liaison à l'ADN. L'extrémité C-terminale comporte pour les sous-unités alpha un ou des domaines de transactivation (TAD) et des domaines de régulation dépendants de l'oxygène (ODDD : *O₂-dependant degradation domain*) et responsable de la dégradation de la sous-unité en normoxie (Wang et Semenza 1995; Jiang et al. 1996; Prabhakar et Semenza 2012)(Figure 16).

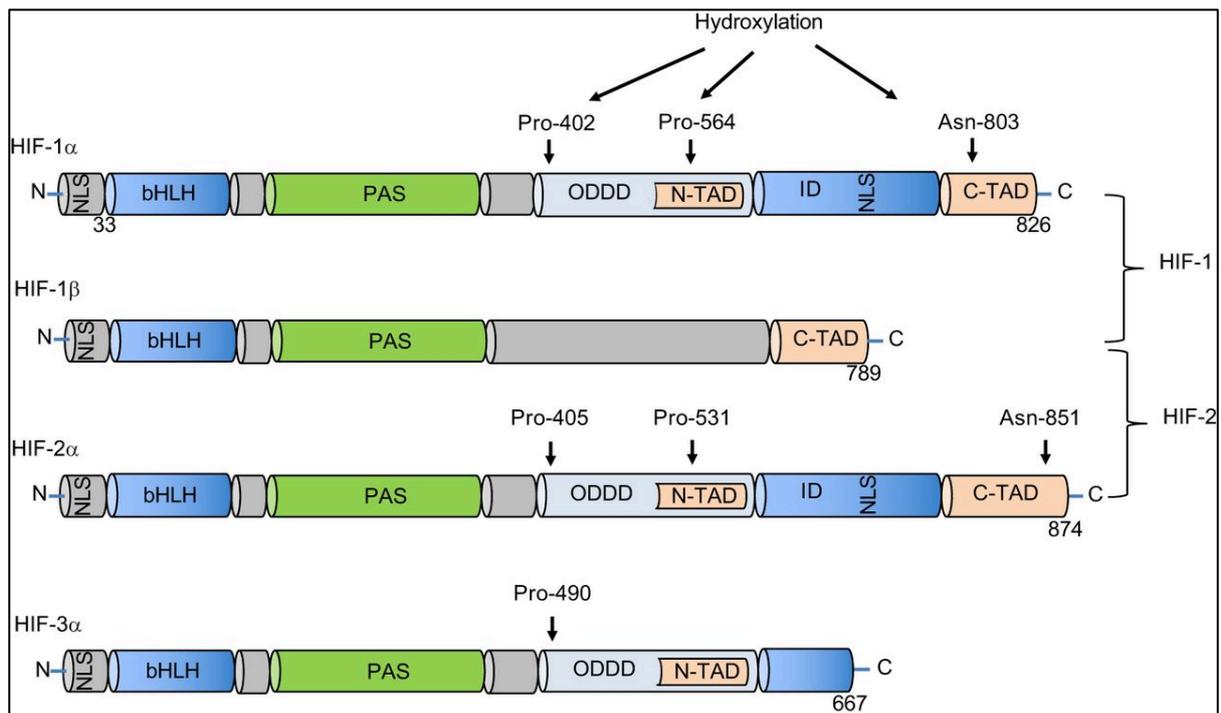


Figure 16: Structure schématique des sous unités HIF

Schéma montrant la structure de HIF-1 α (826 acides aminés), HIF-2 α (874 acides aminés), HIF-3 α (667 acides aminés) et HIF-1 β (789 acides aminés). L'extrémité N-terminale contient les domaines basic helix-loop-helix (bHLH) et Per-ARNT-Sim homology domains (PAS) requis pour l'hétérodimérisation et la liaison à l'AND respectivement. HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α possèdent aussi un oxygen-dependent degradation domain (ODDD). L'ODDD est requis pour l'hydroxylation et la dégradation dépendantes de l'oxygène. L'extrémité C-terminale de HIF-1 α et HIF-2 α contient deux terminal-transactivation domains (TADs); N-TAD et C-TAD sont séparés par un inhibitory domain (ID). N-TAD et C-TAD sont responsables de l'activité transcriptionnelle en hypoxie. L'activité transcriptionnelle de C-TAD est associée à la liaison avec action transcriptionnelle de co-activateurs comme CREB-binding protein (CBP)-p300. Le domaine N-TAD est responsable de la stabilisation HIF-1 α . HIF-3 α et HIF-1 β contiennent seulement un TAD. HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α sont potentiellement hydroxylés sur deux résidus proline (Pro), qui induit la protéine von Hippel-Lindau (pVHL). L'hydroxylation du résidu asparagine (Asn) inhibe leur interaction avec p300 et CBP. NLS, nuclear localization signal. Adapté de (Beaudry et al. 2016)

L'expression de HIF-1 α est ubiquitaire y compris chez les invertébrés. Il est détecté dans toutes les populations cellulaires impliquées dans la réponse innée et adaptative, incluant macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et lymphocytes (Palazon et al. 2014). HIF-2 α au contraire n'est exprimé que dans certaines populations cellulaires, uniquement chez les vertébrés : cellules épithéliales alvéolaires, cellules endothéliales, fibroblastes rénaux, hépatocytes, myocytes cardiaques.... Il est également exprimé dans les macrophages associés aux cancers (TAM), les lymphocytes T CD8⁺, ou dans les neutrophiles (Palazon et al. 2014).

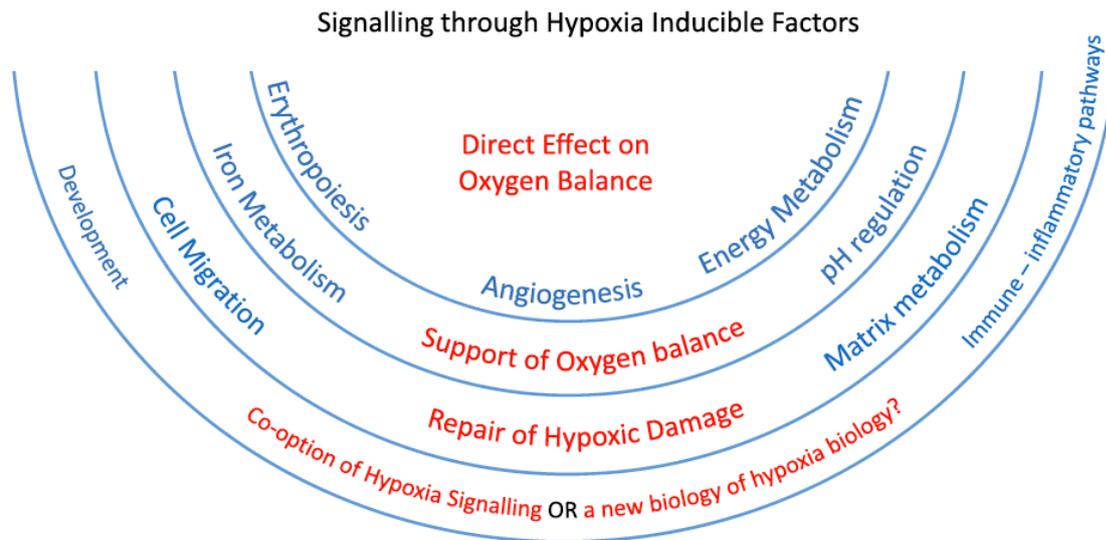


Figure 17: Grandes fonctions de la voie HIF

Schéma illustrant le fonctionnement de la voie HIF sur les processus directement (rouge) et indirectement (bleu) liés au maintien de l'équilibre en oxygène. Adapté de (Schödel et Ratcliffe 2019)

Les fonctions de HIF sont vastes et ne se limitent pas au maintien direct de l'homéostasie de l'oxygénation (Figure 17). Au niveau cellulaire, HIF-1 et HIF-2 régulent de nombreuses fonctions comme la différenciation, la migration, la cytoprotection, l'apoptose, le contrôle du cycle cellulaire et la fonction de certains organites comme les mitochondries (Schödel et Ratcliffe 2019). HIF-1 et HIF-2 sont impliqués dans les grandes fonctions de l'organisme, les premières découvertes, portant sur le rôle de HIF-1 et HIF-2 dans l'érythropoïèse, l'angiogenèse, et la régulation du métabolisme énergétique pour restaurer l'équilibre perturbé par un défaut d'oxygénation. De nombreux travaux montrent également que HIF-1 et HIF-2 sont impliqués dans la régulation de phénomènes plus éloignés du rôle du maintien de l'homéostasie de l'oxygénation comme la régulation de l'inflammation, de l'immunité innée et adaptative (Watts et Walmsley 2019; McGettrick et O'Neill 2020), et de la fibrogénèse (Xiong et Liu 2017). HIF-1 et HIF-2 jouent un rôle protecteur dans certaines pathologies comme après un infarctus du myocarde grâce à une adaptation métabolique à court terme permettant de supporter de bas niveaux d'oxygène puis en favorisant la revascularisation (Koeppen et al. 2018; Semenza 2012). Cependant HIF-1 et HIF-2 peuvent également avoir un rôle délétère au cours des pathologies tumorales où ils favorisent l'immortalisation cellulaire, la migration, l'invasion cellulaire et le processus métastatique et l'instabilité génétique, ou au cours de l'hypertension pulmonaire via le remodelage vasculaire (Semenza 2012; Waypa et Schumacker 2019; Moreno Roig et al. 2018).

Le rôle de HIF-3 α est moins clair. Il existe plusieurs variants HIF-3 α dont les fonctions sont différentes. HIF-3 α est exprimé chez les vertébrés et seulement dans certains tissus autres que le placenta (Duan 2016). HIF-3 α peut se lier à HIF-1 et inhiber son action transcriptionnelle. L'expression de HIF-3 α étant induite par HIF-1 dans les cellules hypoxiques il pourrait s'agir d'un rétrocontrôle négatif de l'activité de HIF-1 en cas d'hypoxie (Duan 2016).

3.2.1.1.2 Signalisations canonique et non canonique par HIF

En condition hypoxique, la signalisation canonique liée à l'activation de HIF est associée à la liaison de l'hétérodimère HIF aux éléments de réponse à l'hypoxie ou *hypoxia responsive elements* (HRE) dans les régions promotrices ou régulatrices des gènes cibles qui contiennent la séquence consensus 5'-(A/G)CGTG-3' (Figure 18).

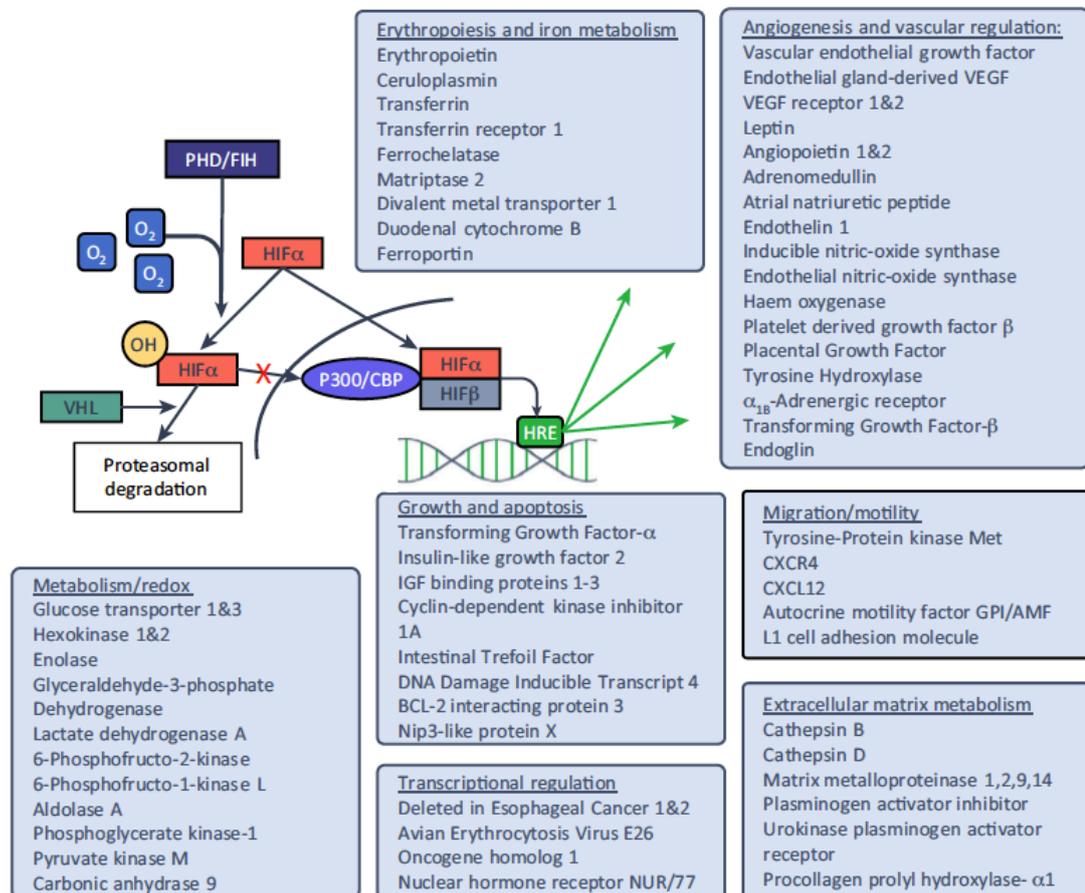


Figure 18: Exemples représentatifs des cibles de HIF porteuses d'un domaine HRE
Adapté de (Watts et Walmsley 2019)

Grâce aux techniques de séquençage CHIP-Seq associée à une immunoprécipitation de la chromatine, plusieurs milliers de sites de liaison directe de HIF-1 et HIF-2 ont été identifiés sur l'ADN nucléaire (Schödel et Ratcliffe 2019; Schödel et al. 2011) et de HIF-1 sur l'ADN mitochondrial (Natarajan et al. 2020). Même si HIF-1 et HIF-2 se lient à des séquences

identiques, leur réponse transcriptionnelle est différente. De même chaque type cellulaire a une réponse transcriptionnelle à l'hypoxie qui lui est propre (Kelly et al. 2003).

L'activation des gènes en réponse à l'hypoxie est dépendante de HIF de façon directe pour la majorité d'entre eux. Au contraire, les voies non canoniques de HIF sont responsables de répression en hypoxie de la plupart de gènes. Cette répression est indirectement médiée par HIF qui transactive des gènes codant pour des répresseurs transcriptionnels ou des microARN des régulateurs épigénétiques comme des enzymes modifiant la chromatine telles que des histone-déméthylases et des histone-désacétylases (Prabhakar et Semenza 2012; Schödel et Ratcliffe 2019). Il existe divers mécanismes décrits par lesquels les isoformes HIFs stabilisées peuvent influencer l'activité d'autres voies de signalisation indépendamment de HRE. Il a été démontré que la signalisation de HIF non canonique régule par exemple la signalisation NOTCH sans liaison à un domaine HRE permettant à l'hypoxie de maintenir les cellules dans un état non différencié (Biddlestone, Bandarra, et Rocha 2015; Gustafsson et al. 2005).

3.2.1.2 Régulation canonique de HIF : mécanismes enzymatiques de détection de l'oxygène

Les facteurs HIF sont soumis à des régulations multiples et parfois redondantes. Le signal sensible à l'oxygène qui contrôle l'activité de HIF est généré par une série d'enzymes qui catalyse l'hydroxylation de résidus prolyl et asparaginyll des sous unités α . Ces enzymes sont des dioxygénases qui scindent l'oxygène moléculaire et incorpore les atomes d'oxygène dans leur substrat. Leur activité est donc supprimée s'il existe une hypoxie. Ce mécanisme post-traductionnel dépend des prolyl-hydroxylases (PHD) en première ligne, puis de l'asparaginyll-hydroxylase dénommée *factor inhibiting HIF 1* (FIH-1). Elles appartiennent à la superfamille des dioxygénases dépendantes du fer et du 2-oxoglutarate, HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α sont toutes régulées par la prolyl hydroxylation, tandis que seulement HIF-1 α et HIF-2 α sont régulés par *l'asparaginyll hydroxylation* (Prabhakar et Semenza 2012; Schödel et Ratcliffe 2019) (Figure 19).

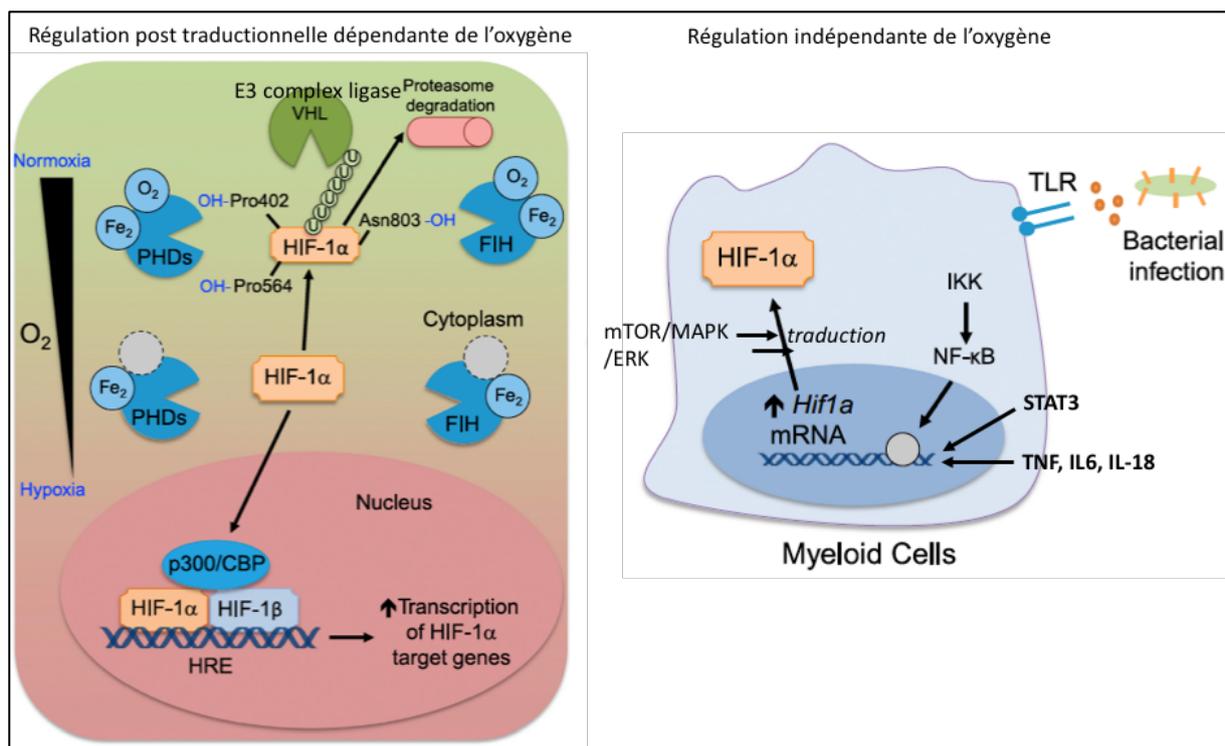


Figure 19: Mécanismes de régulation de HIF

En normoxie, la demi-vie des sous-unités HIF- α est de quelques minutes seulement : PHD hydroxyle HIF- α sur deux résidus proline, ce qui permet à pVHL de se fixer sur le domaine ODDD et d'initier l'ubiquitinylation via le complexe E3 ligase de HIF- α et sa dégradation dans le protéasome. L'activité enzymatique de PHD2 nécessite des concentrations cytoplasmiques suffisantes d'O₂ qui réduit les ions ferriques Fe³⁺ en ions ferreux Fe²⁺ au niveau du centre catalytique. Par ailleurs, FIH-1 intervient probablement en deuxième ligne en hydroxylant une asparagine sur les sous-unités n'ayant pas été reconnues par PHD. Cet hydroxylation bloque, par encombrement stérique, la liaison intranucléaire avec des co-activateurs transcriptionnels (essentiellement p300 ou CBP) et inhibe ainsi la transactivation de la plupart des gènes cibles. En hypoxie, HIF- α s'accumule dans le cytoplasme, se transloque dans le noyau et se lie à HIF-1 β . Les domaines TAD de HIF- α permettent de recruter un co-activateur et vont réguler l'activité transcriptionnelle une fois que le complexe HIF se sera lié, via les domaines bHLH, à une séquence HRE de l'ADN. La transactivation des gènes cibles est un mécanisme rapide, apparaissant dans les premières heures d'hypoxie.

HIF peut également être régulé indépendamment du niveau d'oxygène. Dans les macrophages, la transcription ou la traduction de HIF peuvent être amplifiées. Des mécanismes post traductionnels (non montrés sur le schéma) et indépendants de l'oxygène peuvent également modifier la stabilisation, la translocation dans le noyau, ou sa transactivation. Schéma adapté de (Palazon et al. 2014)

3.2.1.2.1 Régulation de la stabilité de HIF- α par prolyl-hydroxylation

HIF-1 α et HIF-2 α sont synthétisés en permanence dans les cellules. Toutefois en condition normoxique la majeure partie des sous-unités α est très rapidement dégradée par le protéasome après ubiquitinylation par le complexe ubiquitine ligase E3 contenant la protéine von Hippel-Lindau (pVHL) codée par le gène suppresseur de tumeur *VHL*. Cette étape est conditionnée par l'hydroxylation préalable de deux résidus proline par une PHD. Trois PHD ont été décrites : PHD1, PHD2 et PHD3, codées respectivement par les gènes *EGLN2*, *EGLN1* et *EGLN3* (Schödel et Ratcliffe 2019). Il est intéressant de noter qu'*EGLN1* est un gène cible de HIF-1 α , ce qui correspond probablement à un rétrocontrôle négatif en cas d'hypoxie prolongée. En

hypoxie, les PHD sont inactivées directement par la diminution de la disponibilité en O₂, mais également via la production par les mitochondries hypoxiques d'espèces réactives de l'oxygène. Ceci aboutit à une stabilisation et une activation de HIF- α , qui peut alors se transloquer dans le noyau et se dimériser avec HIF-1 β . Un co-activateur est ensuite recruté dans le noyau, la protéine p300 ou la *CREB-binding protein* (CBP) principalement, permettant au complexe d'orchestrer la transactivation de ses gènes cibles portant la séquence HRE. La voie de signalisation HIF peut être activée chimiquement en normoxie en inhibant l'activité enzymatique hydroxylase : en présence d'ions métalliques comme le cobalt (Co²⁺), jouant notamment le rôle d'inhibiteur compétitif du Fe²⁺ de PHD2, ou par un chélateur du fer comme la desferrioxamine. Toutefois cette procédure ne reproduit qu'une partie des effets de l'hypoxie (Prabhakar et Semenza 2012; Schödel et Ratcliffe 2019). Des facteurs épigénétiques peuvent moduler la stabilité de HIF via des mutations de PHD ou de VHL, exacerbant la réponse de HIF (Watson et al. 2010). De nombreuses protéines (HEXIM1, MCM7, OS9...) peuvent faciliter la dégradation dépendante de l'O₂ en stabilisant les interactions entre les composants du complexe VHL/E3ligase ou en stimulant l'ubiquitination de HIF-1 α hydroxylé. D'autres protéines peuvent au contraire inhiber cette dégradation dépendante de l'O₂ en bloquant l'action du complexe de la ligase VHL-E3 (ATP6V0C, RSUME...) ou en catalysant la désubiquitination (USP8, USP20, UCHL1...) (Semenza 2017).

3.2.1.2.1 Régulation de la fonction transactivatrice par asparaginylation

L'activité de HIF- α est également régulée par l'hydroxylation d'une asparagine par FIH-1. Tout comme PHD2, l'activité enzymatique de FIH-1 est proportionnelle à la concentration cytoplasmique en O₂ et nécessite des ions Fe²⁺. Elle est également inhibée par les ROS. En conditions normoxiques, les sous-unités HIF- α qui n'ont pas été dégradées par la voie PHD2/pVHL sont hydroxylées par le FIH-1. Cette hydroxylation ne bloque pas la translocation et la liaison à HIF-1 β , mais inhibe le recrutement d'un co-activateur et la liaison à l'ADN, ce qui empêche *in fine* la transactivation de la plupart des gènes cibles. En hypoxie, l'activité du FIH-1 est inhibée, le recrutement d'un cofacteur par l'hétérodimère HIF- α /HIF-1 β devient alors possible (Prabhakar et Semenza 2012; Schödel et Ratcliffe 2019). La régulation peut être différente selon les isoformes : alors que toutes les sous-unités HIF- α sont stabilisées en hypoxie aiguë, l'expression de HIF-1 α tend à diminuer durant les hypoxies prolongées au contraire de HIF-2 α .

3.2.1.1 Régulation non canonique de HIF : des mécanismes variés

En règle générale, ces mécanismes de régulation ne sont pas directement dépendants des niveaux d'oxygène, mais reflètent souvent l'activité des systèmes comme la signalisation inflammatoire activée dans les tissus hypoxiques ou lors d'une prolifération cellulaire qui requièrent une réponse adaptée pour contrebalancer l'augmentation de la demande en oxygène. HIF peut être régulé à plusieurs niveaux en normoxie : transcriptionnel, traductionnel, post traductionnel (par modulation de sa dégradation ou de sa liaison à l'ADN).

3.2.1.1.1 Régulation transcriptionnelle

De nombreuses voies de signalisations induisent la transcription de HIF-1 α et HIF-2 α . Ainsi NF- κ B ou STAT3 stimulent la transcription de HIF-1 α (Bonello et al. 2007; Niu et al. 2008) (Figure 19). L'angiotensine II est un facteur qui augmente chez le rat la transcription de HIF-1 α dans les cellules musculaires lisse via la protéine kinase C (Pagé et al. 2002). Plusieurs facteurs pro-inflammatoires peuvent également augmenter la transcription de HIF-1 α comme le LPS, le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-18 ou les espèces réactives de l'oxygène (Bonello et al. 2007; Schödel et Ratcliffe 2019; Palazon et al. 2014). Les facteurs de transcription SP1, SP3 et E2F1 sont impliqués dans la transcription de HIF-2 α . La transcription de HIF-1 et HIF-2 est également régulée par des régulateurs épigénétiques ou des ARN non codants (Schödel et Ratcliffe 2019).

3.2.1.1.2 Régulation traductionnelle

L'activation des voies mTOR, *mitogen activated protein kinase* (MAPK), *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) favorisent la traduction de HIF (Fukuda et al. 2002; Hudson et al. 2002). Néanmoins le rôle de mTOR est complexe puisque mTORC1 et mTORC2 ont des effets différents sur HIF-1 α et HIF-2 α (Toschi et al. 2008).

3.2.1.1.3 Régulation post traductionnelle de HIF

D'autres protéines interagissant avec HIF-1 α ont une activité catalytique, telle que l'acétylation, la désacétylation, la déméthylation, la phosphorylation ou l'ubiquitination, ce qui entraîne une modification post-traductionnelle de HIF-1 α qui altère sa stabilité, sa localisation subcellulaire ou sa fonction de transactivation. Plusieurs kinases sont impliquées dans la phosphorylation de la sous unité α , comme AKT, MAPK, ERK. D'autres protéines interagissent avec HIF-1 α en

facilitant ou inhibant la dégradation indépendante de l'O₂, en stimulant ou en inhibant l'ubiquitination, en stimulant la SUMOylation (Semenza 2017).

3.2.1.1.4 Régulation des liaisons de HIF à l'ADN

Il existe plus de sites HRE que de domaines de liaison de HIF suggérant qu'il existe des processus régulant également les sites de liaison à l'ADN (Schödel et Ratcliffe 2019). La liaison à l'ADN peut par exemple être modifiée par méthylation de l'ADN. Les liaisons de HIF à l'ADN et son action vont également être régulées par le recrutement de co-activateurs (CBP, p300 ou STAT3) ou de co-represseurs régulant la transactivation de HIF (Semenza 2017).

3.2.2 *Nuclear factor-kappa B (NFκB)*

NF-κB est un des facteurs de transcription clef impliqué dans la réponse inflammatoire. Ce facteur de transcription est composé de 5 membres incluant NF-κB1 (ou p50), NF-κB2 (ou p52), RelA (ou p65), RelB et c-Rel, qui se lient et interviennent dans la transcription de gènes cibles en se liant à un élément spécifique de l'ADN, κB *enhancer*, via divers hétéro ou homo-dimères. Les protéines constitutives de NF-κB sont séquestrées dans le cytoplasme par une famille de protéines inhibitrices, la famille des IκB, dont le principal membre est IκBα. L'activation de NF-κB implique deux voies de signalisation : une canonique et une non canonique. La voie canonique répond à l'activation de récepteurs de cytokines (par exemple du TNF), PRR, TCR. Le principal mécanisme d'activation canonique de NF-κB est la dégradation inductible de IκBα déclenchée par sa phosphorylation spécifique par un complexe de kinases (IKK). L'IKK peut être activé par différents stimuli, notamment les cytokines, les facteurs de croissance, les mitogènes, les composants microbiens et les agents de stress. L'IKK phosphoryle IκBα au niveau de deux sérines N-terminales et, de ce fait, déclenche une dégradation ubiquitino-dépendante de IκBα dans le protéasome, ce qui entraîne une translocation nucléaire rapide et transitoire des membres canoniques de NF-κB, principalement les dimères p50/p65 et p50/c-Rel (Dorrington et Fraser 2019) (Figure 20).

Le rôle de NF-κB au cours de la sarcoïdose n'est pas bien connu avec des données contradictoires sur l'activation de NF-κB, pouvant participer à la réaction inflammatoire ou au contraire aux réactions d'anergie décrite dans la sarcoïdose (Lee et al. 2011; Besnard et al. 2018; Drent et al. 2001). Les lymphocytes T de patients présentant une sarcoïdose sévère (plus active, s'aggravant avec fibrose pulmonaire) avaient une expression de p65 diminuée. Ces cellules stimulées présentaient une prolifération diminuée, une production de cytokines

diminuées (IL2 et IFN- γ), ce qui suggérerait que le déficit en p65 contribuerait à l'anergie T et la persistance d'une inflammation chronique (Lee et al. 2011).

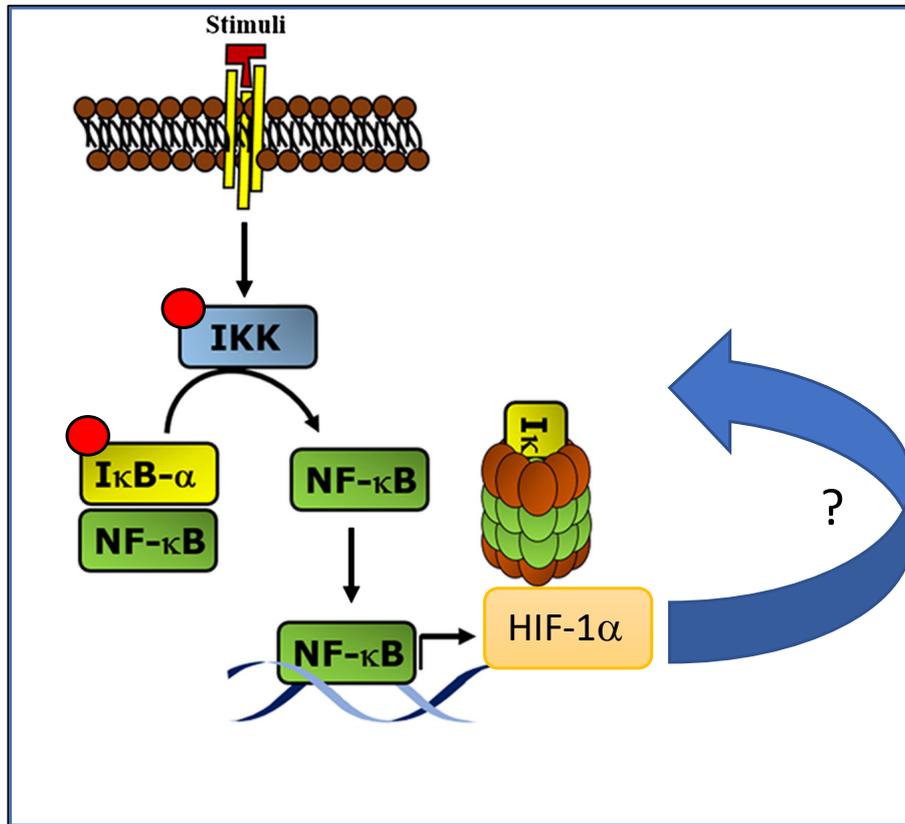


Figure 20: Interaction NF- κ B et HIF-1 α

Le principal mécanisme d'activation canonique de NF- κ B est la dégradation inductible de I κ B α déclenchée par sa phosphorylation spécifique par un complexe de kinases (IKK). L'IKK peut être activé par différents stimuli, notamment des cytokines, des facteurs de croissance, des mitogènes, des composants microbiens et des agents de stress. L'IKK phosphoryle I κ B α au niveau de deux sérines N-terminales et, de ce fait, déclenche une dégradation ubiquitino-dépendante de I κ B α dans le protéasome, ce qui entraîne une translocation nucléaire rapide et transitoire des membres canoniques de NF- κ B, principalement les dimères p50/p65 et p50/c-Rel.

Les points rouges indiquent les sites d'hydroxylation sur la voie de signalisation NF- κ B potentiellement sensibles au niveau d'oxygène. NF- κ B induit la transcription de HIF-1 α directement ou par l'intermédiaire de TNF α ou IL1 β . En retour les mécanismes de régulation de NF- κ B par HIF sont moins bien connus. Schéma adapté de (Taylor et Colgan 2017) et (D'Ignazio, Bandarra, et Rocha 2016).

La voie NF- κ B est un régulateur clef de l'inflammation qui est modulée du moins au niveau de sa voie canonique par l'hypoxie (Taylor et Colgan 2017). En effet il existe à plusieurs endroits de cette voie de signalisation des sites d'hydroxylation sensibles au niveau d'oxygène (Taylor et Colgan 2017). D'autre part il existe une interdépendance entre la voie NF- κ B et la voie HIF (D'Ignazio, Bandarra, et Rocha 2016). NF- κ B induit la transcription de HIF-1 α directement ou notamment via la sécrétion de cytokines tels que le TNF α ou l'IL-1 β (D'Ignazio, Bandarra, et Rocha 2016). En retour, la régulation de HIF sur NF- κ B est moins bien comprise avec des résultats discordants (Bandarra et al. 2015; D'Ignazio, Bandarra, et Rocha 2016) (Figure 20).

3.2.3 Autres voies régulées par l'hypoxie

La 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) est une enzyme qui est activée en réponse à l'épuisement de l'ATP qui se produit à la suite de la crise métabolique causée par l'hypoxie. L'AMPK aurait plutôt une action anti-inflammatoire et participe notamment aux mécanismes d'autophagie (Chen et al. 2018; Dengler 2020). L'AMPK orchestre le catabolisme lipidique et la phosphorylation oxydative au cours de la tuberculose (Wilson, Mayr, et Weichhart 2019). Le récepteur des glucocorticoïdes a une action anti inflammatoire. Ce récepteur est modulé par l'hypoxie même si les mécanismes ne sont pas encore clairs (Yang et al. 2020). CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*), protéine ubiquitaire agissant comme un facteur de transcription liant l'AMPc est également régulé par l'hypoxie. CREB intervient notamment dans la prolifération cellulaire et régule l'expression de gènes proinflammatoires (Lin et Simon 2016; Taylor et al. 2016). mTOR est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases qui régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire dont le rôle a été identifié dans des formes de sarcoïdose (Linke et al. 2017). L'hypoxie supprime l'activité de mTOR indépendamment de la signalisation HIF, via l'inhibiteur REDD1 et le complexe TSC1/TSC2 (Brugarolas et al. 2004) mais aussi via HIF (Knaup et al. 2009). En retour mTOR est connu pour réguler positivement HIF (*cf* 3.2.1.1.2) notamment en normoxie, dans des processus tumoraux par exemple pour favoriser l'angiogénèse (Land et Tee 2007). D'autres voies impliquées dans la pathogénie de la sarcoïdose comme la voie des JAK-STAT ou celle de l'inflammasome (Rotenberg et al. 2018; Huppertz et al. 2020) pourraient être modulées par l'hypoxie mais sans que les mécanismes en soient bien compris (Xu, Li, Guo, et al. 2017; Lavallard et al. 2020).

3.3 Hypoxie et inflammation

L'hypoxie et l'inflammation coexistent fréquemment et peuvent s'exacerber l'une l'autre. Il existe des liens multiples et bidirectionnels entre les voies moléculaires qui détectent l'hypoxie et les signaux inflammatoires qui y répondent. L'hypoxie participe à la réponse inflammatoire principalement par l'intermédiaire de HIF-1 et HIF-2, mais aussi par la modulation de NF- κ B et d'autres voies de signalisations impliquées dans l'inflammation (*cf* chapitres 3.2.2 et 3.2.3). HIF-1 et HIF-2 jouent un rôle sur le développement et la fonction des cellules de l'immunité. Le rôle de HIF diffère en fonction de l'organe, de la cellule et du contexte inflammatoire aigu ou chronique et de sa sévérité (Watts et Walmsley 2019). Le rôle de HIF-1 a été mieux défini notamment grâce à des modèles murins de délétions spécifiques dans des lignées myéloïdes et lymphoïdes (*cf* Tableau 3).

Tableau 3: Phénotypes de cellules de l'immunité observé des souris déficientes pour *HIF-1α*

Macrophages	↓ ATP	Neutrophiles	↓ Formation de NET
	↓ Glycolyse		↓ Survie
			↓ Glycolyse
	↓ Agrégation	Lymphocytes T	↑ Treg
			↓ Glycolyse
			↓ Th17
	↓ Mobilité		↓ CD40 ligand sur lymphocytes Tfh
↓ Activité bactéricide	↑ Protection contre sepsis		
↓ Cytokines pro-inflammatoires	↓ Protection contre mécanisme auto-immun		
↓ CMH II			
Cellules dendritiques	↓ Glycolyse	Lymphocytes B	↓ IL-10
	↓ IL-22		↑ Arthrite induite par collagène
	↓ Migration médiée par CCR7		↑ Encéphalomyélite auto-immune
	↑ Activation des lymphocytes TCD4		↓ Développement normal de la lignée B

Adapté de (McGettrick et O'Neill 2020)

HIF-1 et HIF-2 ont un impact sur l'immunité innée via la modulation sur les macrophages de leur mobilité, leur activité anti-bactérienne ou anti-tumorale, leur phagocytose et la production de cytokines pro-inflammatoires (McGettrick et O'Neill 2020) (Figure 21). HIF-1 et HIF-2 modulent le métabolisme des macrophages afin de s'adapter à l'hypoxie. La délétion de HIF-1 α entraîne une réduction massive de la production d'ATP (Cramer et al. 2003). La surexpression de HIF-1 α augmente la glycolyse des macrophages ce qui favorise une polarisation M1 (Wang et al. 2017). HIF-2 au contraire serait plutôt associé à des macrophages polarisés M2 dont le métabolisme est celui d'une phosphorylation oxydative (Takeda et al. 2010). HIF-1 et HIF-2 ont également une action pro-inflammatoire sur les polynucléaires neutrophiles (Thompson et al. 2014) en favorisant leur survie et leur activité anti bactérienne. Le rôle de HIF-1 sur les cellules dendritiques est plus complexe, il augmenterait la survie et la synthèse d'interféron par la cellule dendritique (McGettrick et O'Neill 2020). HIF-1 et HIF-2 modulent également l'immunité adaptative. HIF-1 régule la survie des lymphocyte T, leur prolifération et leur différenciation (McGettrick et O'Neill 2020). Shi et al. ont démontré une activité glycolytique différente entre les sous populations-lymphocytaires CD4⁺ de type Th1, Th2, Th17 et Treg. Les Th17 présentaient la plus forte induction de glycolyse et les Treg la moins importante et ceci de façon dépendante de HIF-1 (Michalek et al. 2011; Shi et al. 2011). HIF-1 α favoriserait la différenciation en Th17 et diminuerait celle des Tregs (Shi et al. 2011; Shehade et al. 2015).

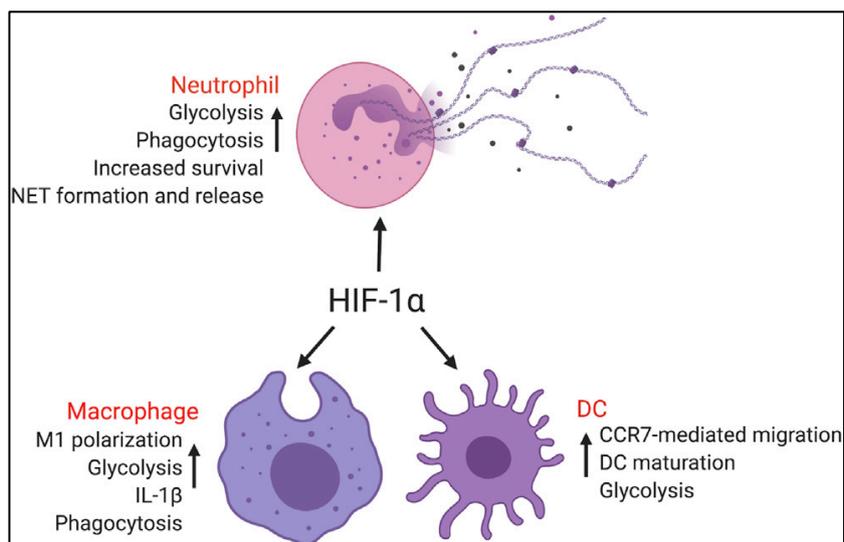


Figure 21: Effet de HIF-1 sur les cellules de l'immunité innée
Adapté de (McGettrick et O'Neill 2020)

HIF jouerait également un rôle dans la protection de l'hôte face aux agents extérieurs en modulant la fonction et la réparation des cellules des barrières épithéliales et aurait un rôle favorable dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (Taylor et Colgan 2017).

La voie NF- κ B qui est un régulateur clef de l'inflammation est régulée du moins au niveau de sa voie canonique par l'hypoxie. L'effet de l'hypoxie sur la voie NF- κ B est complexe. Par exemple en réponse à une hypoxie seule l'activité NF- κ B est modérément augmentée, mais supprimée si la cellule est préalablement stimulée par l'IL-1 β ou le LPS (Scholz et al. 2013). L'activation de NF- κ B dépend probablement du type cellulaire, du degré et de la durée de l'inflammation.

Les prolyl-hydroxylases jouent également un rôle dans l'inflammation. Dans les macrophages, la perte ou l'haplodéficiencie de PHD2 modifie la polarisation des macrophages vers un profil M2 *like* en impliquant également NF- κ B (Takeda et al. 2011), tandis que la perte du PHD3 modifie l'apoptose et l'activité pro-inflammatoire des macrophages (Taylor et al. 2016; Swain et al. 2014). Enfin les inhibiteurs des hydroxylases procurent, par exemple dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, une amélioration de la fonction de la barrière épithéliale, et ont une action anti-inflammatoire en altérant la différenciation des cellules de l'immunité et leur fonction (Taylor et al. 2016).

Plusieurs études ont démontré le rôle de la HIF-1 α au cours de l'infection des macrophages par *Mycobacterium tuberculosis*. Les macrophages infectés modifient leur métabolisme par une augmentation de la glycolyse aérobie et ceci est lié à HIF-1 α (Braverman et al. 2016). L'augmentation de HIF-1 α entraîne une augmentation de la production de cytokines pro-

inflammatoires comme l'IL-1 β et une diminution de la survie bacillaire (Gleeson et al. 2016). De façon intéressante, HIF-1 α joue des rôles différents au stade précoce et au stade tardif de la tuberculose. Baay-Guzman et al. ont mis en évidence des taux élevés de HIF-1 α dans un modèle murin de tuberculose pulmonaire progressive au stade précoce et tardif de la tuberculose (Baay-Guzman et al. 2018). Le blocage de l'HIF-1 α au stade précoce de l'infection conduisait à une aggravation de la maladie chez ces souris mais l'inhibition de l'HIF-1 α au stade tardif de la tuberculose augmentait l'apoptose des macrophages et diminuait la charge bactérienne, HIF-1 serait ainsi protecteur dans les phases initiales et délétère dans les phases tardives (Baay-Guzman et al. 2018).

3.4 Hypoxie et fibrose

L'hypoxie et la signalisation HIF jouent un rôle important dans la réparation tissulaire. Une lésion tissulaire s'accompagne souvent d'une atteinte vasculaire se compliquant d'une hypoxie locale. L'adaptation à l'hypoxie dans ce cas, notamment via HIF est bénéfique et favoriserait la réparation tissulaire. En revanche, dans des phénomènes chroniques d'inflammation ou d'hypoxie, HIF peut être responsable d'un processus de réparation aberrant conduisant à une fibrose (Darby et Hewitson 2016). En retour les lésions fibrotiques aggravent l'hypoxie en réduisant la densité vasculaire (Ruthenborg et al. 2014), ou dans le poumon en raison des remodelages interstitiels. Le rôle pro-fibrosant de l'hypoxie cellulaire et de l'activation de la voie HIF-1 α a été montré dans plusieurs organes comme le foie, le rein ou le poumon (Moon et al. 2009; Liu et al. 2017; Delbrel et al. 2018). Au cours de la FPI, l'expression de HIF-1 α a été rapportée dans les cellules épithéliales alvéolaires de patients (Tzouvelekis et al. 2007), et son implication dans l'induction de la transition-épithélio-mésenchymateuse et de l'apoptose des cellules épithéliales a été mise en évidence au sein du laboratoire (Uzunhan et al. 2016; Bernard et al. 2018), l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique semblait être une voie commune aux deux événements cellulaires (Delbrel et al. 2018). J'ai pu d'ailleurs au cours de mon master 2 participer à un de ces travaux (Bernard et al. 2018). L'effet pro-fibrosant de l'hypoxie notamment via HIF a été mis en évidence dans différents types cellulaires : cellules épithéliales alvéolaires, fibroblastes, macrophages alvéolaires (Darby et Hewitson 2016; Ueno et al. 2011; Ruthenborg et al. 2014). Par exemple, la délétion de HIF-1 α dans les macrophages dans un modèle murin de fibrose hépatique permettait de réduire les lésions de fibrose notamment grâce à la réduction de production du PDGF-BB (Coppole, Kaska, et Wentling 2012).

Les mécanismes par lesquels l'hypoxie et la signalisation HIF peuvent induire une fibrose sont de plusieurs types :

- (i) HIF peut induire directement la transcription de gènes codant pour des cytokines profibrosantes comme le VEGF, PDGF-BB, PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), CTGF, TGF β 1 (Distler et al. 2007; Higgins et al. 2004) notamment par l'intermédiaire des macrophages (Ueno et al. 2011; Ruthenborg et al. 2014). Ces cytokines modulent notamment la migration des fibroblastes, leur prolifération ou leur différenciation en myofibroblastes. PAI-1, cible de HIF et porteuse d'un domaine HRE, est l'inhibiteur principal des activateurs du plasminogène et semble jouer un rôle notable dans la fibrose pulmonaire. Dans des modèles murins de fibrose pulmonaire (principalement dans des modèles liés à la bléomycine, ou via l'expression du récepteur de la toxine diphtérique par les pneumocytes 2 murins, ou par irradiation pulmonaire) l'inhibition de PAI-1 améliore les lésions de fibrose par dégradation des dépôts de collagène par les MMP (Flevaris et Vaughan 2017). Dans un modèle murin par instillation de bléomycine, le TGF β 1 a une action inhibitrice sur les prolyl-hydroxylases permettant une stabilisation de HIF-1 et induisant la transcription de PAI-1 dans les macrophages alvéolaires (Ueno et al. 2011). PAI-1 a aussi la possibilité de se lier à la vitronectine inhibant l'adhérence cellulaire ou la migration cellulaire (Stefansson et Lawrence 1996) ce qui peut entraîner des défauts dans la réparation tissulaire dans des modèles de fibrose pulmonaire (Lazar et al. 2004).
- (ii) HIF peut également agir sur la transcription des constituants de la matrice extra cellulaire (fibronectine 1, collagène, thrombospondine 1) et la modulation des TIMP (TIMP1) et des MMP (MMP1,2) (Distler et al. 2007; Norman, Clark, et Garcia 2000).
- (iii) HIF peut interagir avec des voies de signalisation profibrotique comme SMAD3/TGF- β 1 (Zhang et al. 2003), Notch, PI3K/Akt (Liu et al. 2017)
- (iv) HIF pourrait intervenir dans les processus fibrosants par régulation épigénétique (Shu et al. 2019; Watson et al. 2010) (Liu et al. 2017). Il a été rapporté que l'hypoxie du tissu cardiaque augmentait l'expression du collagène 1 et de l'*alpha-smooth muscle actin* en raison d'une hyperméthylation globale de l'ADN et une augmentation de l'expression des enzymes ADN méthyltransférase dépendantes de HIF-1 α (Watson et al. 2014).

- (v) L'hypoxie est susceptible de modifier la polarisation des macrophages, (Leblond et al. 2016; Raggi et al. 2017; Delprat et al. 2020) et notamment d'orienter vers une polarisation M2, ces derniers pouvant être impliqués dans ces phénomènes de réparation tissulaire et de fibrose (Braga, Agudelo, et Camara 2015).

3.5 Hypoxie et sarcoïdose, quelles preuves et quels liens possibles ?

3.5.1 Exposition à l'hypoxie des cellules de l'immunité au cours de la sarcoïdose : mécanismes possibles ?

Le rôle des facteurs micro-environnementaux et en particulier de l'hypoxie dans le développement et la pérennisation des granulomes sarcoïdiens n'a jusqu'à présent pas ou peu été étudié. On peut considérer que les cellules de l'immunité constituant l'inflammation granulomateuse sont exposées à une hypoxie via plusieurs mécanismes :

- D'une part les cellules de l'immunité traversent et forment des zones d'inflammation (alvéolite initiale, stades initiaux comme montré dans le test de Kveim) avant de constituer les granulomes (Rosen et al. 1978; Lacronique et al. 1983; Rogers et Haserick 1954). Ces zones inflammatoires peuvent entraîner un environnement hypoxique du fait de l'augmentation de la demande en oxygène par la prolifération et la migration des cellules, de l'augmentation de l'activation des oxygénases particulièrement exprimées par les phagocytes, de la possibilité de thrombose des vaisseaux obstrués par les cellules inflammatoires, et des remaniements engendrés par une inflammation chronique d'un tissu (fibrose, thrombose) (Taylor et Colgan 2017; Taylor et al. 2016; Sitkovsky et Lukashev 2005). Ainsi, la mesure de la saturation en oxygène des vaisseaux rétinien a montré que la différence artério-veineuse était augmentée chez des patients atteints de sarcoïdose oculaire et neurologique en comparaison avec des sujets sains et des patients sans atteinte oculaire sarcoïdienne. Cette augmentation de la différence artério-veineuse suggère qu'il existe une consommation accrue de l'oxygène au niveau rétinien (Kindt et al. 2020).
- D'autre part, le centre des granulomes peut être considéré comme hypoxique. En effet la PO_2 tissulaire diminue de manière exponentielle au fur et à mesure qu'on s'éloigne des vaisseaux sanguins. Hors, dans une précédente étude, notre équipe a montré que les granulomes sarcoïdiens pulmonaires n'étaient pas vascularisés en leur centre et uniquement au contact de leur périphérie (Kambouchner et al. 2011). Ces granulomes présentaient dans la moitié des cas un diamètre conséquent de plus de 200 μ m, impliquant que leur centre se trouve en condition d'hypoxie (Kambouchner et al. 2011; Torres Filho et al. 1994) (Figure

22 et Figure 23). De façon similaire, dans un modèle chez le lapin de granulomateuse tuberculeuse, la mesure de PO₂ au centre des granulomes retrouvait une hypoxie sévère (<2mmHg) (Via et al. 2008).

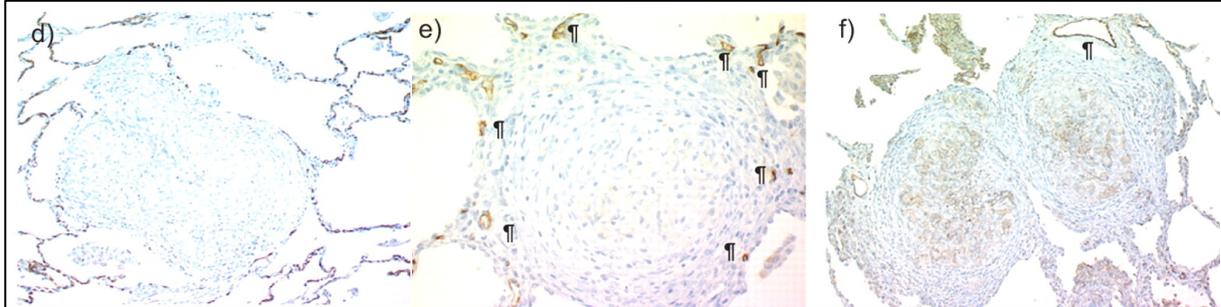


Figure 22: Immunohistochimie représentant la vascularisation du granulome d–f) micro-vaisseaux sanguins (¶) associés au granulomes intralobulaires sarcoïdiens. d, e) immunomarquage du CD34 des capillaires sanguins. f) Immunomarquage du CD31 de plus larges vaisseaux. Noter l’absence de petits capillaires dans les granulomes f) ×350; d) ×300; e) ×400. Adapté de (Kambouchner et al. 2011)

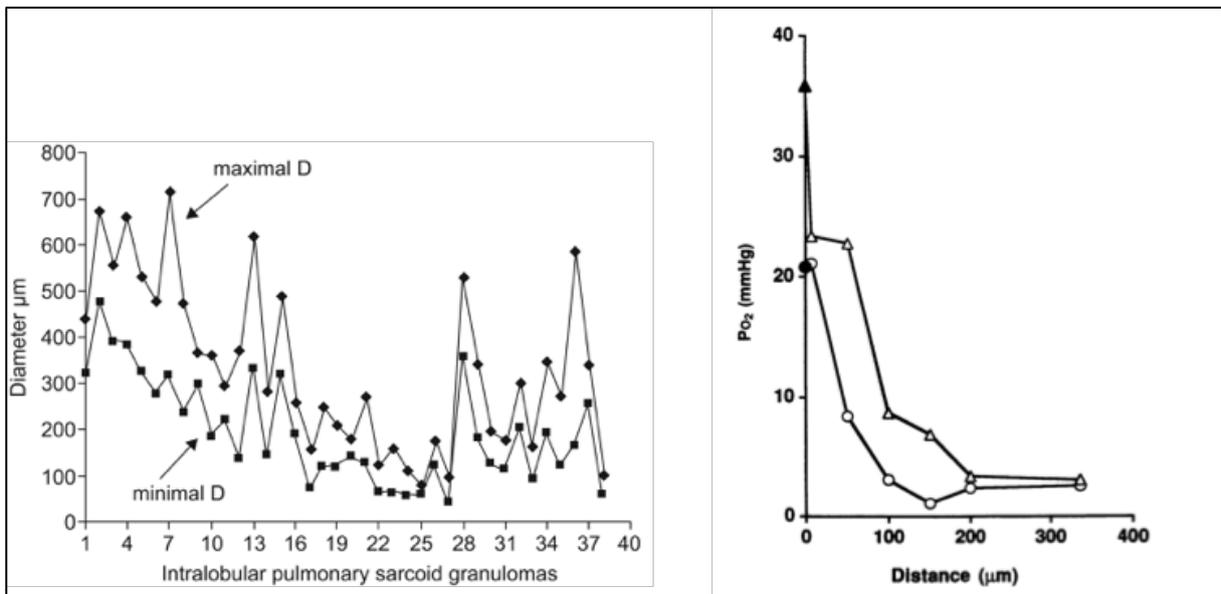


Figure 23: Taille des granulomes pulmonaires et variation de la PO₂ selon la distance aux vaisseaux La figure de gauche adaptée de (Kambouchner et al. 2011) montre le diamètre des granulomes pulmonaires sarcoïdiens en micromètres. Plus de la moitié ont un diamètre de plus de 200µm. A droite, courbes évaluant le rapport entre la distance aux vaisseaux et le niveau de PO₂ tissulaire. Ainsi du fait d’une vascularisation pauvre les cellules situées au centre du granulome peuvent être considérées comme étant en hypoxie.

- Une preuve de l’existence de granulomes hypoxiques est l’utilisation récente du traceur 18F-fluoromisonidazole (¹⁸FMISO) couplé au TEP, connu pour s’accumuler dans les zones hypoxiques et étudié dans certaines pathologies tumorales (Chakhoyan et al. 2017; Xu, Li, Zou, et al. 2017). Une équipe a récemment observé chez des patients atteints de sarcoïdose une accumulation de ce marqueur dans le poumon et des organes extra-thoraciques. Cette fixation était corrélée à la présence de granulomes en histologie et à la captation du ¹⁸F-

FDG au TEP (Manabe et al. 2017; Furuya et al. 2019). Nous avons évoqué dans le chapitre 2.1.3 le lien entre captation du ^{18}F -FDG et glycolyse aérobie ou phénomène de Warburg.

- Enfin, l'accumulation de granulomes dans les bronches ou bronchioles ou les remodelages interstitiels (Nunes et al. 2012; Rossi, Cavazza, et Colby 2015) peuvent entraîner une hypoxie alvéolaire localisée.

3.5.2 Marqueurs d'hypoxie et rôle de HIF au cours de la sarcoïdose

Récemment plusieurs travaux ont montré une surexpression de marqueurs d'hypoxie au cours de la sarcoïdose au niveau des cellules périphériques sanguines (PBMCs dont les monocytes), des cellules de lavage broncho-alvéolaire, des granulomes issus de biopsies pulmonaires, ganglionnaires hépatiques et cutanées (Tzouvelekis et al. 2012; Talreja et al. 2019; Piotrowski et al. 2015). Néanmoins, l'expression de HIF au sein du granulome n'a été qu'inconstamment mise en évidence, et le rôle de l'hypoxie et de la voie de signalisation HIF-1 sur le contrôle du granulome sarcoïdien reste inconnue.

En 2012 Tzouvelekis *et al.* ont étudié l'expression de HIF-1 α par immunohistochimie dans des granulomes pulmonaires et ganglionnaires médiastinaux de patients atteints de sarcoïdose (Tzouvelekis et al. 2012). HIF-1 α était très faiblement exprimé dans le cytoplasme des cellules épithélioïdes du granulome et le taux d'ARNm d' *HIF1A* était plus bas dans les biopsies pulmonaires lors de sarcoïdose que celui de sujets témoins présentant des lésions bénignes pulmonaires (Tzouvelekis et al. 2012). Paradoxalement le VEGF, cible de HIF était surexprimé dans les cellules épithélioïdes du granulome de même que le taux d'ARNm de *VEGF* par rapport aux témoins (Tzouvelekis et al. 2012). A l'inverse, Talreja *et al.* ont pu mettre en évidence la présence de HIF-1 α au sein des cellules épithélioïdes de granulomes pulmonaires, hépatiques et cutanées sarcoïdiens en immunohistochimie (Talreja et al. 2019). Les macrophages alvéolaires et les monocytes sanguins de patients atteints de sarcoïdose présentaient des niveaux de protéines plus élevés pour HIF-1 α que chez des sujets sains (Talreja et al. 2019). Les hypothèses pouvant expliquer une différence d'expression de HIF-1 α seraient des stades de la maladie différents entre les deux études, différents anticorps utilisés pour la détection de HIF-1 α et les traitements immunosuppresseurs chez les patients dans le travail de Tzouvelekis et al (Tzouvelekis et al. 2012).

Le séquençage ARN de monocytes, les analyses protéomiques sur cellules du LBA, ou l'analyse de microARN sur ganglions de patients atteints de sarcoïdose, ont montré une implication de la voie de signalisation HIF-1 et de ses gènes cibles au cours de la sarcoïdose

(Talreja et al. 2019; Zhao et al. 2020; Landi et al. 2015; Garman et al. 2020). L'expression des gènes *HIF1B*, *HIF2A* et *EP300* co-activateurs pour l'activité transcriptionnelle de HIF était plus importante dans les monocytes de patients atteints de sarcoïdose en comparaison aux sujets témoins (Talreja et al. 2019). Dans cette même étude, les macrophages alvéolaires et les monocytes sanguins de sarcoïdose présentaient également des niveaux de protéines plus élevés pour HIF-1 β et p300 (Talreja et al. 2019). Dans l'étude de Zhao *et al.* six microARN étaient exprimés différemment dans des ganglions de patients atteints de sarcoïdose en comparaison à des ganglions tuberculeux (Zhao et al. 2020). Ces microARNs ciblaient en particulier trois gènes : *SERPINE1* (cible de HIF porteur du séquence HRE et codant pour PAI-1), *MAPK1* et *CAMK2D* intervenant dans la régulation de HIF. Au cours de la sarcoïdose, l'élévation sérique de l'ECA peut être le témoin de l'activité de la maladie (*cf* 1.5.3). L'ECA est sécrété par les macrophages alvéolaires mais aussi présent dans les cellules épithélioïdes et les cellules géantes du granulome (Silverstein, Pertschuk, et Friedland 1979). Le gène codant pour l'ECA est porteur d'une séquence HRE et HIF régule la transcription de l'ECA notamment dans les cellules musculaires lisses humaines (Zhang et al. 2009).

Le rôle de HIF dans la sarcoïdose n'est pas établi, mais HIF pourrait être corrélé à la sévérité de la maladie, puisque le niveau d'expression des transcrits *HIF1A* dans les cellules des LBAs de patients est inversement corrélé à la fonction respiratoire évaluée par la DLCO (Piotrowski et al. 2015). HIF-1 pourrait également intervenir dans la régulation de l'inflammation de type Th1/Th17 (Talreja et al. 2019). L'inhibition de HIF-1 dans les macrophages alvéolaires de patients diminuait la production d'IL-1 β , ainsi que dans les PBMCs pour l'IL-1 β , IL-17 et IL-6. De façon intéressante, la chloroquine molécule utilisée dans la sarcoïdose diminuait l'expression de HIF-1 α mais aussi en parallèle celle de l'IL-1 β et de l'IL-17 (Talreja et al. 2019).

Hypothèse et objectifs généraux du travail de thèse

La sarcoïdose est donc une granulomatose systémique dont la/les cause(s) est/sont inconnue(s) et atteignant principalement le poumon. L'évolution de la maladie est hautement variable allant d'une résolution spontanée à une évolution fibrosante irréversible. La sarcoïdose peut réduire l'espérance de vie principalement en raison d'une fibrose pulmonaire induite par le granulome épithélioïde. Du fait, du manque de vascularisation des granulomes pulmonaires, les cellules constituant ces structures comme les macrophages se trouvent en hypoxie. De même, les cellules traversant les zones inflammatoires présentes dans le poumon en cas de sarcoïdose sont probablement hypoxiques et les remaniements interstitiels et bronchiques sont également pourvoyeurs d'une hypoxie locale pulmonaire.

Nous émettons donc l'hypothèse que l'**hypoxie** est un facteur environnemental local favorisant la constitution du granulome, sa **pérennisation** et son évolution vers la **fibrose** au cours de la sarcoïdose.

Pour tester cette hypothèse nous avons mis en place deux stratégies expérimentales :

- Un modèle *in vitro* permettant d'étudier les effets de l'hypoxie sur des macrophages dérivés de monocytes sanguins issus de patients atteints de sarcoïdose et de sujets témoins. Nos objectifs étaient d'étudier l'effet de l'hypoxie, sur les voies de signalisation, la phagocytose, la présentation antigénique, le profil cytokinique.
- Deux modèles murins de granulomatose induite dans un environnement hypoxique. Nos objectifs étaient de mettre au points ces modèles murins, et d'étudier l'effet de l'hypoxie sur l'apparition des granulomes, de la fibrose pulmonaire et sur l'expression de cytokines impliquées dans la pathogénie du granulome et de la fibrose.

Matériels et Méthodes

Cette partie a pu être réalisée grâce à l'encadrement par le Dr Valérie Besnard qui m'a initiée aux différentes techniques décrites ci-dessous.

1. Considérations éthiques et réglementaires

1.1 Prélèvements sanguins humains

Notre travail sur les macrophages dérivés des monocytes sanguins s'est inscrit dans une étude prospective monocentrique menée dans le service de pneumologie du CHU Avicenne (Grand Paris, France) entre 2017 et 2019 ayant reçu l'approbation du comité d'examen institutionnel (CPP Ile-de-France X 2016-10-02) selon la législation française. Le consentement éclairé écrit de tous les participants a été obtenu pour les investigations biologiques. Les patients atteints de sarcoïdose ont été inclus s'ils étaient âgés d'au moins 18 ans et présentaient un diagnostic de sarcoïdose pulmonaire selon les critères (ATS/ERS/WASOG 1999). Les personnes ayant reçu un traitement corticostéroïde ou immunosuppresseur au cours des 6 derniers mois n'ont pas été incluses. Les patients atteints de sarcoïdose ont été divisés en deux sous-groupes : sarcoïdose de forte activité pulmonaire (AS) et sarcoïdose pulmonaire de faible activité ou « inactive » (IS). L'activité pulmonaire de la sarcoïdose a été déterminée selon le score abrégé *Computed Tomography Activity Score* aCTAS (Benamore et al. 2016). En bref, l'aCTAS comprend la somme de la présence (1) ou de l'absence (0) de nodules/micronodules, de verre dépoli, de condensations et d'épaississements péribronchovasculaires. Le score va de 0 à 4. Les patients ont été classés AS si aCTAS \geq 2 et IS si aCTAS $<$ 2. En cas de fibrose pulmonaire, une augmentation significative de l'accumulation (plus élevée que celle hépatique) du 18FDG au TEP a été utilisé pour classer le patient ayant une maladie pulmonaire de forte activité. Des volontaires sains âgés de \geq 18 ans, sans antécédent de sarcoïdose ont été évalués comme sujets témoins et appariés pour l'âge (\pm 5 ans), le sexe et le tabagisme avec les patients atteints de sarcoïdose. Les dossiers médicaux de tous les patients ont été examinés (Dr Florence Jeny). Les données démographiques, les stades radiographiques selon Scadding, la fonction respiratoire (spirométrie et DLCO), le scanner thoracique, et la présence d'atteintes extra thoraciques étaient concomitants au prélèvement sanguin.

1.2 Modèles murins expérimentaux

Nous avons utilisé des souris C57BL/6J âgées de 8 à 12 semaines. La lignée C57BL/6J est la souche de souris la plus utilisée dans la littérature pour l'induction de granulomatose

pulmonaire (Jeny et al. 2016; Jeny et Grutters 2020). Les souris fournies par l'élevage Janvier (Le Genest St Isle, France) ont été hébergées dans l'animalerie de l'UFR SMBH de Bobigny au statut sanitaire contrôlé répondant aux normes de confinement et d'hygiène en vigueur (agrément # A-93-008-01, arrêté préfectoral N°06-2208 du 2 juin 2006 (Classe A1) renouvelé en 2017). Les expérimentations animales ont été conformes au cadre réglementaire et éthique concernant l'expérimentation animale en vigueur dans notre institut (Université Sorbonne Paris-Nord) et ont été dirigées par le Dr Valérie Besnard, détentrice d'un DU de Formation en expérimentation Animale (Niveau 1) et d'une Autorisation ministérielle (Apafis 3757). Une attention particulière était portée sur la réduction du nombre d'animaux utilisés, et sur la diminution de la souffrance de l'animal. Chaque procédure invasive était précédée d'une anesthésie des animaux.

2. Culture cellulaire

2.1 Isolement des macrophages dérivés de monocytes sanguins humains (hMDMs)

Vingt ml de sang total prélevé dans des tubes EDTA pour une analyse hématologique de routine ont été collectés. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées en utilisant une séparation par gradient de densité Ficoll-Paque™ plus (GE Healthcare # 17-1440-03) (densité 1,077 g/ml). Les monocytes ont été purifiés à partir de PBMC par sélection négative après séparation de la population non-monocytaire en utilisant le Pan Monocyte Isolation Kit (130-096-537, Miltenyi Biotec, France) selon les instructions du fabricant, puis ensemencés à une densité 1×10^6 and 0.5×10^6 par puits dans des plaques 12 puits ou 6 puits respectivement. La pureté de la population des monocytes enrichis a été évaluée supérieure à 90% par cytométrie en flux en utilisant un anticorps souris anti-CD14 humain couplé APC-Cy™7 (BD Biosciences # 557831).

2.2 Culture des hMDMs

Les monocytes ont été cultivés dans un milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 GlutaMAX™ contenant 2 mM de glutamine, 25 mM d'HEPES (Gibco # 72400021), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco # 10270), pénicilline / streptomycine (Gibco # 15140-122). Les monocytes ont été différenciés en macrophages en présence de 5 ng/ml de *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) (BioTechne, France # 216-MC) pendant 10 jours dans une atmosphère 5% CO₂ -95% air (soit 21% O₂). Le milieu a été changé tous les 3 jours. La production de « milieux conditionnés » de macrophages dérivés de

monocytes a été réalisée en cultivant 1.10^6 cellules en présence de 500 μ l de milieu RPMI sans SVF dans un environnement normoxique (FiO_2 : 21%) ou hypoxique (1,5%)(Figure 24).

Pour les expériences d'immunocytofluorescence, les hMDMs ont été cultivés sur une lame Labtek à 8 puits (Ibidi, France) à une densité de 200.10^3 cellules / puits et placés à 37°C pendant 24h.

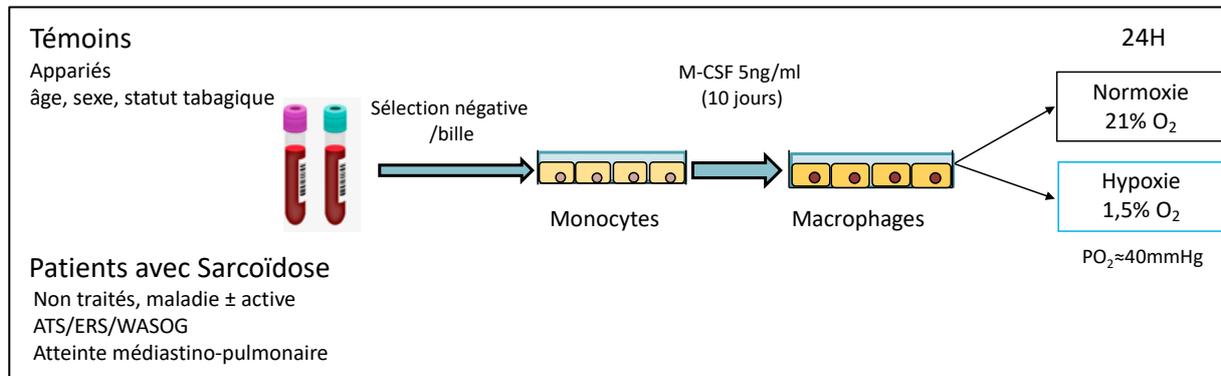


Figure 24: Schéma représentant la culture cellulaire des hMDMs

2.3 Lignée NHLF

Des fibroblastes pulmonaires humains normaux, NHLF (Lonza, CC-2512) ont été cultivés dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine, 10 μ g/ml de gentamycine, 10% de SVF. Les NHLF ont été utilisés aux passages 6 à 9.

3. Modèles expérimentaux murins

3.1 Modèle des nanotubes de carbone

Nous avons utilisé des nanotubes de carbone identiques à l'étude de Huizar et col. (Huizar et al. 2011): L purified-Multiwallcarbon nanoparticles (Référence 900-1201, 1g, lot GS1802, SES Research, Houston, Texas). Ces nanotubes (NTs) présentent un diamètre entre 10 et 40 nm, avec une surface de $85,75m^2/g$. Les NTs sont resuspendus dans du PBS à la dose de 2 mg/ml, puis sont soumis à une sonification 3 fois pendant 10 min. Les souris ont été instillées par voie intratrachéale, avec une solution de NTs de 50 μ L à la concentration de 2mg/ml (dose de 100 μ g). Le sacrifice avait lieu entre 75 et 90 jours après l'instillation.

3.2 Modèles de *Propionibacterium Acnes* (récemment *Cutibacterium Acnes*)

La souche de *Propionibacterium acnes* (PA) (ATCC 6919) a été déjà utilisée pour des modèles de granulomatose (McCaskill et al. 2006; Besnard et Jeny 2020) et provenait du fournisseur «

American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) ». Les bactéries PA ont été cultivées sur une gélose spécifique aux bactéries anaérobies (260 tryptic soy Agar : BD 236950, Sigma Aldrich) enrichie en sang de mouton dans une chambre anaérobie (80% N₂, 10%CO₂, 10% H₂). Des colonies de PA ont été isolées de cette gélose de sang de mouton, puis cultivées dans un milieu liquide spécifique (Tryptic soy broth BD 211825, Sigma Aldrich), enrichi en sang de mouton, pendant 48h dans une chambre anaérobie. La culture bactérienne obtenue était centrifugée (1400 rpm, 4°C, 10 min), le culot bactérien lavé au PBS à 2 reprises, pesé, puis dilué dans du PBS de façon à obtenir une solution de stockage à 400mg/ml. Les aliquots de PA étaient ensuite inactivés par congélation à -80°C. Les sensibilisations ont été optimisées par l'utilisation d'adjuvant de Freund complet et incomplet. La forme complète (CFA) comprend une des souches de *Mycobacterium tuberculosis* inactives et séchées dans de l'huile de paraffine (F5881-10ML Sigma-ALDRICH). La forme incomplète (IFA) comprend uniquement de l'huile de paraffine (F5506-10ML SIGMA-ALDRICH).

Plusieurs protocoles ont successivement été testés pour optimiser progressivement le modèle :

Protocole 1 : IP + ITx1 selon (McCaskill et al. 2006) : Les souris étaient sensibilisées par une injection intrapéritonéale (IP) de PA à la dose de 400µg dilué dans 50µL de PBS. Deux semaines après la sensibilisation, une instillation intratrachéale (IT) de PA (400µg dilués dans du PBS pour un volume total de 50µl) était effectuée. Les souris témoins recevaient une sensibilisation et une instillation IT avec du PBS.

Protocole 2 : IFA + ITx1 : Sensibilisation optimisée avec IFA. Le protocole de sensibilisation a été adapté de Kishi (Kishi et al. 2011). La sensibilisation a été effectuée par voie sous cutanée au niveau de la paume de la patte arrière, par l'injection de 50µL d'une solution composée pour 25µL d'IFA et de 25µL de PA dilué dans du PBS. Deux semaines après, les souris ont reçu une instillation intratrachéale le PA dilué dans du PBS. Des doses croissantes de PA ont été testées (400, 600, 800µg dilués dans un volume total de 50µL de PBS).

Protocole 3 : CFA+ ITx1 : Optimisation de la sensibilisation par CFA. Le protocole de sensibilisation par CFA a été adapté de (Minami et al. 2003; Iio et al. 2010). La sensibilisation a consisté en l'injection sous cutanée dans la paume de la patte arrière d'une mixture composée de 25µL de CFA et de 25µL de PA dilué dans du PBS. Elle était suivie deux semaines après par un challenge intratrachéal, avec une dose identique de PA utilisée entre la sensibilisation et le challenge. Des doses croissantes ont été testées (400, 600, 800 et 1000µg de PA dilués dans un volume total de 50µL de PBS).

Protocole 4 : IT de PA vivant (Werner et al. 2017): Le modèle expérimental de Werner et al. a consisté en l'instillation intratrachéale de 10⁹ UFC de PA vivant (4000 µg en équivalence).

Une instillation unique de PA vivant a été effectuée à des doses croissantes (400, 600, 800, 1000, 2000, 4000 μ g).

Protocole 5 : ITx1 : Instillation intratrachéale de PA inactivé à fortes doses : Afin de comparer la tolérance et l'efficacité de l'instillation vivante de PA par rapport à l'instillation de PA inactivé par la chaleur, un modèle expérimental a consisté en une instillation unique de PA inactivé à des doses croissantes (1000, 2000 ou 4000 μ g).

Protocole 6 : ITx2 : soit deux instillations intratrachéales de PA inactivé à fortes doses. La première instillation intratrachéale de PA inactivé par la chaleur était suivie à 15 jours d'une deuxième instillation intratrachéale à la même dose. Des doses croissantes ont été testées (1000, 2000, ou 4000 μ g). La répétition de doses intratrachéales avait été utilisée par Jiang (Jiang et al. 2016)

Protocole 7 : CFA + ITx2 : Sensibilisation avec CFA et PA par voie en sous cutanée suivie de 2 challenges intratrachéaux de PA. La sensibilisation au PA associée au CFA était suivie de 2 challenges au PA en IT, espacés de 15 jours d'intervalle, avec une dose identique de PA utilisée entre la sensibilisation et les challenges. Des doses croissantes ont été testées (400, 600, 800, ou 1000 μ g) (Figure 25).

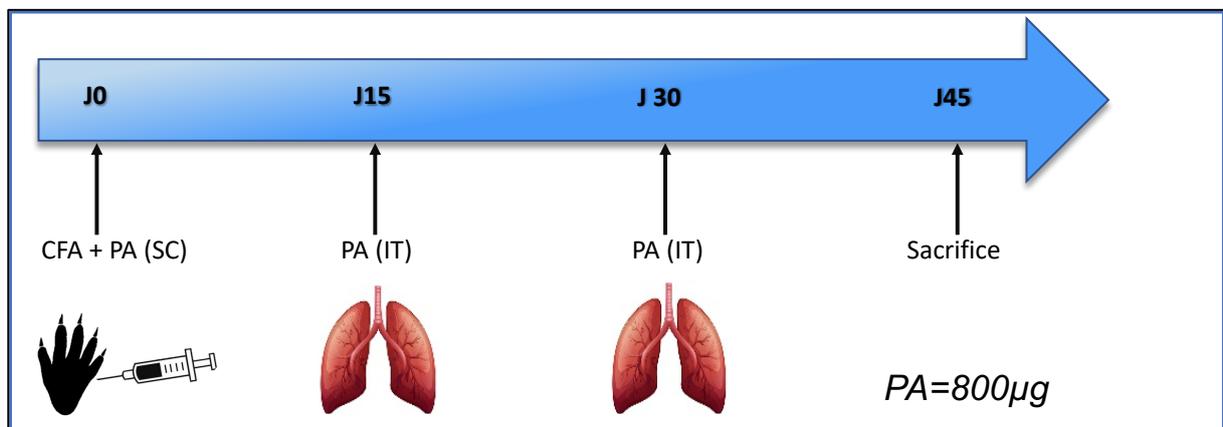


Figure 25: Protocole 7 du modèle murin de granulomatose pulmonaire induit par le P.acnes
CFA : adjuvant complet de Freund, PA : Propionibacterium acnes ; IT : Intratrachéale ; SC : sous cutanée.

Pour l'ensemble de ces sept modèles le sacrifice a eu lieu entre 12 et 15 jours après la dernière instillation de PA. Les souris témoins (nommées souris PBS) recevaient à la place du PA du PBS. Le reste du protocole était inchangé y compris l'administration de CFA ou IFA.

4. Traitement hypoxique

4.1 Culture cellulaire

La culture cellulaire en conditions hypoxiques a été réalisée dans une chambre hermétique humidifiée (Saint Bernard Technologies, AYDAT) équilibrée avec un mélange gazeux contenant 1,5% O₂ - 5% CO₂ - 93,5% N₂ (tension d'oxygène dans les milieux de culture : 45 mmHg), et maintenue à 37 ° C pendant 24 heures. Les cellules normoxiques témoins ont été maintenues dans un incubateur humidifié 21% O₂ - 5% CO₂ - 74% N₂ pendant la même période de temps (tension d'oxygène dans les milieux de culture : 140 mmHg).

4.2 Modèle murin

Les souris ont été exposées à une hypoxie chronique (Hx) ou à la normoxie (Nx). L'hypoxie chronique a été effectuée pendant les 14 jours précédant le sacrifice. Le groupe hypoxie était logé dans un caisson hypobare, maintenu à une pression de 375 mm Hg (correspondant à une altitude de 5570 mètres, ou équivalent d'une FiO₂ à 10% en condition normobarique) par une source de vide à des débits suffisants pour empêcher l'accumulation de CO₂. La chambre est dépressurisée à 760 mm Hg (pression correspondant au niveau de la mer) une fois par semaine pendant 30 min pour nettoyer les cages et renouveler l'eau et la nourriture. Le groupe normoxie était gardé à l'extérieur de la chambre hypobare à 760 mmHg. Le nombre d'animaux utilisés dans chaque modèle et chaque groupe expérimental est présenté dans la **Figure 26**.

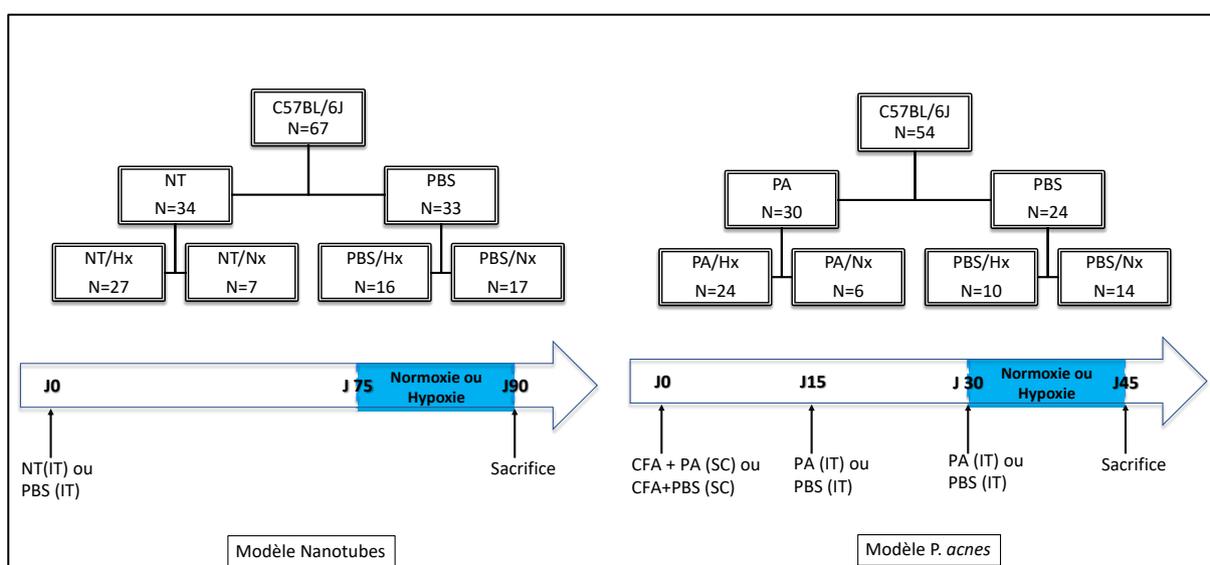


Figure 26 : Présentation du nombre d'animaux utilisés par modèle et représentation des schémas expérimentaux. Abréviations : NT : nanotubes, Hx : hypoxie ; Nx : normoxie, IT : intratrachéal ; PBS : phosphate buffer saline ; PA : P. acnes ; SC : sous-cutané

5. Étude histologique et immunochimique

5.1 Préparation des échantillons

5.1.1 Culture cellulaire

A la fin de la culture cellulaire, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS froid et fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde. Après fixation, les lames ont été lavées trois fois avec du PBS pH 7.4.

5.1.2 Tissus humains et murins

Les échantillons humains (déjà inclus en paraffine) nous ont été fournis par le service d'anatomopathologie (Dr Marianne Kambouchner) de l'Hôpital Avicenne. L'autorisation d'accès à ces échantillons a été validée par le comité local d'éthique de l'hôpital Avicenne (CLEA-2019-100).

Les échantillons murins fixés en PFA 4%, étaient d'abord rincés dans une solution de PBS pH 7.4 avant d'être déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante (30%, 50%, 70%, 80%, 95% et 100%). Afin de permettre l'inclusion des tissus en paraffine, les échantillons étaient traités par trois bains successifs de xylène. Les blocs inclus en paraffine étaient ensuite coupés en préparation de 4 µm d'épaisseur, sous forme sériée.

5.2 Colorations histologiques

5.2.1 Déparaffinage et réhydratation des coupes histologiques

Avant coloration ou immunomarquage des coupes histologiques, une étape de déparaffinage/réhydratation était effectuée : les lames étaient traitées dans 3 bains successifs de xylène (3x 10min), puis réhydratées dans un gradient décroissant d'éthanol : éthanol 100% (2x 5 min), éthanol 95% (2x 5 min), éthanol 70% (1x 5 min) suivie par une réhydratation finale (eau déionisée, 5min).

5.2.2 Coloration Hématoxyline-Eosine (HE)

Des colorations HE ont été effectuées pour étudier l'histologie générale des tissus murins, en particulier observer la présence d'infiltrats inflammatoires éventuels. Après déparaffinage/réhydratation, les coupes histologiques ont été colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 4 min, puis rincées à l'eau ionisée pendant 5min. Après passage dans un bain d'éthanol 95%, les lames étaient colorées à l'éosine alcoolique (2 min). Après un rinçage rapide

dans d'éthanol 95%, les lames étaient passées en xylène pour un montage en milieu non-aqueux.

5.2.3 Coloration Trichrome de Masson

Les colorations trichromiques de Masson ont été effectuées pour évaluer la présence de dépôt de collagène. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes histologiques étaient colorées en présence d'hématoxyline de Weigert (10min), et rincées avec de l'eau ionisée pendant 5 min. Puis les lames étaient colorées avec la fuschine acide de Biebrich scarlet (5min), et rincées dans de l'eau déionisée (5min). Elles étaient ensuite traitées dans une solution d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique (5min), colorées avec une solution d'aniline bleue (5min) et enfin fixées dans un bain d'acide acétique (2min). Après rinçage à l'eau distillée, les lames étaient déshydratées dans un gradient croissant d'éthanol, passées en xylène pour un montage des lames en milieu non-aqueux.

5.3 Immunocytofluorescence

Les Labtek contenant des cellules ont été incubées dans du tampon de blocage (PBS contenant 0,1% Triton X-100, 1%BSA). Après lavage, les lames ont été incubées pendant une nuit à 4 ° C dans une chambre humidifiée avec un anticorps anti-HIF-1 α (Novus # NB100479), anti-HIF-2 α (Novus #NB100-122) ou un contrôle isotypique (Vector Laboratories, USA). Après lavage, les lames ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué Alexa-fluor 568 (# A11036 Invitrogen) pendant 30 minutes. Finalement, après lavage, les lames ont été montées dans un milieu de montage Vectashield en présence de DAPI (Vector Laboratories, USA). La fluorescence a été observée en utilisant un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop.

Pour mettre en évidence la présence d'un environnement hypoxique dans les cellules, indépendamment du facteur de transcription HIF, 400 μ M de pimonidazole (Hypoxyprome™) ont été ajoutés dans le milieu de culture 2H avant la fixation. Le pimonidazole est activé après réduction dans les cellules hypoxiques. L'intermédiaire activé forme un covalent stable avec des groupes thiol (sulfydryle) dans les protéines, les peptides et les acides aminés. L'anticorps anti-pimonidazole MAb1 se lie à ces adduits permettant leur détection par des moyens immuno-chimiques. Les cellules fixées ont été immunomarquées comme décrit ci-dessus en utilisant l'anticorps monoclonal souris anti-pimonidazole (Hypoxyprome™ kit, clone 4.3.11.3, 1/50) pendant une nuit à 4° C avec 5% de BSA. L'anticorps secondaire utilisé était un anticorps anti-souris de chèvre conjugué à Alexa-fluor 488 (# A11029 Invitrogen).

5.4 Immunohistochimie

Après déparaffinage-réhydratation, un démasquage des sites antigéniques a été réalisé par incubation dans un tampon citrate pH6, ou dans un tampon Tris-EDTA pH9, selon les anticorps, chauffé à 95°C. L'inhibition des peroxydases endogènes a été réalisée par incubation dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% diluée dans du méthanol. Le blocage des sites non-spécifiques était effectué par incubation des lames dans du PBS pH7.2 contenant 2% sérum de cheval (Vector Laboratories, USA). Les coupes histologiques étaient ensuite incubées à 4°C, toute une nuit en chambre humide, en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS pH7.2 contenant 2% sérum de cheval. Après lavage au PBS-T (tampon PBS pH7.2 contenant 0.1% de Tween), les coupes histologiques étaient incubées à température ambiante, pendant 30 min en chambre humide, en présence de l'anticorps secondaire biotinylé (Vector Laboratories, USA) dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire. La révélation des complexes anticorps primaires/secondaires a été réalisée en incubant à température ambiante, pendant 30 min en chambre humide, les coupes histologiques avec le kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, USA). La mise en évidence des complexes a été réalisée en présence de DAB (3,3'diaminobenzidine), substrat de la peroxidase couplée aux complexes anticorps primaires/secondaires. Le signal DAB est amplifié par l'addition d'un complexe Nickel/Cobalt qui donne un précipité noir. Finalement, les lames sont contre-colorées au nuclear Fast Red. Après déshydratation et passage en xylène, un montage en milieu non-aqueux a été réalisé.

Tableau 4: Liste des anticorps/témoins isotypiques utilisés en immunohistochimie

Tissus murins				
Cible	Fournisseur	Clone	Démasquage	Dilution
HIF-1 α	Novusbio	Nb100-479	Citrate pH6	1/600
Isotype lapin	Southern Biotech	0111-01	Selon Ac primaire	Selon Ac primaire
Tissus humains				
Cible	Fournisseur	Clone	Démasquage	Dilution
HIF-1 α	Bioss Inc	bs0737	Tris-EDTA pH9	1/500

CD68	DAKO	PG-M1	Citrate pH6	1/1
PAI-1	BioTechne	AF1786	Citrate pH6	1/200
Isotype souris	Southern Biotech	0107-01	Selon Ac primaire	Selon Ac primaire
Isotype lapin	Southern Biotech	0111-01	Selon Ac primaire	Selon Ac primaire

6. Étude transcriptionnelle

6.1 Extraction des ARNs

L'extraction et la purification des ARNm ont été réalisées à partir des broyats pulmonaires obtenus après broyage mécanique (Ultraturax) pour le modèle murin ou par lyse directe des cellules en culture, en utilisant le Trizol (Life Technologies, ThermoFisherScientific, France) qui solubilise le matériel biologique et dénature les protéines. Après solubilisation, l'addition de chloroforme provoque la séparation des phases aqueuse et organique. Les acides nucléiques de type ARN sont présents dans la phase aqueuse. Après prélèvement de la phase aqueuse, les ARNs sont ensuite précipités en présence de glycogène, d'acétate de sodium 3M (1/10 volume final) et d'éthanol 95% (2x le volume final), à -80°C pendant au moins 24h. Après centrifugation (13000 tr, 30 min, 4°C), les culots d'ARN sont lavés en présence d'éthanol 70% et resuspendus dans 20µL d'eau RNase free. La concentration en ARN est évaluée par spectrophotométrie (Nano Drop ThermoScientific).

6.2 Transcription inverse

L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé par transcription inverse de l'ARNm en utilisant 1µg d'ARN totaux par échantillon. La rétro-transcription est réalisée en utilisant le Reverse transcription system (Promega, France) en présence de Random Primers et Oligo(Dt)15 Primer. La transcription inverse est réalisée avec un thermocycleur (Techne, Tc-512) avec une incubation d'1h à 37°C. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C.

6.3 Poly Chain Reaction (PCR) quantitative (PCRq)

La PCRq est réalisée sur les ADNc dilués au 1/20 dans de l'eau RNase/DNase free. Les couples d'amorces pour les PCRq ont été générés en utilisant l'outil informatique en ligne

gratuit « Real-time PCR (TaqMan) Primer Design » de la société GenScript®. Les réactions de PCRq ont été réalisées en utilisant le Master Mix PCR Power SYBR™ Green (ThermoFisher Scientific, France) et des amorces à une concentration finale de 0.5µM. La PCRq est réalisée avec un thermocycleur (StepOne Plus Real-time PCR System, AB Applied Systems) selon les conditions suivantes : 10 min à 95°C, puis 15 secondes à 95° C pour dénaturation, 1 minute à 60° C pour hybridation et élongation (40 cycles). L'analyse des données a été effectuée grâce à la méthode 2ΔΔCt en utilisant comme gène rapporteur l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (*Hprt1*) pour l'étude des ARNm issus de la souris, et l'ubiquitine C (*UBC*) pour l'étude des ARNm issus de cellules humaines. Les amorces ont été choisi grâce au site du *National Center for Biotechnology Information* issu du NIH.

Tableau 5: Liste et séquences des amorces utilisées sur les échantillons d'origine humaine

Gènes humains	Amorce sens (5' → 3')	Amorce anti-sens (5' → 3')
<i>UBC</i>	CACTTGGTCCTGCGCTTGA	TTTTTTGGGAATGCAACAACCTT
<i>CXCL8</i>	AGGACAAGAGCCAGGAAGAA	ACTGCACCTTCACACAGAGC
<i>TNF-α</i>	CCCATGTTGTAGCAAACCCT	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT
<i>IL-1β</i>	AATCTGTACCTGTCTGCGTGTT	TGGGTAATTTTTGGGATCTACTCT
<i>IL-18</i>	GGGAAGAGGAAAGGAACCTC	CCATCTTTATTCTGCGACA
<i>IL-10</i>	TGAGAACCAAGACCCAGACA	AAAGGCATTCTTCACCTGCT
<i>CXCL8</i>	AGGACAAGAGCCAGGAAGAA	ACTGCACCTTCACACAGAGC
<i>PDGFB</i>	TCGATCCGCTCCTTTGATGA	GGAACCCAGGCTCCTTCTTC
<i>VEGF</i>	CTCCACCATGCCAAGTGGTC	TCCACCAGGGTCTCGATTGG
<i>TGFβ1</i>	TTTGATGTCACCGGAGTTGT	TAGTGAACCCGTTGATGTCC

Tableau 6: Liste et séquences des amorces utilisées sur les échantillons d'origine murine

Gènes murins	Amorce sens (5' → 3')	Amorce anti-sens (5' → 3')
<i>Hprt1</i>	AAAGGACCTCTCGAAGTGTT	GTCAAGGGCATATCCAACAA
<i>Tnfa</i>	TCGTAGCAAACCACCAAGTG	TTGTCTTTGAGATCCATGCC
<i>Vegfa</i>	GCTCTCTGGGTGCACTGGA	GCTCTCCTTCTGTCGTGGGT
<i>Il12b</i>	CAGCAAAGCAAGATGTGTCC	GGGAGTCCAGTCCACCTCTA
<i>Ccl3</i>	CGCCATATGGAGCTGACA	GCCGGTTTCTCTTAGTCAGG

<i>Cxcl9</i>	AGGCCTGTCTGTTTGCTGGT	ACGTGGGAGGTTCTGAAGGC
<i>Pdgfb</i>	TCGCCTGCAAGTGTGAGACA	CCGAATGGTCACCCGAGCTT
<i>Ctgf</i>	GAGTGTGCACTGCCAAAGAT	GGCAAGTGCATTGGTATTTG
<i>Col3a1</i>	TACACCTGCTCCTGTGCTTC	CATTCTCCCACTCCAGACT
<i>Fn1</i>	TGGTGCCACTAAATACGAA	GGAGGGCTAACATTCTCCAG
<i>Il18</i>	GCTGTGACCCTCTCTGTGAA	GTCCTGGAACACGTTTCTGA
<i>Il4</i>	GGAGATGGATGTGCCAAAC	AGCCCTACAGACGAGCTCAC

7. Études protéiques

7.1 Préparations des échantillons

7.1.1 Milieux conditionnés

A la fin de la culture cellulaire, les milieux conditionnés ont été collectés, centrifugés (900 rpm, 10 min, 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires éventuels et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

7.1.2 Protéines intracellulaires totales

A la fin de la culture cellulaire, les cellules sont lysées par addition de 100 µl de tampon de lyse (250 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,0, 5 mM EDTA, 1 mM de dithiothréitol (DTT), 0,1% Nonidet NP40, 10 µg/ml d'aprotinine, 10 µg/ml de leupeptine, 50 µg/ml de fluorure de phénylméthylsulfonyl, 2 mM de pyrophosphate de sodium, 1 mM d'orthovanadate de sodium). Après centrifugation (10000 × g, 30 min, 4 ° C), la teneur en protéines du lysat cellulaire a été déterminée à l'aide du kit de dosage de protéines Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, France # 23225). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

7.2 Proteome array

Nous avons utilisé le proteome profiler™ Human XL Cytokine Array (Bio-technique # ARY022B) afin d'identifier des cytokines dont l'expression serait distincte dans le milieu conditionné des hMDMs de sujet témoin et de patient atteints de sarcoïdose. Cette méthode donne des résultats qualitatifs et peu quantitatifs. Dans ces expériences, les milieux conditionnés de hMDMs d'un sujet témoin et de deux patients ayant une sarcoïdose de forte activité ont été analysés.

Le kit Proteome Profiler est un immunoessai-sandwich, réalisé sur membrane de nitrocellulose, capable de détecter simultanément 105 cytokines (Liste complète disponible à l'adresse suivante : <https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-xl-cytokine-array->

kit_ary022b). Les anticorps de capture, présents en double sur les membranes de nitrocellulose se lient à des protéines cibles spécifiques présentes dans le milieu conditionné des hMDMs. Les protéines capturées sont détectées avec des anticorps de détection biotinylés, puis visualisées à l'aide de réactifs de détection chimioluminescents. Le signal produit est proportionnel à la quantité d'analyte lié.

7.3 Dosage des cytokines

Les cytokines ont été choisies en fonction des résultats de PCRq et du Proteome array.

7.3.1 Multiplex

Les cytokines/chimiokines présentes dans des milieux conditionnés (IL-1 β , CXCL8, TNF α , IL-10, PDGF-BB, PAI-1, VEGF-A, IL-18, IL-5, IL-4, IL-6, IL-22, CXCL1, CXCL9, MIF, MCP1) ont été dosées (non diluées, en double) par multiplex -billes (ProcartaPlexTM Multiplex Immunoassay (Invitrogen) # PPX-16-MXH497N) conformément aux instructions du fabricant. Les concentrations de cytokines étaient automatiquement calculées ou extrapolées si elles étaient proches de la limite inférieure de détection par le logiciel xPONENT.

7.3.2 ELISA TGF- β 1

Les concentrations de TGF β 1 actif (= libre) et total (= libre + latent) dans les milieux conditionnés ont été déterminées par dosage immuno-enzymatique (ELISA) en utilisant des kits Duo Set (systèmes R&D # DY240) selon les instructions du fabricant.

7.4 Quantification de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription HIF-1 α et NF- κ B

La liaison à l'ADN des facteurs de transcription HIF-1 α , NF- κ B-p50 et -p65 (formes activées) a été mesurée en utilisant les kits suivants : TransAM[®] HIF-1 (# 47096), NF- κ B p50 (# 41096) et NF- κ B p65 (# 40096) de chez Active Motif (Belgique) selon le protocole du fabricant.

Les kits TransAM permettent de doser la liaison du facteur de transcription à un site de liaison consensus. Des extraits cellulaires de hMDMs (50 μ g de protéines intracellulaires totales) ont été ajoutés à chaque puits contenant un oligonucléotide du site de liaison consensus du facteur de transcription d'intérêt. Si la forme activée (capable de se lier à l'ADN) de celui-ci est présente dans les extraits protéiques, elle se lie spécifiquement à cet oligonucléotide. Un anticorps primaire spécifique d'un épitope de la forme liée et active du facteur de transcription est ensuite ajouté, suivi d'une incubation ultérieure avec un anticorps secondaire et une solution de développement permettant de quantifier par lecture colorimétrique à 450nm.

8. Étude de la phagocytose des hMDMs

La phagocytose a été testée en utilisant des fluospheres™, microsphères de 1 µm de diamètre modifiées au carboxylate émettant une fluorescence jaune-vert (505/515) (# F8823 Invitrogen, ThermoFisherScientific, France) avec un équivalent de 200 particules par cellule (Enomoto et al. 2013). Les macrophages dérivés de monocytes ont été incubés avec des fluospheres™ pendant 30 min dans des plaques de culture, puis lavés 4 fois avec du PBS pour éliminer les microsphères libres et fixés avec du PFA à 4%. Les cellules ont été observées en utilisant un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop. La phagocytose a été estimée par le nombre de cellules ayant au moins une particule par rapport au nombre total de cellules sur 4 champs (objectif x100 plaques de 24 puits).

9. Étude de la migration et de la prolifération de fibroblastes pulmonaires humains en réponse au milieu conditionné de hMDMs

Les propriétés migratoires des NHLF ont été testées en plaçant un insert calibré de 0,7 mm sur la surface de culture avant l'ensemencement cellulaire. Les cellules NHLF ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits non revêtues, à une densité cellulaire de 30×10^3 cellules / puits. Après 24H, l'insert a été retiré, les cellules ont été lavées deux fois avec du RPMI et cultivées pendant 24 heures dans différents milieux de culture (voir ci-dessous) contenant tous 10% de SVF.

Plusieurs groupes expérimentaux ont été mis en place :

- (i) Incubation avec des « milieux conditionnés » de macrophages dérivés de monocytes contenant soit l'anticorps dirigé contre l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène anti-humain-1 (hPAI-1) (Bio-Techne # AF1786), soit le contrôle isotypique (Bio-Techne # AB-108-C) à une concentration finale de 20ng / ml ;
- (ii) Incubation dans du milieu RPMI en présence soit de l'anticorps hPAI-1, soit le contrôle isotypique, soit la protéine recombinante hPAI-1 (Bio-Techne # 1686-PI-010) ou son véhicule.

La migration cellulaire a été suivie en enregistrant des images en microscopie en contraste de phase (3 images, objectif x50) à deux temps distincts : 0 h et 24 h. Le logiciel Image J a été utilisé pour mesurer la surface existante entre les deux fronts de migration, et le pourcentage de fermeture a été estimé par la différence à 24 heures entre la zone initiale et la zone finale par rapport à la zone initiale.

La prolifération des NHLF a été évaluée sur des cellules NHLFs cultivées en présence de milieux conditionnés de macrophages dérivés de monocytes pendant 24 heures. A la fin de la culture, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. L'expression du marqueur de prolifération Ki-67 (phase G1, S, G2 et M du cycle cellulaire) a été mise en évidence en utilisant un anticorps monoclonal de rat anti-Ki67 (# 14-5698-82 Invitrogen, ThermoFisherScientific, France) pendant une nuit à 4 ° C. L'anticorps secondaire utilisé a été un anticorps de chèvre anti Ig de rat conjugué à l'Alexa-fluor 555. Les noyaux cellulaires ont été mis en évidence par le DAPI et les lames montées avec Vectashield (Vector Laboratories, USA). L'indice de prolifération a été estimé à l'aide du logiciel Image J par le nombre de cellules Ki67⁺ sur le nombre total de cellules DAPI⁺ sur 2 champs situés le long et à l'extérieur des fronts de migration (objectif x50).

10. Cytométrie en flux

L'expression de marqueurs de surface cellulaire a été étudiée sur les macrophages dérivés de monocytes en utilisant des anticorps fluorescents dirigés contre les molécules suivantes : CD14, CD80, CD86, HLA-DR, CD36 et leurs contrôles isotypiques (Tableau 7)

A la fin de la culture cellulaire, les cellules ont été détachées par du PBS-EDTA 1 mM, lavées avec du PBS-SVF 2% et incubées en présence de l'anticorps primaire ou du contrôle isotypique pendant 30 min à 4 ° C dans une solution de PBS contenant du SVF 2% et de l'albumine sérique bovine 5% (sigma # A7030). Pour HLA-DR, les cellules ont été fixées à l'aide du tampon de fixation BD cytofixTM (BD bio sciences # 554655) pendant 30 min à 4 ° C puis perméabilisées avec de la saponine 0,1% (sigma # S7900C) pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été incubées avec des anticorps antiHLA-DR et antiCD14 ou un isotype à 4 ° C. Une compensation entre les différents anticorps fluorescents a été effectuée avant les expériences en utilisant le jeu de particules de compensation (BD Biosciences # 552843). Au moins 20 000 cellules par échantillon ont été analysées en cytométrie en flux sur un cytomètre Canto II, BD Biosciences et l'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel BD FACS DivaTM.

Tableau 7: Liste des anticorps/témoins isotypiques utilisés en cytométrie en flux

Fournisseur	Anticorps/Isotype	Fluorochrome	Clone	Référence
BD Biosciences	Mouse, Anti-Human CD14	APC-Cy ⁷	MφP9	557831
BD Biosciences	Mouse, IgG2b, κ	APC-Cy ⁷	27-35	558061

BD Biosciences	Mouse, Anti-Human CD86	PE-Cy ⁷	2331	561128
BD Biosciences	Mouse IgG1, κ	PE-Cy ⁷	MOPC-21	557656
BD Biosciences	Mouse anti-Human HLA-DR	APC	TU36	559868
BD Biosciences	Mouse IgG2b, κ	APC	27-35	555745
BD Biosciences	Mouse anti-Human CD36	APC	CB38	550956
BD Biosciences	Mouse IgM, κ isotype control	APC	G155-228	555585
BD Biosciences	Mouse anti-Human CD80	PE	L307.4	557227
BD Biosciences	Mouse IgG1, κ	PE	MOPC-21	554680

Travaux expérimentaux

1. Effet de l'hypoxie sur des macrophages dérivés de monocytes sanguins chez des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire

1.1 Objectifs de travail

Dans ce premier travail portant sur un modèle *in vitro* nous avons étudié les effets de l'hypoxie sur des macrophages dérivés de monocytes sanguins issus de patients atteints de sarcoïdose à divers degrés d'activité et de sujets témoins sains. Nos objectifs étaient d'étudier l'effet de l'hypoxie, sur les voies de signalisation induites, la phagocytose, la présentation antigénique, le profil cytokinique induit.

1.2 Article

Nous avons soumis l'article ci-dessous intitulé :

« Hypoxia promotes a mixed inflammatory-fibrotic macrophages phenotype in active sarcoidosis ».

Hypoxia promotes a mixed inflammatory-fibrotic macrophages phenotype in active sarcoidosis

Florence Jeny^{1,2}, Jean-François Bernaudin^{1,3}, Dominique Valeyre^{1,2}, Marianne Kambouchner^{1,4}, Marina Pretolani⁵, Hilario Nunes^{1,2}, Carole Planès^{1,6*}, Valérie Besnard^{1*}

- 1- INSERM UMR 1272, Université Sorbonne Paris-Nord, Bobigny, France
- 2- AP-HP, Service de pneumologie, Hôpital Avicenne, Bobigny, France
- 3- Faculté de Médecine Sorbonne Université Paris France
- 4- AP-HP, Service d'anatomie pathologique, Hôpital Avicenne, Bobigny, France
- 5- Inserm UMR1152, Physiopathologie et Épidémiologie des Maladies Respiratoires, Paris, France ; Université de Paris, Faculté de Médecine, site Bichat, Paris, France ; Laboratoire d'Excellence, INFLAMEX, Université de Paris, et DHU FIRE, Paris, France
- 6- AP-HP, Service de physiologie et explorations fonctionnelles, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

Corresponding author: Dr Valérie Besnard

Phone: +33 148 388 877; E-mail: valerie.besnard@univ-paris13.fr

Take home message: We show that hypoxia promotes a mixed pro-inflammatory and profibrosing response in monocyte-derived macrophages from patients with active pulmonary sarcoidosis. Hypoxia, HIF-pathway and PAI-1 could contribute to the pathogenesis of active pulmonary sarcoidosis.

Author's contributions: FJ and VB designed research studies, contributed to the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. HN and MK provided human samples and reviewed the manuscript. MP contributed to the experiments and reviewed the manuscript. CP, JFB, DV, HN wrote the manuscript.

Sources of support : This work was supported by : Fond de Recherche en Santé Respiratoire et Fondation du Souffle (2017), Financement de la Chancellerie des Universités Legs Poix (2017), Bonus Qualité Recherche Université Sorbonne Paris- Nord (2016-2017).

Word count for the body of the manuscript: 2990

Abstract:

Background: Sarcoidosis is characterized by macrophage-derived cells constituting granulomas which can be responsible for life-threatening complications. Granulomas are hypoxic and macrophages prior to granuloma formation are often exposed to low oxygen tension in inflammatory tissues. Therefore, we addressed the hypothesis that hypoxia could play a significant role in sarcoidosis pathogenesis.

Methods: We investigated the role of hypoxia on monocyte-derived macrophages, from active (n=26) or inactive (n=24) pulmonary sarcoidosis and healthy controls (n=34). Macrophages were exposed 24 hours to normoxia or hypoxia (1.5%O₂). Different macrophage functions were explored: hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation, cytokines secretion, phagocytosis, CD80/CD86/HLA-DR expression, profibrotic response.

Results: Hypoxia only in active sarcoidosis increased the HIF-1 α trans-activity, promoted a proinflammatory response (TNF α , IL1 β) without activating NF- κ B pathway and a profibrotic response (TGF β 1, PDGF-BB) with PAI-1 secretion associated with human lung fibroblast migration inhibition. These results were supported by immunodetection of HIF-1 α and PAI-1 in granulomas from pulmonary biopsies. Hypoxia impaired phagocytosis and CD36 expression in controls but not in active and inactive sarcoidosis. Hypoxia also decreased CD80/CD86 and HLA-DR in active sarcoidosis.

Conclusions: Hypoxia could play an important role in sarcoidosis pathogenesis as granuloma persistence in active sarcoidosis by increasing the macrophage proinflammatory response, maintaining their phagocytosis and reducing antigen presentation, leading to a deficient T cell response. In addition, hypoxia could favor fibrosis by promoting profibrotic cytokines response and by sequestering fibroblasts around the granuloma. These results suggest that hypoxia and the HIF pathway could be a pathogenic factor in active sarcoidosis.

Abstract word count: 249

Keywords: pulmonary sarcoidosis, hypoxia-inducible factor 1, plasminogen activator inhibitor-1, macrophages, fibrosis.

Introduction

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown cause(s) with an almost constant lung involvement. The prevailing hypothesis is that exposure to still unknown antigen(s) or inorganic air-contaminants initiates in genetically-predisposed individuals a disproportionate inflammatory response leading to granuloma formation [1]. Granuloma, the key lesion in sarcoidosis, is a well circumscribed and coalescent cluster of macrophage-derived epithelioid and giant cells, associated with lymphocytes, subsequently wrapped by lamellar fibrosis [2]. Sarcoidosis is particularly challenging in regards of identifying factors involved in initiation of inflammation, granuloma perpetuation and evolution towards fibrosis. These events are determinant for sarcoidosis outcomes which vary from benign to life-threatening especially due to pulmonary fibrosis and/or pulmonary hypertension [3].

Hypoxia defined as an imbalance between impaired tissue oxygen supply and cells demand, is a micro-environmental condition known to modulate innate and adaptive immunity [4] and to contribute to the pathophysiology of fibrotic diseases [5]. The cellular response to hypoxia is mostly controlled by the hypoxia-inducible factor (HIF) transcription factor and its target genes harboring the hypoxia-response element [6]. The absence of in-depth vascularization makes sarcoidosis pulmonary granulomas hypoxic [7]. In addition, interstitial remodeling and/or bronchial obstruction may result in local alveolar hypoxia. Besides, monocytes-derived (MD) macrophages prior to granuloma formation are often exposed to low oxygen tension during their migration across inflammatory tissues [8]. Several studies reported the expression of HIF-target genes within lung and lymph node granulomas, while HIF-1 α expression was inconsistently found [9, 10]. Hypoxia and the HIF-1 signaling impact on the processes controlling granuloma evolution are still unclear.

The present study addressed the hypothesis that hypoxia might modulate the initiation of inflammation, persistence of granuloma structure and progression to fibrosis in sarcoidosis through its activation on macrophages. Therefore, we evaluated the role of hypoxia on macrophages *in vitro* derived from peripheral monocytes from active and inactive pulmonary sarcoidosis and healthy controls. HIF-1, phagocytic activity, antigen presentation, cytokine secretion and their effects on fibroblasts were studied.

Materials and methods

Additional details are provided in the online supplement.

Patients and controls

This prospective monocentric study was conducted in the Pulmonary Department of the Avicenne Hospital and received institutional review board approval (CPP Ile-de-France X 2016-10-02) according to the French legislation.

Patients were over 18 with a pulmonary sarcoidosis according to the ATS-ERS-WASOG statement [11]. Individuals with corticosteroid/immunosuppressive therapy in the past 6 months were non-included. Patients were divided in two sub-groups, active (n=26) and inactive (n=24) pulmonary sarcoidosis, according to the abbreviated Computed-Tomography Activity Score [12]. Bioclinical and imaging data were recorded at the time of blood sample harvest. Patients were subsequently referred as active and inactive sarcoidosis, respectively. Healthy volunteers (n=34) over 18 were evaluated as “controls” and matched for age, sex and smoking status with sarcoidosis patients.

Paraffin embedded pulmonary biopsies done for sarcoidosis diagnosis in 5 patients were retrieved from the pathology department.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation and macrophage differentiation

PBMCs were isolated using Ficoll density gradient separation. Purified monocytes after using the Pan Monocyte Isolation Kit (Miltenyi-Biotec, France), were cultured in RPMI containing 10% fetal bovine serum (FBS) and differentiated into macrophages with 5ng/ml M-CSF (Bio-Techne, France) for 10 days at 21% O₂. Cell cultures under hypoxic conditions were performed in a hermetic chamber containing 1.5% O₂ for 24Hrs. Normoxic cells were maintained at 21% O₂ for 24Hrs.

HIF-1 α and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation assays

HIF-1 α , NF- κ B-p50 and -p65 activation status were evaluated in MD-macrophages lysates using specific oligonucleotide DNA-binding enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) based kit (TransAM® Active Motif, Belgium).

Cytokine assays

“Conditioned media” (CM) from MD-macrophages cultured in 500 μ l RPMI alone /1.10⁶ cells, were collected after 24Hrs of culture under normoxia or 1.5% O₂ hypoxia. Cytokines content was assessed using multiplex-bead based assays (ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay, Invitrogen), except for transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) determined by ELISA (Bio-Techne).

Phagocytosis functional test

Phagocytosis was assayed using 1 μ m fluospheres™ (Invitrogen) in a ratio of 200 particles/cell. Phagocytosis was estimated by the number of cells containing at least one fluosphere compared to the total number of cells observed on 4 microscopy fields (objective x100).

Fibroblast gap-closure assays

Migration of normal human lung fibroblasts (NHLFs) was assayed by placing 0.7mm inserts before cell seeding. The percentage of gap-closure was estimated by the difference between the initial and final gap areas at 24Hrs of specific culture conditions, relatively to the initial area. NHLFs were cultured for 24Hrs with FBS10% (i) in CM of MD-macrophages in presence of either anti-human plasminogen activator inhibitor-1 (hPAI-1) antibody (Bio-Techne), or vehicle, or (ii) in RPMI media in presence of either hPAI-1 antibody, isotype, recombinant hPAI-1 (Bio-Techne) or vehicle.

Quantitative RT-PCR, flow cytometry, immunofluorescent staining, immunohistochemistry (IHC)

Methods are outlined in the online supplement.

Statistical analysis

Demographic results were presented as means \pm SD or proportions and compared using one-way Anova, student's t-test or Chi2 test when appropriate. Biological results were represented using box and whiskers and compared with two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test. PRISM software (v6, GraphPad, USA) was used. A p value <0.05 was considered as significant.

Results

Patients and controls

Characteristics and comparison between groups, *ie* active and inactive sarcoidosis and controls are shown in **Table 1**.

Patients with active compared to inactive sarcoidosis had higher angiotensin converting enzyme blood level ($p<0.0001$), more impaired forced vital capacity ($p=0.006$) and diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide ($p=0.003$) and had to be more frequently treated for sarcoidosis during the 6 months following inclusion in the study (69% *versus* 21%). The proportion of patients with extra-pulmonary involvement was similar and stage 4 sarcoidosis was equally distributed.

HIF-1 α was activated by hypoxia in MD-macrophages especially in those from active sarcoidosis

HIF-1 α was immunolocalized in the nucleus of epithelioid cells inside granulomas and of macrophages at their periphery (both CD68 labelled cells) in pulmonary biopsies from sarcoidosis patients (fig.1A-C). HIF-1 α was immunodetected in the cytoplasm and nucleus of MD-macrophages both in normoxic and hypoxic conditions, similarly between sarcoidosis and

control groups (fig.1E, F). To determine whether the HIF-1 α immunolabelling observed in normoxia was not due to an unsuspected hypoxic culture environment, reduction of pimonidazole was assayed. Pimonidazole staining was only present in response to hypoxia and absent in normoxia (fig.1E), suggesting that HIF-1 α stabilization in MD-macrophages in normoxia is probably induced by other stimuli than hypoxia. HIF-1 α activation status in MD-macrophages was assayed using a specific oligonucleotide-binding test. In normoxia, HIF-1 α was similarly activated at a very low level in both controls and sarcoidosis groups (fig.1G). In response to hypoxia, the level of HIF-1 α activation was markedly increased in active compared to inactive sarcoidosis and controls (fig.1G).

Hypoxia impaired phagocytosis in control but not in sarcoidosis MD-macrophages

Phagocytosis, a main function of macrophages, can be modulated by HIF-1 [13] and involved in sarcoidosis pathogenicity [14–16]. Phagocytosis was assessed in MD-macrophages exposed to normoxia or 24Hrs-hypoxia and challenged with fluospheres (fig.2A-C). In response to hypoxia, fluospheres phagocytosis was maintained in MD-macrophages from active and inactive sarcoidosis, whereas it was decreased in controls (fig.2D). Likewise, expression of the CD36 scavenger surface marker was maintained under hypoxic condition in MD-macrophages from sarcoidosis by contrast to controls (fig.2E).

Hypoxia decreased CD80 and CD86 co-stimulation molecules and Human Leucocyte Antigen-DR (HLA-DR)

Hypoxia effect on the expression of CD80 and CD86, co-stimulatory molecules interacting to activate T lymphocytes, and of the HLA-DR presenting antigen molecule were determined using flow cytometry. These molecules are known to be associated with classic macrophage activation [17]. In normoxic condition, CD80 and CD86 were similarly expressed in macrophages from all groups (fig.3A, B). Hypoxia significantly decreased CD80 and CD86 expression on MD-macrophages in controls and active sarcoidosis (fig.3A, B) while the decrease was not significant (fig.3A, B) in inactive sarcoidosis. A higher HLA-DR expression was observed in normoxic condition on MD-macrophages in inactive sarcoidosis compared to controls. Hypoxia decreased significantly HLA-DR expression in MD-macrophages only from sarcoidosis sub-groups (fig.3C). By contrast, CD163 surface expression, a marker of alternative macrophage activation [17], did not vary in MD-macrophages from sarcoidosis and controls exposed to hypoxia (see fig. E1).

Hypoxia induced a pro-inflammatory response independent of NF κ B in active sarcoidosis

Pro-inflammatory cytokine secretion in CM was compared in normoxia and hypoxia. Baseline concentrations of chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8), tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β) (fig.4A-C), IL-18 and IL-5 (see fig. E2) under normoxia were similar between groups. Hypoxia significantly increased pro-inflammatory cytokine secretion only in MD-macrophages from active sarcoidosis (fig.4A-C). In normoxia, IL-10 secretion was increased in active compared to inactive sarcoidosis, while hypoxia significantly reduced its secretion (fig.4D). Increase in pro-inflammatory cytokine secretion induced by hypoxia in MD-macrophages from active sarcoidosis was associated with an increase in their mRNA levels (see fig. E2). The pro-inflammatory response to hypoxia was independent of NF- κ B (p65 and p50 subunits) activation which was decreased in active sarcoidosis (fig.4E, F).

Hypoxia promoted a profibrotic response in active sarcoidosis

Secretion of profibrotic factors in CM of MD-macrophages, TGF- β 1, platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), PAI-1 (fig.5A-D) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) (see fig. E3) was studied. In normoxia, concentration of total TGF- β 1 was higher in CM from active sarcoidosis, especially the latent form of TGF- β 1 (fig.5A). Hypoxia induced its decrease in active sarcoidosis, albeit remaining higher than in controls (fig.5B). Likewise, hypoxia increased the secretion of PDGF-BB, PAI-1 (fig.5C, D) and VEGF-A (see fig. E3) in all groups. Notably, PAI-1 secretion was two-fold higher in active sarcoidosis compared to inactive sarcoidosis and controls (fig.5D). These results were supported by an increase in mRNA transcript levels of profibrotic cytokines in MD-macrophages, especially *TGFB1* and *VEGF* in active sarcoidosis (see fig. E3).

Secretion of PAI-1 by hypoxic MD-macrophages from active sarcoidosis inhibited lung fibroblast migration

The effect of CM from MD-macrophages exposed to either normoxia or hypoxia on gap closure in NHLF monolayers was studied. Exposure of NHLF to CM from hypoxia-exposed MD-macrophages from all groups significantly inhibited gap closure as compared with CM from normoxia-exposed MD-macrophages (fig.6A, B). Hypoxic CM did not affect NHLF proliferation (see fig. E4) or fibroblast-myofibroblast differentiation as assessed by alpha-smooth actin and collagen type I alpha quantification in Western blot (data not shown), indicating that inhibition of gap closure was related to a decrease in the ability of NHLF to migrate. NHLF "immobilization" was markedly observed with CM from hypoxic MD-macrophages from active sarcoidosis (fig.6B).

Among the profibrotic factors secreted by MD-macrophages, PAI-1 levels negatively correlated with the percentage of NHLF gap closure (fig.6C). Incubation of NHLF with increasing concentrations of rhPAI-1 reduced NHLF migration (fig.6D). The inhibitory effect of rhPAI-1 on

NHLF migration was prevented by addition of anti-PAI-1 antibody (fig.6D). Inhibition of PAI-1 in the CM from hypoxic MD-macrophages with an anti-PAI-1 antibody restored NHLF migration, especially in active sarcoidosis (fig.6E). These data indicate that PAI-1 secretion by hypoxic MD-macrophages from active sarcoidosis mostly contribute to inhibit human lung fibroblast migration.

In addition, PAI-1 expression was immunodetected at the surface of both epithelioid cells and macrophages present in the center of pulmonary granulomas from sarcoidosis patients (fig.6F).

Results related to MD-macrophages from the various groups cultured in hypoxia are summarized in **table 2**.

Discussion

Factors modulating the onset and progression of sarcoidosis are still poorly known. We showed that hypoxia activated HIF-1, and induced a mixed proinflammatory-profibrotic MD-macrophage phenotype in active sarcoidosis. These *in vitro* results were supported by immunohistochemistry analyses of granulomas from pulmonary biopsies. Therefore, regional hypoxia could play a significant role in sarcoidosis pathogenesis. To the best of our knowledge, the consequences on macrophages of an hypoxic microenvironment were never investigated in sarcoidosis, although granuloma hypoxia inferred from morphometric analysis [7]. By contrast, in tuberculosis, hypoxia directly demonstrated in lung granuloma is known to play a major role in the disease's course [18, 19]. Recently, ¹⁸F-fluoromisonidazole uptake, a hypoxia-sensitive PET tracer, was observed in sarcoidosis lesions and associated with ¹⁸F-FDG-PET uptake [20], suggesting that hypoxic lesions are metabolically active and associated with an active form of sarcoidosis.

Former studies investigating HIF in sarcoidosis led to conflicting results [9, 10]. Tzouvelikis *et al.* [10] reported increased expression of VEGF, a target of HIF, within sarcoidosis granulomas but failed to detect HIF-1 α . In line with Talreja *et al.* [9], we clearly immunodetected HIF-1 α in pulmonary sarcoidosis granulomas. Therefore, we evaluated *in vitro* the effects of hypoxia on MD-macrophages from controls and untreated sarcoidosis patients. One strength of the study was to prospectively include patients with either active or inactive pulmonary sarcoidosis, not taking any therapy that could modify macrophage biology. The choice to specifically study monocytes-derived macrophages was supported by recent significant results obtained from *in vitro* models of granuloma mimicking sarcoidosis events using PBMCs [16, 21], and the monocyte-macrophage origin of granuloma constituting cells

[22]. In the present study HIF-1 α nuclear expression was detected under normoxia in MD-macrophages from patients and controls, with no difference in HIF transactivity. Talreja *et al.* also reported HIF-1 α expression in freshly-isolated blood monocytes [9]. The nuclear expression of HIF-1 α in normoxic MD-macrophages is consistent with the fact that non-hypoxic stimuli such as TNF- α and IL-1 β proinflammatory cytokines, NF- κ B, reactive oxygen species, MAPK [23, 24] or mTOR pathway activation [25] are able to stabilize HIF-1 α in immune cells. However, HIF-1 α transcriptional activity was more strongly induced by hypoxia in MD-macrophages from active sarcoidosis. Consistently, several HIF-target genes were induced by hypoxia in MD-macrophages from active sarcoidosis, *VEGF and TGFB1* transcripts or PAI-1 protein. TNF α and IL1 β (involved in sarcoidosis pathogenesis [1, 26]) and CXCL8 increased by hypoxia only in active sarcoidosis, can also be directly upregulated by HIF in macrophages [27, 28]. NF- κ B activation, known to be also induced by hypoxia and leading to pro-inflammatory cytokine production [29] was decreased in active sarcoidosis, suggesting that it was not involved in this context. Moreover, HIF-1 can exert a negative feedback on NF- κ B [30]. The stronger response to hypoxia observed in MD-macrophages from active sarcoidosis might be explained by still unexplored genetic polymorphisms, epigenetic mechanisms and/or non-coding RNAs known to modulate HIF expression [31].

We investigated whether hypoxia could modulate phagocytosis and antigen processing/presentation which are the key initial step of inflammatory lesions as in early sarcoidosis. Phagocytic pathways and/or activity of macrophages were shown to be increased in sarcoidosis and *in vitro* model of granuloma [14–16]. Monocytes exhibited an enhanced expression for phagocytosis-related genes, but a downregulation of genes involved in proteasome degradation, suggesting that the accumulation of intracellular phagocytic degradation products could trigger inflammation persistence in sarcoidosis [14]. In our experiments, phagocytosis was similar at baseline in sarcoidosis and control MD-macrophages. Interestingly, hypoxia markedly reduced phagocytosis in controls but not in sarcoidosis, suggesting that macrophage phagocytosis could be maintained in hypoxia in this disease. We evaluated the effect of hypoxia on the expression of CD80, CD86 co-stimulatory molecules and HLA-DR associated with antigen presentation and expressed by epithelioid cells from sarcoidosis granuloma [32, 33]. Hypoxia markedly decreased CD80 and CD86 in controls and active sarcoidosis MD-macrophages while not significantly in inactive sarcoidosis. Hypoxia also downregulated HLA-DR expression in active and inactive sarcoidosis MD-macrophages. These findings are in line with previous studies showing that hypoxia decreased the expression of CD80 in murine macrophages and CD80, CD86 and MHC class II in human dendritic cells, reducing their ability to initiate adaptive-immunity responses [34, 35]. However, the role of antigenic presentation in sarcoidosis is still not clear. Crouser *et al.* reported an

enhanced presentation capacity in an *in vitro* model of sarcoidosis [16]. Interestingly, Grunewald *et al.* proposed that granuloma progression may occur when antigen recognition is not efficient enough, due to inadequate peptide presentation by modified HLA molecules or T cells incapacity to generate T cell clones, allowing granuloma persistence because of inefficient adaptive immune response [1]. Here, we can speculate that hypoxia at the various steps towards granuloma formation may potentially exert a deleterious effect on antigen presentation processes, and therefore contribute to their persistence.

Mechanisms leading to sarcoidosis-associated pulmonary fibrosis are poorly understood. Granulomas are almost always surrounded by a concentric rim of collagen bundles [2]. Macrophages are known to be involved in repair and fibrotic processes through different states of polarization [36]. In sarcoidosis, macrophages may acquire a profibrotic M2-phenotype as shown in granulomas from patients' biopsies or *in vitro* model [21, 37]. In our study, hypoxia decreased M1 markers (CD80, CD86, HLA-DR), while M2 markers were maintained (CD163, CD36). However, hypoxia was also associated with a M1 pro-inflammatory cytokine response. In the literature, the effect of hypoxia on macrophage polarization remains unclear [38, 39]. More than the over-simplified M1/M2 dichotomy, macrophages display remarkable plasticity and can change their phenotype in response to environmental factors.

Accordingly, previous studies showed that under hypoxic conditions, macrophages can induce fibrosis in a HIF-dependent manner through the secretion of VEGF, PDGF-BB, or PAI-1 [40, 41]. Here, macrophages from active sarcoidosis secreted higher levels of PAI-1 in response to hypoxia as compared with controls or inactive sarcoidosis. PAI-1 plays a key role in the development of pulmonary fibrosis by fibrotic matrix deposition [42]. An increase in PAI-1 levels as well as a decrease in fibrinolytic activity has been reported in the bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis [43]. We clearly detected PAI-1 in epithelioid cells in granulomas. Finally, we demonstrated that CM from hypoxic MD-macrophages inhibited pulmonary fibroblast migration which was highly dependent on PAI-1, in line with other study [44]. PAI-1 binding to vitronectin has been shown to inhibit cell migration [44]. In a lung fibrosis model, inhibition of cell migration by PAI-1 induced a defect in repair and favored fibrosis [44]. Therefore, PAI-1 secretion by granuloma cells could immobilize and sequester lung fibroblast around granuloma, thus favoring peripheral granuloma fibrosis.

In conclusion, hypoxia had a significant and specific impact on MD-macrophages from patients with active sarcoidosis, it may favor the development and persistence of granulomas in active sarcoidosis and fibrosis surrounding granulomas by promoting a mixed inflammatory/fibrosing response of macrophages, by reducing their antigen presentation capacities, leading to a deficient T cell response. Thus, the HIF pathway and PAI-1 could be

involved in the pathogenesis of active pulmonary sarcoidosis, potentially representing new therapeutic targets.

Acknowledgments

The authors thank Drs Diane Bouvry, Simon Chauveau, Morgane Didier, Olivia Freynet, Aurélie Hervé, Fatma Kort, Cécile Rotenberg, Lucile Sesé, MDs and Pr Yurdagül Uzunhan MD, PhD of the Pulmonology Department from the Avicenne University Hospital AHPH (Bobigny, France), who contributed in the blood sample collection from sarcoidosis patients. We also acknowledge the technical help from the Histology Core (TisCel13) from the Sorbonne Paris-Nord University (Bobigny, France). We thank Elisabetta Dondi of Inserm U978 UFR SMBH, for technical assistance in flow cytometry analysis. We thank Nicolas Heddebaut of UMR1152 Faculté de Médecine, site Bichat, for the technical assistance for Luminex® analysis.

References

1. Grunewald J, Grutters JC, Arkema EV, Saketkoo LA, Moller DR, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2019; 5: 45.
2. Bernaudin J-F, Moguelet P, Jeny F, Besnard V, Valeyre D, Kambouchner M. Chapter 6 - Pathology of Granuloma. In: Baughman RP, Valeyre D, editors. *Sarcoidosis* Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 75–83
3. Jeny F, Uzunhan Y, Lacroix M, Gille T, Brillet P-Y, Nardi A, Bouvry D, Planès C, Nunes H, Valeyre D. Predictors of mortality in fibrosing pulmonary sarcoidosis. *Respir. Med.* 2020; 169: 105997.
4. Watts ER, Walmsley SR. Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity. *Trends Mol. Med.* 2019; 25: 33–46.
5. Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, Fafournoux P, Tremblais G, Marchant D, Gille T, Bernaudin J-F, Callard P, Kambouchner M, Martinod E, Valeyre D, Uzunhan Y, Planès C, Boncoeur E. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* [Internet] 2018 [cited 2020 Jul 9]; 8 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6299072/>.
6. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society; 2011; 365: 537–547.
7. Kambouchner M, Pirici D, Uhl J-F, Mogoanta L, Valeyre D, Bernaudin J-F. Lymphatic and blood microvasculature organisation in pulmonary sarcoid granulomas. *Eur. Respir. J.* 2011; 37: 835–840.
8. Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 712–721.
9. Talreja J, Talwar H, Bauerfeld C, Grossman LI, Zhang K, Tranchida P, Samavati L. HIF-1 α regulates IL-1 β and IL-17 in sarcoidosis. *eLife* 2019; 8: e44519.
10. Tzouvelekis A, Ntoliou P, Karameris A, Koutsopoulos A, Boglou P, Koulelidis A, Archontogeorgis K, Zacharis G, Drakopanagiotakis F, Steiropoulos P, Anevlavis S, Polychronopoulos V, Mikroulis D, Bouros D. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -vascular endothelial growth factor (VEGF)-inhibitory growth factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients. *BMC Res. Notes* 2012; 5: 654.

11. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 736–755.
12. Benamore R, Kendrick YR, Repapi E, Helm E, Cole SL, Taylor S, Ho L-P. CTAS: a CT score to quantify disease activity in pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 2016; 71: 1161–1163.
13. Anand RJ, Gribar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, Dubowski T, Sodhi CP, Hackam DJ. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 α -dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82: 1257–1265.
14. Talreja J, Farshi P, Alazizi A, Luca F, Pique-Regi R, Samavati L. RNA-sequencing identifies novel pathways in sarcoidosis monocytes. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group; 2017; 7: 2720.
15. Pettersen HB, Johnson E, Osen SS. Phagocytosis of agarose beads by receptors for C3b (CR1) and iC3b (CR3) on alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *Scand. J. Immunol.* 1990; 32: 669–677.
16. Crouser ED, Locke LW, Julian MW, Bicer S, Sadee W, White P, Schlesinger LS. Phagosome-regulated mTOR signalling during sarcoidosis granuloma biogenesis. *Eur. Respir. J.* 2020; .
17. Nenasheva T, Gerasimova T, Serdyuk Y, Grigor'eva E, Kosmiadi G, Nikolaev A, Dashinimaev E, Lyadova I. Macrophages derived from human induced pluripotent stem cells are low-activated "Naïve-Like" cells capable of restricting mycobacteria growth. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1016.
18. Prosser G, Brandenburg J, Reiling N, Barry CE, Wilkinson RJ, Wilkinson KA. The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect.* 2017; 19: 177–192.
19. Via LE, Lin PL, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SY, Taylor K, Klein E, Manjunatha U, Gonzales J, Lee EG, Park SK, Raleigh JA, Cho SN, McMurray DN, Flynn JL, Barry CE. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect. Immun.* 2008; 76: 2333–2340.
20. Furuya S, Naya M, Manabe O, Hirata K, Ohira H, Aikawa T, Koyanagawa K, Magota K, Tsujino I, Anzai T, Kuge Y, Oyama-Manabe N, Kudo K, Shiga T, Tamaki N. 18F-FMISO PET/CT detects hypoxic lesions of cardiac and extra-cardiac involvement in patients with sarcoidosis. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* 2019; .
21. Locke LW, Crouser ED, White P, Julian MW, Caceres EG, Papp AC, Le VT, Sadee W, Schlesinger LS. IL-13-regulated macrophage polarization during granuloma formation in an in vitro human sarcoidosis model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2019; 60: 84–95.
22. Milman N, Andersen CB, Burton CM, Iversen M. Recurrent sarcoid granulomas in a transplanted lung derive from recipient immune cells. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 549–552.
23. Lin N, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. *J. Clin. Invest.* 2016; 126: 3661–3671.
24. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF Transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 2014; 41: 518–528.
25. Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat. Rev. Immunol.* 2015; 15: 599–614.
26. Huppertz C, Jäger B, Wieczorek G, Engelhard P, Oliver SJ, Bauernfeind F-G, Littlewood-Evans A, Welte T, Hornung V, Prasse A. The NLRP3 inflammasome pathway is activated in sarcoidosis and involved in granuloma formation. *Eur. Respir. J.* 2020; 55.
27. Lewis A, Elks PM. Hypoxia Induces Macrophage tnfa Expression via Cyclooxygenase and Prostaglandin E2 in vivo. *Front. Immunol.* Frontiers; 2019 Sep 27;10:2321.
28. Fang H-Y, Hughes R, Murdoch C, Coffelt SB, Biswas SK, Harris AL, Johnson RS, Imityaz HZ, Simon MC, Fredlund E, Greten FR, Rius J, Lewis CE. Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* 2009; 114: 844–859.
29. Taylor CT, Doherty G, Fallon PG, Cummins EP. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J. Clin. Invest.* 2016; 126: 3716–3724.
30. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J.* 2016; 283: 413–424.

31. Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology. *Cell Metab.* 2018; 27: 281–298.
32. Soler P, Boussaud V, Moreau J, Bergeron A, Bonnette P, Hance AJ, Tazi A. In situ expression of B7 and CD40 costimulatory molecules by normal human lung macrophages and epithelioid cells in tuberculoid granulomas. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116: 332–339.
33. v Maarsseveen T, Mullink R, Rensen R, Stam J. HLA-DR antigens in epithelioid cell granulomas of sarcoidosis, using semithin frozen sections. A concept about granuloma formation. *Sarcoidosis* 1985; 2: 148–153.
34. Lahat N, Rahat MA, Ballan M, Weiss-Cerem L, Engelmayer M, Bitterman H. Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF-alpha secretion. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 74: 197–205.
35. Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, Chen I-H, Sozzani S, Austyn JM, Mantovani A, Sica A. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood* American Society of Hematology; 2008; 112: 3723–3734.
36. Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front. Immunol.* 2015; 6: 602.
37. Shamaei M, Mortaz E, Pourabdollah M, Garssen J, Tabarsi P, Velayati A, Adcock IM. Evidence for M2 macrophages in granulomas from pulmonary sarcoidosis: a new aspect of macrophage heterogeneity. *Hum. Immunol.* 2017; .
38. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, Eva A, Varesio L, Giovarelli M, Bosco MC. Regulation of human macrophage M1-M2 polarization balance by hypoxia and the triggering receptor expressed on myeloid cells-1. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1097.
39. Guo X, Xue H, Shao Q, Wang J, Guo X, Chen X, Zhang J, Xu S, Li T, Zhang P, Gao X, Qiu W, Liu Q, Li G. Hypoxia promotes glioma-associated macrophage infiltration via periostin and subsequent M2 polarization by upregulating TGF-beta and M-CSFR. *Oncotarget* 2016; 7: 80521–80542.
40. Ruthenborg RJ, Ban J-J, Wazir A, Takeda N, Kim J-W. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol. Cells* 2014; 37: 637–643.
41. Ueno M, Maeno T, Nomura M, Aoyagi-Ikeda K, Matsui H, Hara K, Tanaka T, Iso T, Suga T, Kurabayashi M. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates TGF- β -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2011; 300: L740-752.
42. Flevaris P, Vaughan D. The role of plasminogen activator inhibitor type-1 in fibrosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 2017; 43: 169–177.
43. C Lardot Y Sibille B Wallaert C Hermans D Lison null. Depressed urokinase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis, silicosis or idiopathic pulmonary Rbrosis: relationship to disease severity. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 1999; 4: 361–372.
44. Lazar MH, Christensen PJ, Du M, Yu B, Subbotina NM, Hanson KE, Hansen JM, White ES, Simon RH, Sisson TH. Plasminogen activator inhibitor-1 impairs alveolar epithelial repair by binding to vitronectin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 31: 672–678.

Table 1: Subject characteristics

Characteristic	Controls (n=34)	Active sarcoidosis (n=26)	Inactive sarcoidosis (n=24)	p value
Age, y	44.3 ± 12.5	46.7 ± 12.7	52.3 ± 13.6	0.08
Female	17 (50%)	12 (46.6%)	14 (58.3%)	0.7
Smoking status*	8 (22.8%)	7 (26.9%)	6 (25%)	0.9
ACE (UI/L)	NA	119.3 ± 58	62 ± 30.5	<0.0001
Extra thoracic involvement	NA	13 (50%)	12 (50%)	1
Scadding CXR stage				
0	NA	0 (0%)	4 (16.6%)	<0.0001
1		1 (3.8%)	12(50%)	
2		18 (69.2%)	2 (8.3%)	
3		1 (3.8%)	1 (4.1%)	
4		6 (23.1%)	5 (20.8%)	
Pulmonary function				
FVC % predicted	NA	77.6 ± 21.6	94.2 ± 19	0.006
DLCO % predicted		58 ± 20.6	74.5 ± 14.2	0.003
IS treatment initiation**	NA	18 (69.2%)	5 (20.8%)	0.0009
aCTAS (12)	NA			
0		0 (0%)	11 (45.8%)	
1		0 (0%)	13 (54.2%)	
2		18 (69.2%)	0 (0%)	
3		8 (30.7%)	0 (0%)	
4		0 (0%)	0 (0%)	

Data are expressed in mean ± SD or N (%); groups were compared for continuous variables with one-way ANOVA test (3 groups) or t-student test (2 groups) and for categorical variables with Chi² test ; * current and ever smoker; ** immunosuppressive or corticosteroid treatment initiation ≤6 months after inclusion; **Abbreviations:** ACE: angiotensin converting enzyme; CXR: chest x-ray; FVC: Forced vital capacity; DLCO: Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; aCTAS : abbreviated CT activity Score [12]

Table 2: Summary of biological impact of hypoxia on various sets of macrophages functions

		Controls	Inactive sarcoidosis	Active sarcoidosis
HIF-1	HIF expression	+	+	+
	HIF-1 activation	↗	↗	↗↗
Phagocytosis and antigen presentation	Phagocytosis/CD36	↘	→	→
	CD80	↘	→	↘
	CD86	↘	→	↘
	HLA-DR	→	↘	↘
Inflammation †	CXCL8	→	→	↗
	TNF- α	→	→	↗↗
	IL-1 β	→	→	↗↗
	IL-18	→	→	↗
	IL-5	↗	→	↗
	IL-10	→	→	↘
	NF- κ B activation	→	→	↘
Fibrosis †	TGF- β 1	→	→	↘ (*)
	PDGF-BB	↗	→	↗
	PAI-1	↗	↗	↗↗
	VEGF-A	→	→	↗
Fibroblast Motility**	NHFL gap closure	↘	↘	↘↘

Summary of biological impact of hypoxia on various sets of macrophages functions (results in normoxia are not shown because differences between controls and patients' groups were considered not informative). In white: no difference with paired normoxic condition; in blue (dark and light): decreased versus paired normoxic condition; in red (dark and light): increased versus paired normoxic condition. In dark red or blue: the condition is significantly different from other patients' groups; † results for cytokines expressed as concentrations in conditioned media; * Note that under hypoxic condition, TGF- β 1 levels tended to be higher in active sarcoidosis than in controls (p=0.06). **Reduction of fibroblast motility as assessed on NHFL closure test is an indicator of fibroblast immobilization.

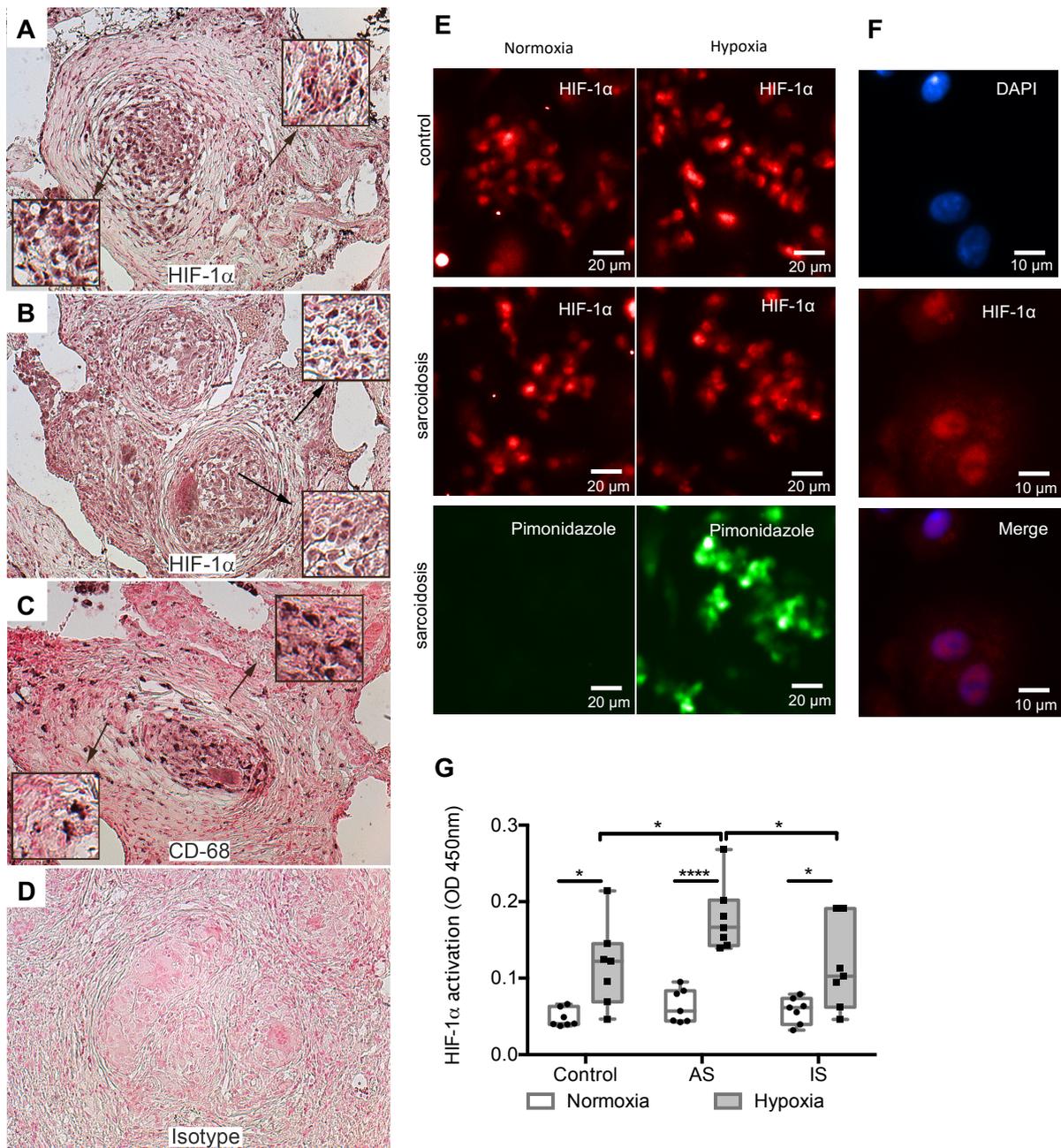


Figure 1: HIF-1 α was activated by hypoxia in MD-macrophages especially in those from active sarcoidosis

(A-D) HIF-1 α (A-B) and CD68 (C) expression assayed by immunohistochemistry in lung biopsy from sarcoidosis patient. Figure A and B are representative of the results obtained in 5 patients. (200x, insert 400x). Isotype is shown in D. (E-F) Representative immunofluorescence staining of MD-macrophages. (E) Similar presence of HIF-1 α (in red) in sarcoidosis and controls in both normoxia and hypoxia. Pimonidazole staining (in green) of MD-macrophages from sarcoidosis is absent in normoxia (magnification x200). (F) Nuclear staining with DAPI (in blue) and accumulation of HIF-1 α (in red) in MD-macrophages. Overlay image showing HIF-1 α nuclear localization (magnification x400) (same results were found in 3 patients and 3 controls). (G) HIF-1 α activation (measured as OD 450nm) assessed by TransAM ® HIF-1 α in controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS) patients, after 24Hrs of normoxia or hypoxia. Results are expressed as box plot (n= 7 independent experiments). * p<0.05; ****p<0.0001 in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test.

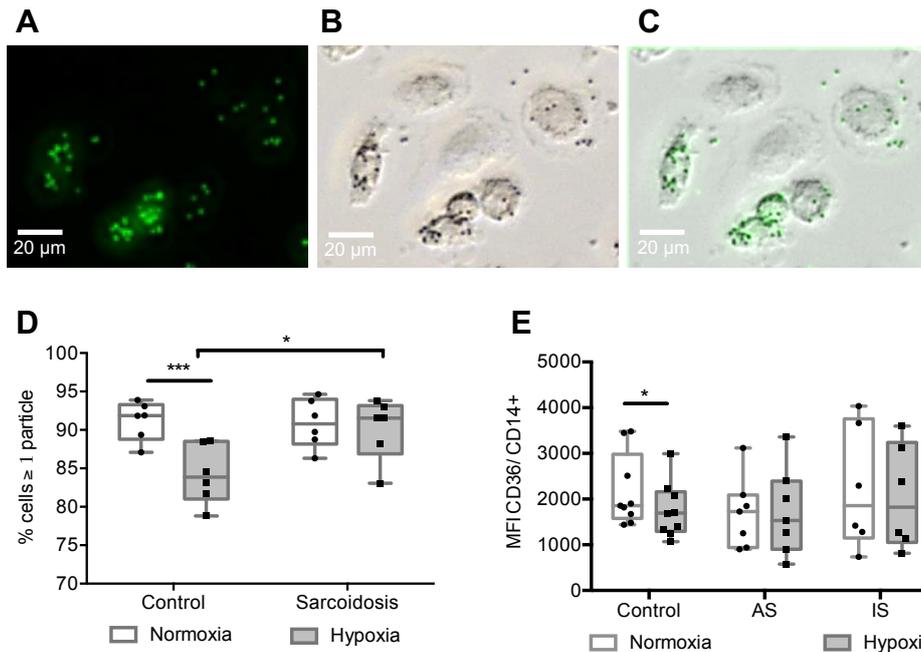


Figure 2: Hypoxia impaired phagocytosis in control but not in sarcoidosis MD-macrophages

(A-C) representative image of MD-macrophages after 30 min incubation with fluospheres (1µm) followed by four PBS washes (magnification x 200); (A) fluorescent 1µm fluospheres (green) (B), phase-contrast images of MD-macrophages (C), overlay images showing fluospheres within MD-macrophages. (D) Effect of hypoxia on phagocytosis in controls and sarcoidosis patients estimated by the ratio of cells with at least one particle and the total number of cells (n=6 independent experiments). (E) Effect of hypoxia on the CD36 scavenger receptor expression in controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS), analyzed by flow cytometry of CD14+ MD-macrophages. The results are expressed as the mean CD36 fluorescence intensity (MFI). (n= 6-9 independent experiments). Results are expressed as box plot * p<0.05; ***p<0.001 in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test.

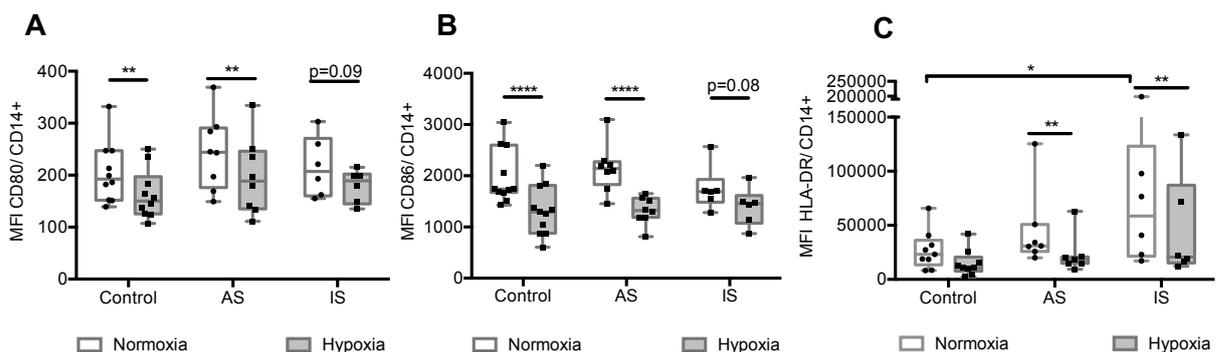


Figure 3: Hypoxia decreased CD80 and CD86 co-stimulation molecules and HLA-DR

(A-C) Effect of hypoxia on CD80, CD86 and HLA-DR surface expression in CD14+ MD-macrophages from controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS). Results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of CD80 (A), CD86 (B) and HLA-DR (C) analyzed by flow cytometry. Results are expressed as box plot, (n= 6-11 independent experiments). * p<0.05; **p<0.01; ****p<0.0001 in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test.

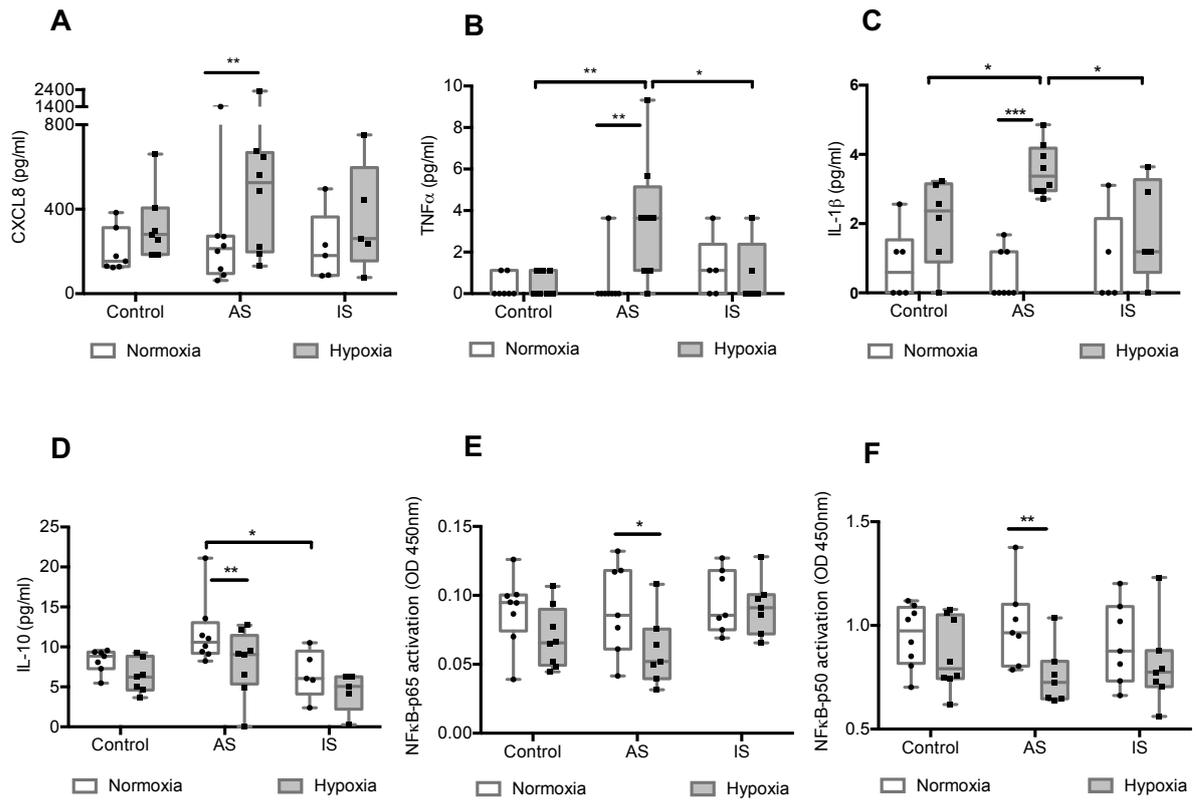


Figure 4: Hypoxia induced a pro-inflammatory response independent of NFκB in active sarcoidosis

(A-D) Concentrations of CXCL8 (A), TNFα (B), IL-1β (C) and IL-10 (D) assessed by Luminex® in conditioned media of normoxic and hypoxic MD-macrophages from controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS); results are expressed in ng/ml (n= 5-8 independent experiments). (E-F) NFκB-p65 and p50 activation (measured as OD450nm) assessed by TransAM® (n= 7-8 independent experiments). Results are expressed as box plot. * p<0.05; **p<0.01 in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test.

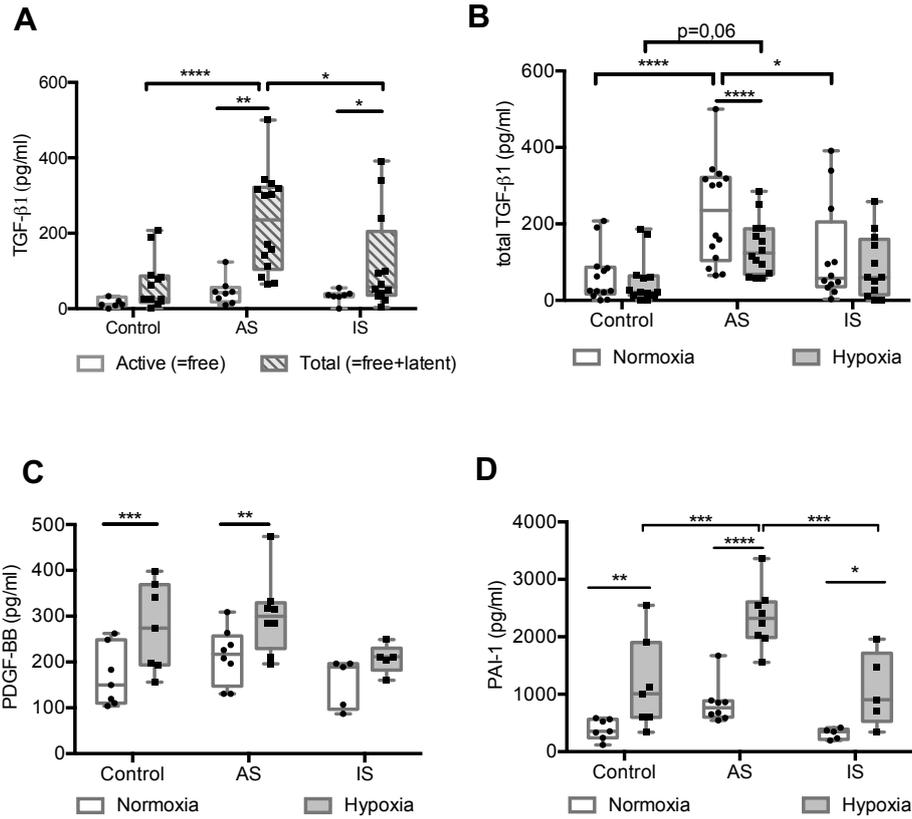


Figure 5: Hypoxia promoted a profibrotic response in active sarcoidosis

(A) Active (free) and total (free+latent) TGFβ1 (in ng/ml) measured by ELISA in conditioned media from MD-macrophages after 24Hrs of normoxia. (n= 7-14 independent experiments). (B-D) Concentrations of total TGFβ1 (B), PDGF-BB (C) and PAI-1 (D) assessed by Luminex® in conditioned media of normoxic and hypoxic MD-macrophages from controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS) (n= 5-8 independent experiments). Results are expressed in ng/ml with box plot. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 in two-way ANOVA-repeated measures and two-way ANOVA with Sidak post-hoc test.

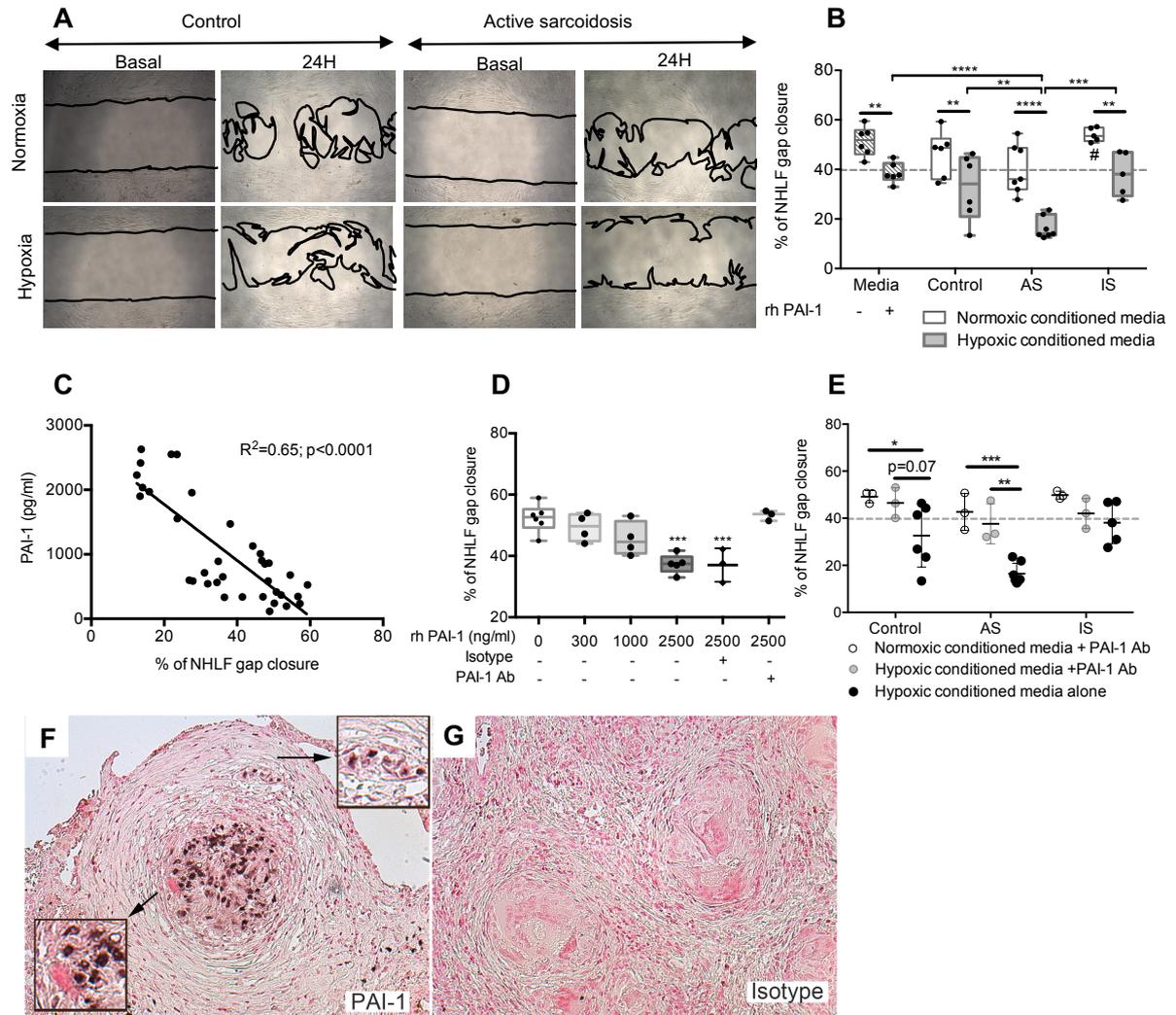


Figure 6: Secretion of PAI-1 by hypoxic MD-macrophages from active sarcoidosis inhibited lung fibroblast migration

(A) Representative contrast-phase microscopy images of NHLF during gap closure assays at basal time and after 24Hrs of incubation with conditioned media from MD-macrophages exposed to normoxia or hypoxia from controls or active sarcoidosis patients. **(B)** Quantitative analysis of NHLF gap closure assay comparing media alone or with 2500ng/ml recombinant human PAI-1 (rh-PAI-1) or normoxic or hypoxic conditioned media from MD-macrophages in controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS) (n=5-7 independent experiments) **(C)** Correlation (Pearson Test) between PAI-1 level (ng/ml) in normoxic or hypoxic MD-macrophages conditioned media from sarcoidosis and controls and percentage of NHLF gap closure (n=3-6 independent experiments). **(D)** Dose effect of rh-PAI-1 on NHLF gap closure reversed by PAI-1 Ab; **(E)** Effect of PAI-1 antibody (PAI-1 Ab) added to the conditioned media on NHLF gap closure assay (n=3 independent experiments). **(F-G)** PAI-1 expression assayed by immunohistochemistry in lung biopsy from a sarcoidosis patient (F-G) showing PAI-1 expression in macrophages and epithelioid in the center of granuloma (F). Isotype is shown in G. (same results were found in 5 patients). Results are expressed as box plot (B, D) or mean with SD (E). * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 in Anova two-way (D-E) and Anova two-way with repeated measures (B) with Sidak post-hoc test. # p<0.05 between normoxic conditioned media from AS and IS.

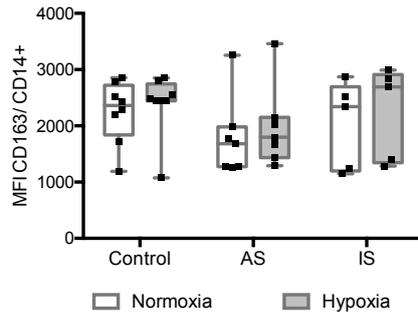


Figure E1: Hypoxia did not change the expression of CD163

Effect of hypoxia on the CD163 expression in controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS) patients. Results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of CD163 surface marker on CD14+ MD-macrophages using flow cytometry. Results are expressed as box plot, (n= 5-8 independent experiments) and analyzed with two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test.

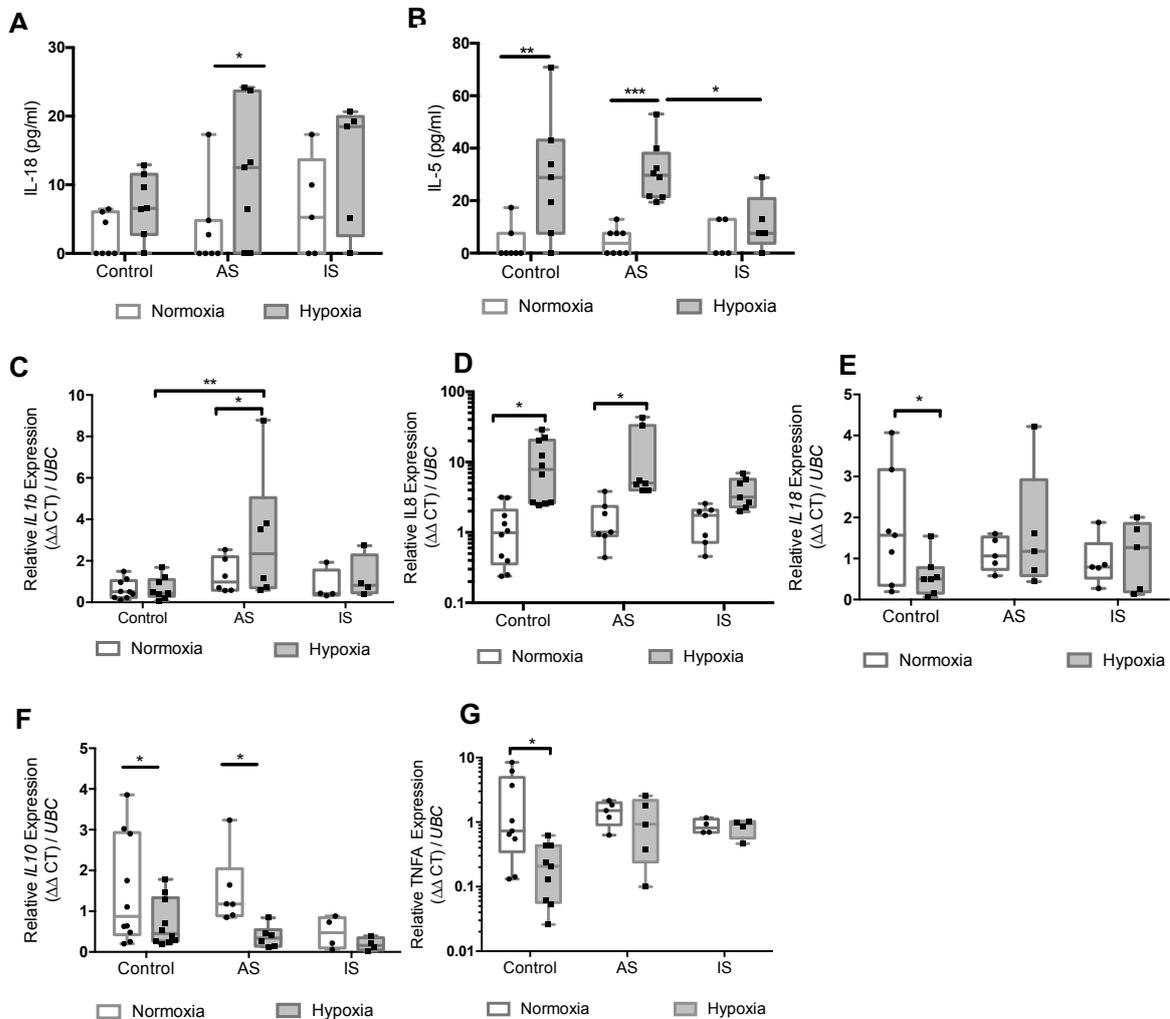


Figure E2: Hypoxia induced a proinflammatory response

(A-B) Concentrations of IL-18 (A), IL-5 (B) as assessed by Luminex® in conditioned media of normoxic and hypoxic MD-macrophages from controls, active sarcoidosis (AS) and

inactive sarcoidosis (IS); results are expressed in ng/ml (n= 5-8 independent experiments). **(C-G)** Effect of hypoxia on the transcription level assessed by RTqPCR of (C) *IL1b*, (D) *IL8*, (E) *IL18*, (F) *IL10*, (G) *TNFA* in MD-macrophages (n= 4-10 independent experiments). Results are expressed with box plot. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test. *UBC*= ubiquitin

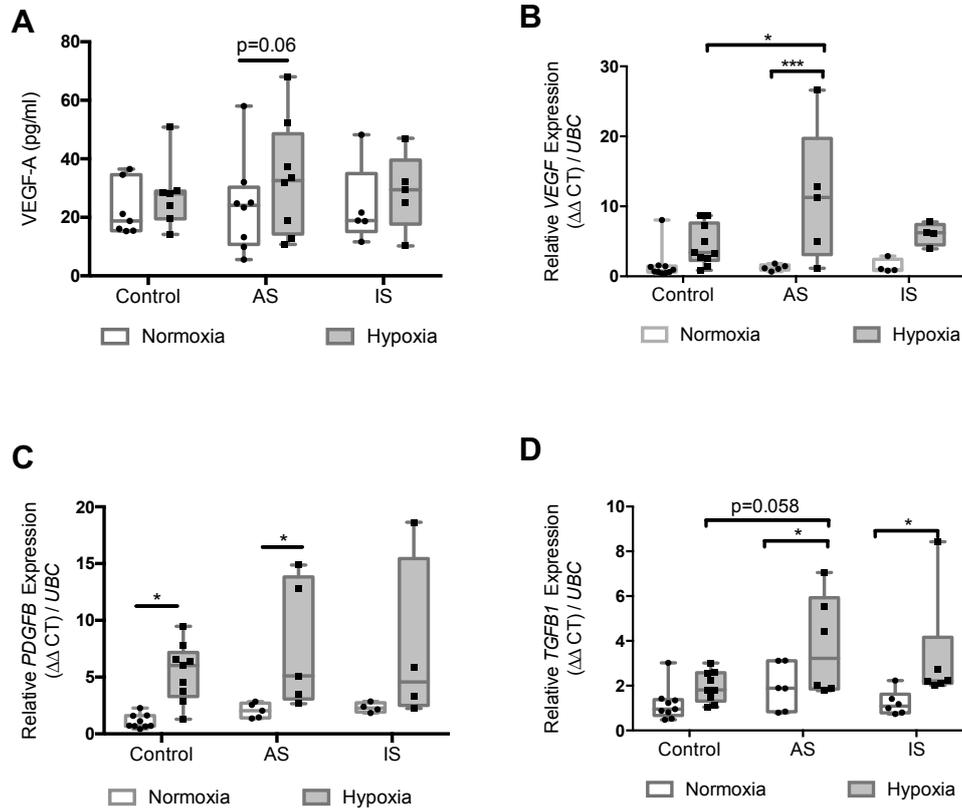


Figure E3: Hypoxia promoted a profibrotic response

(A) Concentrations of VEGF-A as assessed by Luminex® in conditioned media of normoxic and hypoxic MD-macrophages from controls, active sarcoidosis (AS) and inactive sarcoidosis (IS); results are expressed in ng/ml (n= 5-8 independent experiments). **(B-D)** Effect of hypoxia on the transcription level assessed by RTqPCR of (B) *VEGF*, (C) *PDGFB*, (D) *TGFB1* in MD-macrophages (n= 4-9 independent experiments). Results are expressed with box plot. * p<0.05; ***p<0.001; in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test. *UBC*= ubiquitin.

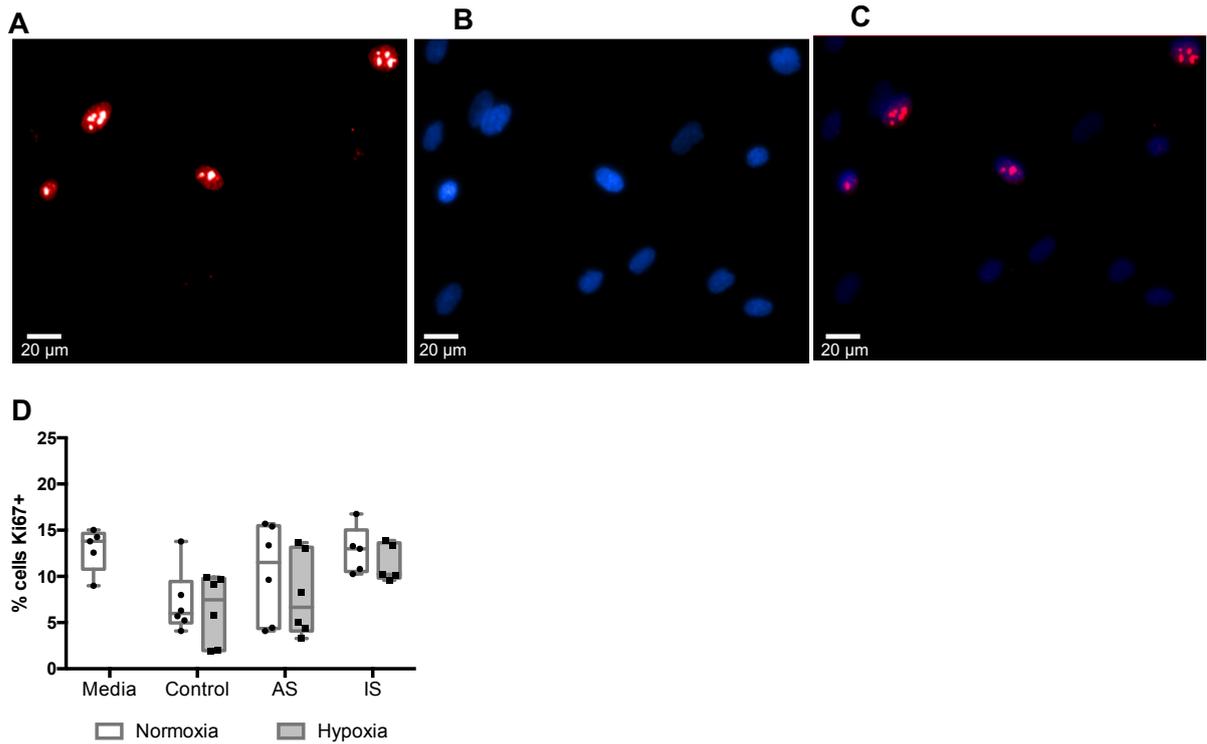


Figure E4: No Effect of conditioned media from MD-macrophages on NHLFs proliferation

Effect of conditioned media from MD-macrophages on NHLF proliferation studied by anti Ki67 immunolabelling. (A-C) representative image (magnification x 200) of Ki67 staining in red (A), DAPI (B) and overlay image (C) showing nuclear localization of Ki67 in NHLF. (D) Proliferation index was estimated by the number of Ki67+ cells/relative to the total number of cells (n=5-6 independent experiments). “Media” consists of RPMI medium and 10%FBS. AS: Active sarcoidosis; IS: Inactive sarcoidosis. No significant difference in two-way ANOVA-repeated measures with Sidak post-hoc test.

1.3 Résultats complémentaires à l'article

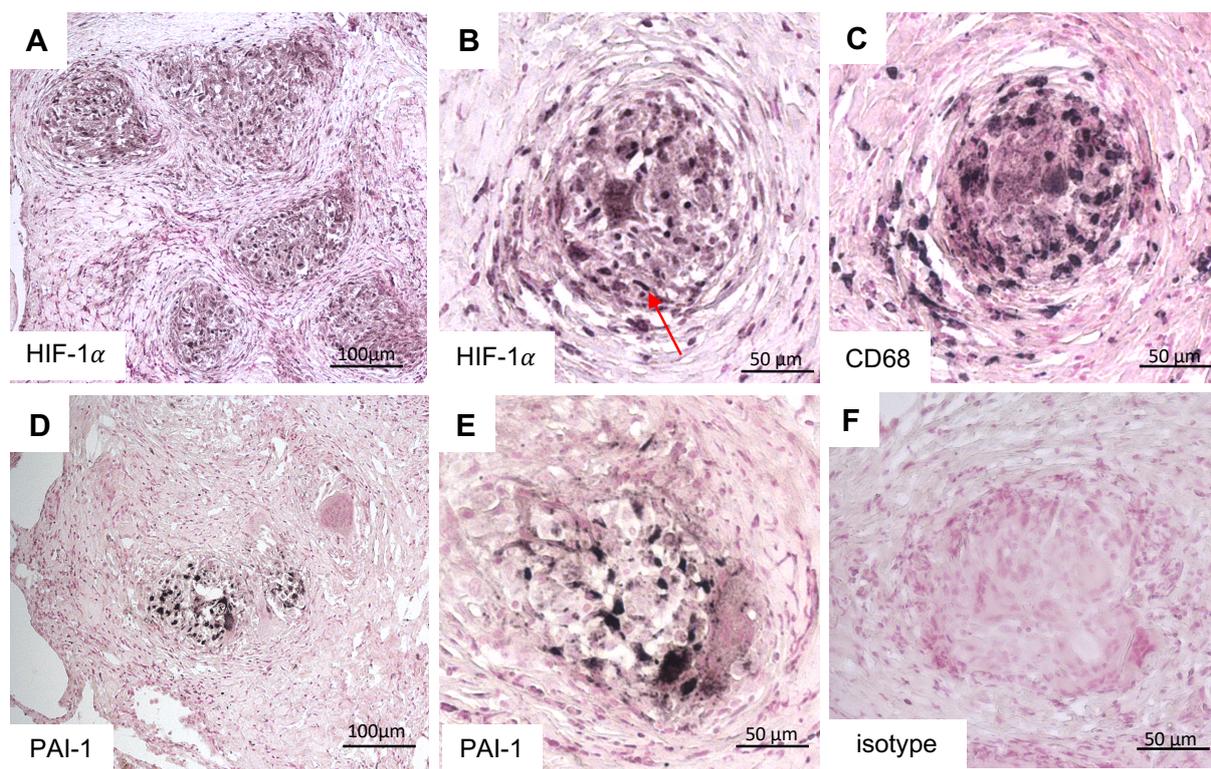


Figure 27: Images supplémentaires illustrant en immunohistochimie la présence de HIF-1 α et PAI-1 dans des granulomes provenant de biopsies pulmonaires chirurgicales.

(A-B) Expression de HIF-1 α , (C) CD68 et (D-E) PAI-1 analysés par immunohistochimie dans une biopsie pulmonaire d'un patient atteint de sarcoïdose. (B-C) coupes sériées d'un granulome montrant l'expression de HIF-1 α dans des cellules épithélioïdes caractérisées par leur grand cytoplasme, des noyaux réniformes excentrés (flèche rouge) (B) et un marquage CD68+ (C). ((A,D) 100x (B-C, E-F) 200x). L'isotype contrôle est montré en (F).

1.3.1 *Expression de HIF-2 α*

En parallèle de l'étude de HIF-1 α nous avons étudié l'effet de l'hypoxie sur l'expression de HIF-2 α en immuno-cytofluorescence dans les hMDMs de sujets témoins sains (n=3) et patients atteints de sarcoïdose (n=3). Une expression cytoplasmique de HIF-2 α était observée dans les différentes conditions. Chez les sujets témoins, il n'a pas été observé de marquage nucléaire de HIF-2 α en normoxie à l'inverse des conditions hypoxiques où un marquage nucléaire a été observé. Chez les sujets atteints de sarcoïdose, il existe un marquage nucléaire en normoxie et en hypoxie (Figure 28).

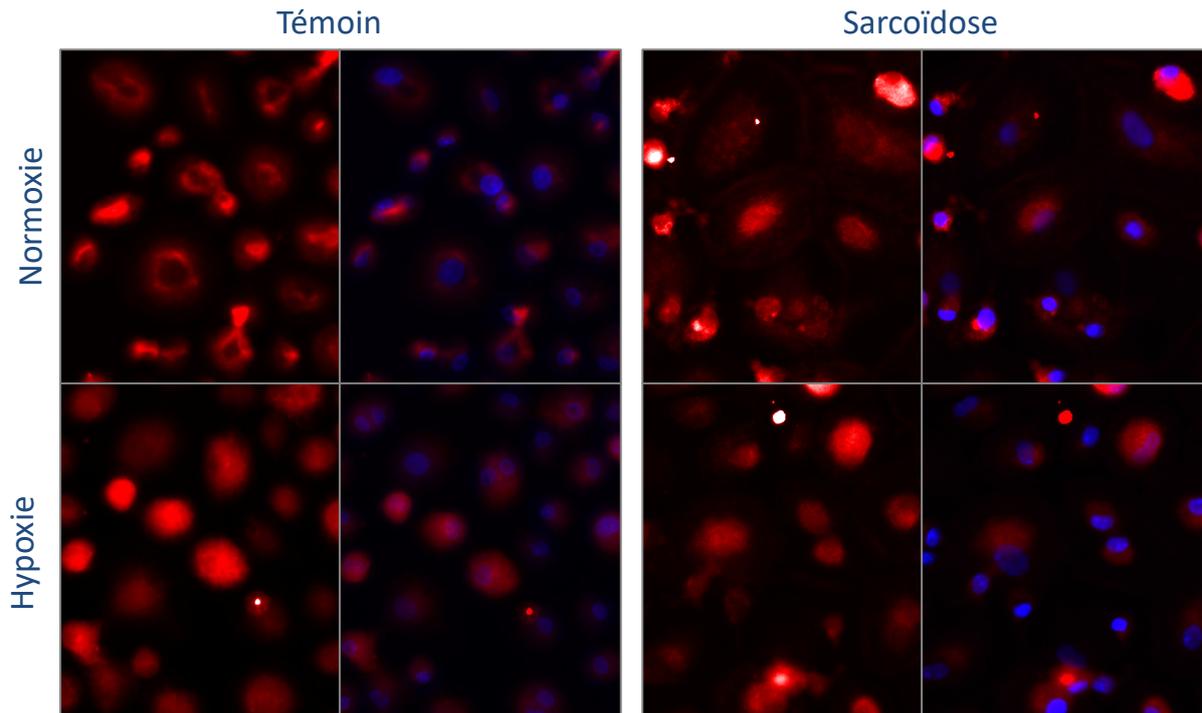


Figure 28: *Expression de HIF-2 α*

Immunofluorescence représentative de l'expression de HIF-2 α (rouge) dans des macrophages dérivés de monocytes sanguins de patients atteints de sarcoïdose et de sujets témoins sains après 24H de normoxie (FiO₂ : 21%) ou d'hypoxie (FiO₂ : 1,5%). Image de superposition DAPI (en bleu) et HIF-2 α (grossissement x200).

1.3.2 *Analyses complémentaires de la production cytokinique dans le surnageant de macrophages exposés à l'hypoxie.*

Une première étape du travail a été de mesurer de façon semi-quantitative 105 cytokines par Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit© dans le surnageant des macrophages issus d'un témoin et de deux sujets atteints de sarcoïdose pulmonaire active (cf chapitre 7.2).

Cette technique nous a permis d'identifier PAI-1 comme une cytokine d'intérêt car elle était augmentée en hypoxie notamment chez les deux sujets atteints de sarcoïdose.

Nous avons étudié chez le patient présentant une sarcoïdose persistante active stade IV (évoluant depuis plus de 5 ans) l'effet de l'hypoxie.

Les cytokines qui étaient augmentées en hypoxie uniquement chez le patient présentant une forme persistante et pas chez le patient atteint du sarcoïdose active de diagnostic récent et chez le sujet témoin sain sont présentés sur la Figure 29.

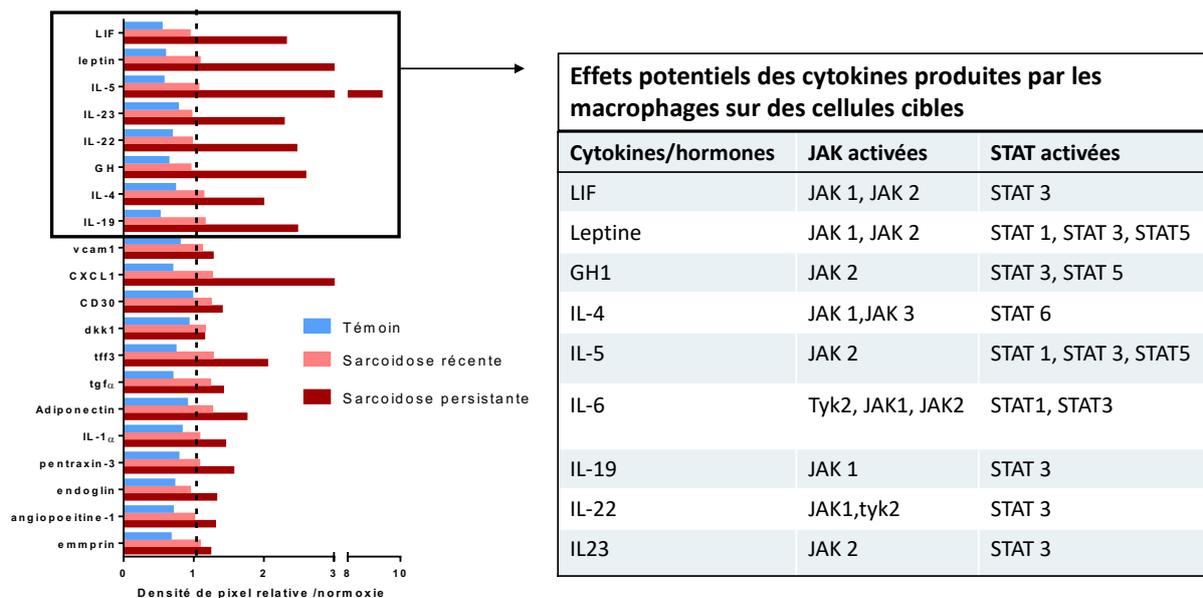


Figure 29 : Résultats du protéome array concernant les 20 cytokines spécifiquement augmentées en hypoxie uniquement chez le patient présentant une forme persistante de sarcoïdose

Parmi ces 20 cytokines, 8 sont des cytokines impliquées dans la régulation positive de la voie JAK STAT.

Nous avons dosé dans le surnageant des hMDMs les cytokines susceptibles d'induire une régulation positive de la voie JAK-STAT : IL-4, IL5, IL22 mais aussi IL-6, et IL-10 (cf. Figure 30). L'IL-4 était indosable. Le dosage des autres cytokines n'a pas montré leur induction par l'hypoxie, excepté pour l'IL-6 chez les sujets témoins et pour l'IL-5 augmenté uniquement en hypoxie chez les témoins et les cas de sarcoïdose AS.

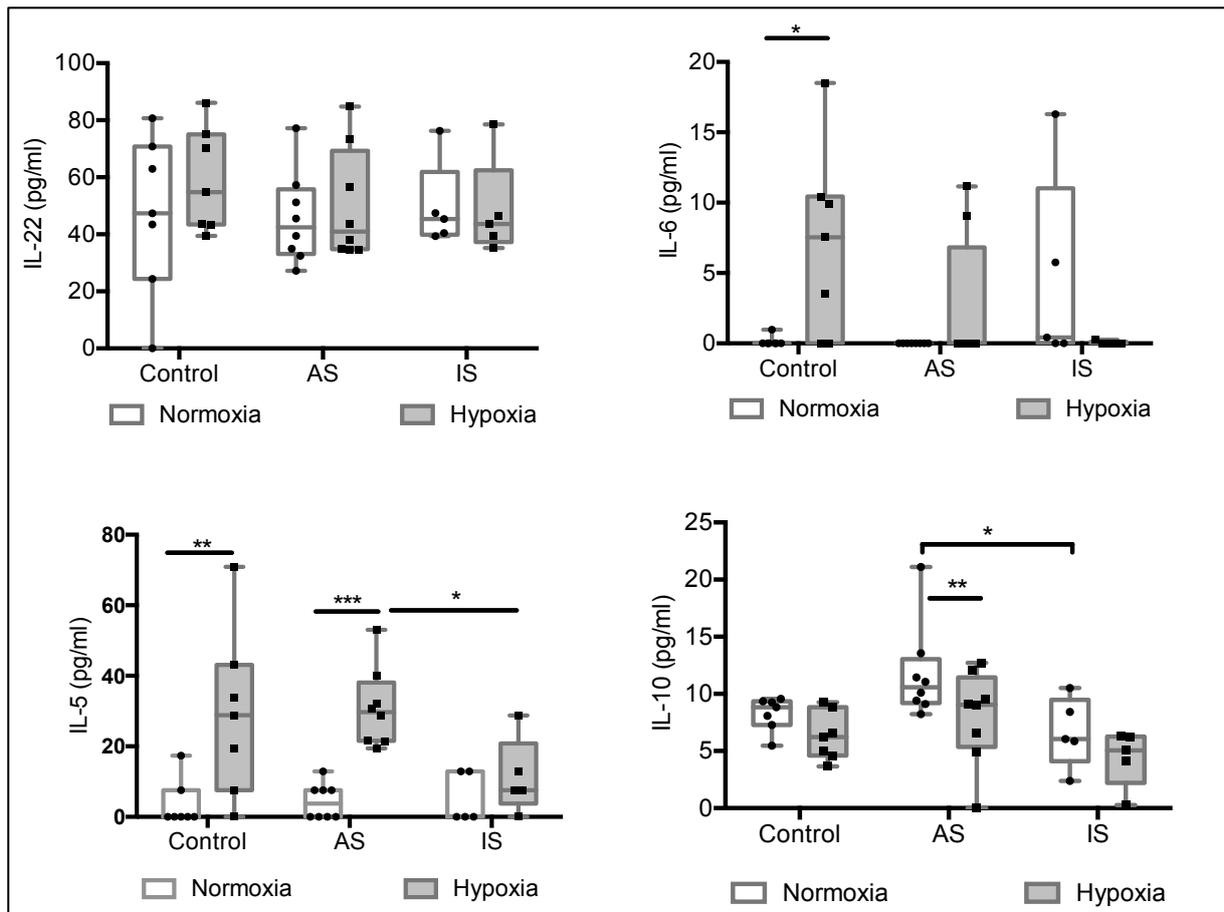


Figure 30 : Effet de l'hypoxie sur la sécrétion de cytokines impliquées dans la régulation positive de la voie JAK-STAT

Dosage par Luminex® dans le surnageant d'hMDMs de sujets témoins sains (Control) et de patients atteints : sarcoïdose de forte activité pulmonaire (AS) et sarcoïdose pulmonaire de faible activité ou inactive (IS), de la concentration de l'IL-22, IL-6, IL-5 et IL10. (n= 5-8). * p<0.05; **p<0.01 *** p<0.001 par two-way ANOVA-repeated measures avec post-hoc test de sidak.

Nous avons également dosé dans le surnageant des hMDMs diverses chimiokines attirant pour CXCL1 les neutrophiles, MCP-1 les monocytes, CXCL9 les lymphocytes notamment Th1, et MIF les macrophages. Nous n'avons pas constaté de modulation de la sécrétion de ces chimiokines par l'hypoxie, exceptée une diminution pour MCP-1 aux cours des AS (Figure 31).

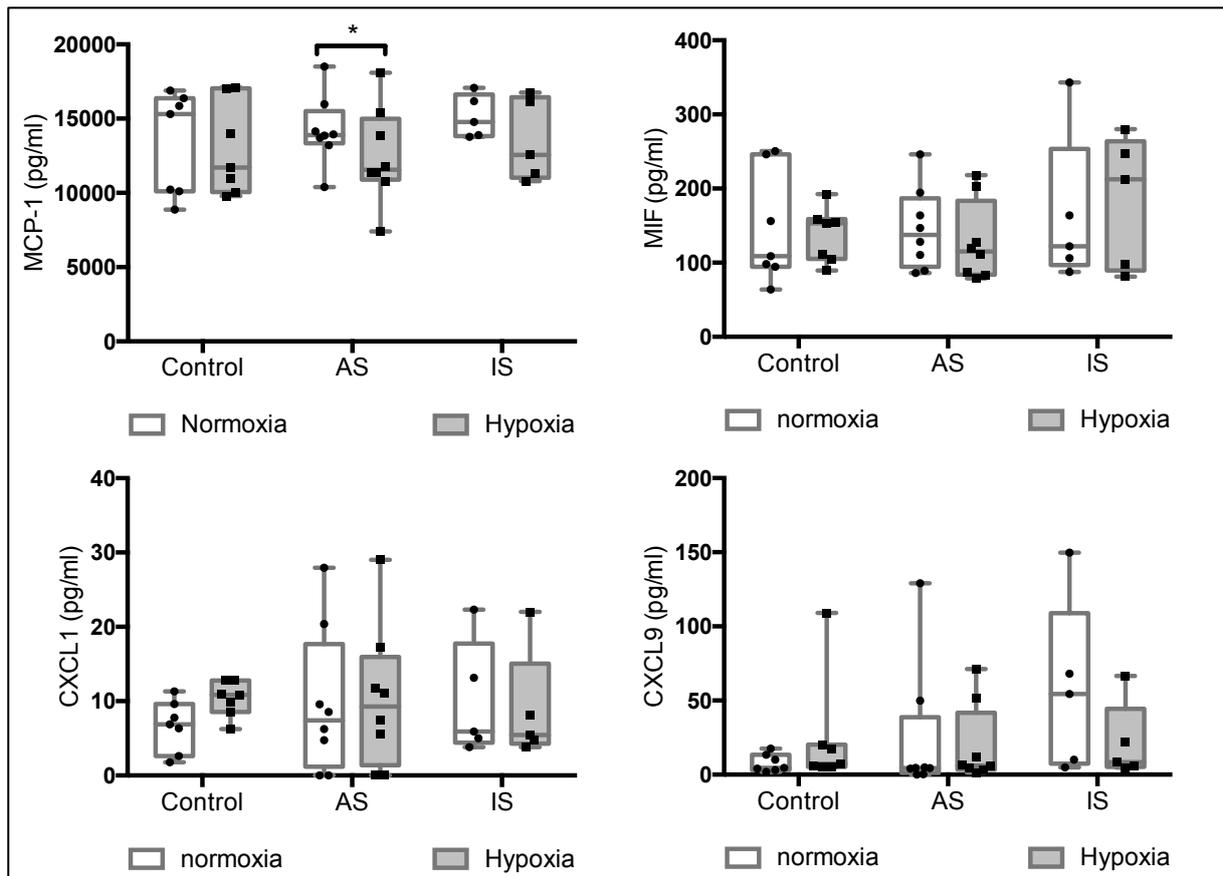


Figure 31: Effet de l'hypoxie sur la sécrétion de chimiokines

Dosage par Luminex® dans le surnageant d'hMDMs de sujets témoins sains (Control) et de patients atteints : sarcoïdose de forte activité pulmonaire (AS) et sarcoïdose pulmonaire de faible activité ou inactive (IS), de la concentration de CXCL1, MIF, CXCL9 et MCP-1. (n= 5-8). * p<0.05; par two-way ANOVA-repeated measures avec post-hoc test de sidak.

1.4 Résumé des principaux résultats

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence la présence de HIF-1 α au sein des cellules épithélioïdes des granulomes de biopsies pulmonaires de patients atteints de sarcoïdose. Concernant l'effet de de l'hypoxie sur les hMDMs :

- L'activité de HIF-1 α en hypoxie était significativement plus augmentée en cas de sarcoïdose pulmonaire de forte activité (AS) qu'en cas de sarcoïdose pulmonaire de faible activité ou inactive (IS) ou chez les témoins sains.
- L'hypoxie diminuait la phagocytose des hMDMs et l'expression du récepteur « éboueur » CD36 uniquement chez les témoins mais pas chez les AS et IS.
- L'hypoxie diminuait l'expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et de présentation antigénique (HLA-DR) chez les AS.
- L'hypoxie augmentait la réponse proinflammatoire (TNF α , IL-1 β , IL-18, CXCL8 et diminution de l'IL-10) des hMDMs uniquement en cas AS. Cette réponse pro-

inflammatoire était accompagnée d'une diminution de l'activation de NF- κ B (p50 et p65) pour les AS.

- L'hypoxie induisait une réponse profibrosante (TGF β 1, PDGF-BB, PAI-1, VEGF-A), avec une élévation de PAI-1 particulièrement importante en cas de AS ;
- L'effet du milieu conditionné de hMDMs exposés à l'hypoxie immobilisaient les NHLFs sans modifier leur prolifération et ceci de façon plus importante en cas de AS. L'immobilisation des NHLFs étaient liée à PAI-1 et cette cytokine étant exprimée dans les cellules épithélioïdes constitutives du granulome.

2. Effets de l'hypoxie dans des modèles in vivo de granulomatose pulmonaire

2.1 Hypothèse et objectifs de travail

Ce travail a été réalisé au cours du Master 2 du Dr Simon Chauveau que j'ai co-encadré avec le Dr Valérie Besnard (travail financé par le Fond de recherche en santé respiratoire et la Fondation du souffle). Les résultats de ce travail sont encore préliminaires.

L'hypothèse principale de travail était que l'hypoxie favoriserait la formation de granulome et l'évolution vers la fibrose dans des modèles murins de granulomatose pulmonaire induits par le *Propionibacterium acnes* (PA), ou par des nanotubes de carbone (NTs). Les objectifs que nous avons établis en vue de répondre à cette hypothèse étaient de :

- Mettre au point les modèles de granulomatose pulmonaire au sein de notre laboratoire.
- Comparer la fréquence des granulomes pulmonaires entre souris exposées à l'hypoxie ou à la normoxie, et d'éventuelles lésions fibrosantes dans ces deux modèles de granulomatose pulmonaire.
- Déterminer dans ces modèles de granulomatose les effets de l'hypoxie sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la formation des granulomes, et des marqueurs pro-fibrosants, dans ces modèles de granulomatose.

2.2 Résultats

2.2.1 Mise au point du modèle de granulomatose pulmonaire induite par PA

La première étape des expérimentations animales a consisté à mettre en place dans notre laboratoire les modèles de granulomatose pulmonaire induite. Les modèles sont décrits dans le chapitre 3.2.

- **Protocole 1 : IP + IT x1**

Au sacrifice les souris présentaient une inflammation alvéolaire bien visible avec la présence de macrophages (photographie non montrée) mais sans formation de granulome ou d'agrégats prégranulomateux (Figure 32 a,b).

- **Protocole 2 : IFA + IT x1**

Au sacrifice, la présence d'un seul granulome a pu être observé par section histologique chez 30% des animaux (Figure 32, Figure 33a)

- **Protocole 3 : CFA + IT x1**

Au sacrifice des granulomes étaient observés chez 25% des souris, mais en plus grand nombre que le groupe précédent (5 granulomes par section histologique) (Figure 32, Figure 33b)

- **Protocole 4 : IT PA vivant**

Les souris instillées avec une dose supérieure, de 1000 μ g, sont décédées moins de 24h après l'instillation. Pour des doses inférieures à 1000 μ g, on retrouvait une inflammation alvéolaire et un recrutement inflammatoire cellulaire péri-bronchique sans granulome (Figure 32).

- **Protocole 5 : IT x1**

L'instillation unique de PA inactivé par la chaleur, à des doses supérieures à 1000 μ g était bien tolérée, et entraînait également une inflammation alvéolaire macrophagique, associée à un recrutement inflammatoire péribronchique, mais sans granulome (Figure 32).

- **Protocole 6 : IT x 2**

L'histologie à 15 jours du deuxième challenge a retrouvé la présence de granulomes chez un tiers des souris (Figure 32, Figure 33d).

- **Protocole 7 : CFA + IT x2**

L'histologie à 15 jours de la deuxième IT, a retrouvé la présence de granulomes dans la moitié des cas, avec une tendance vers des granulomes plus importants mais sans différence significative dans leur nombre par rapport au protocole 3 (CFA + ITx1) (Figure 32).

Les modifications de dose de PA dans ce modèle CFA+ITx2 n'ont pas entraîné de différence significative, mais cependant on notait une tendance vers des granulomes de taille plus importante avec la dose de 800 μ g (Figure 32d).

➔ Ainsi parmi ces sept protocoles, le protocole 7 (CFA+ITx2), avec une dose de 800 μ g de PA semblait apporter les résultats les plus robustes. Ce protocole a été utilisé pour la suite des expérimentations.

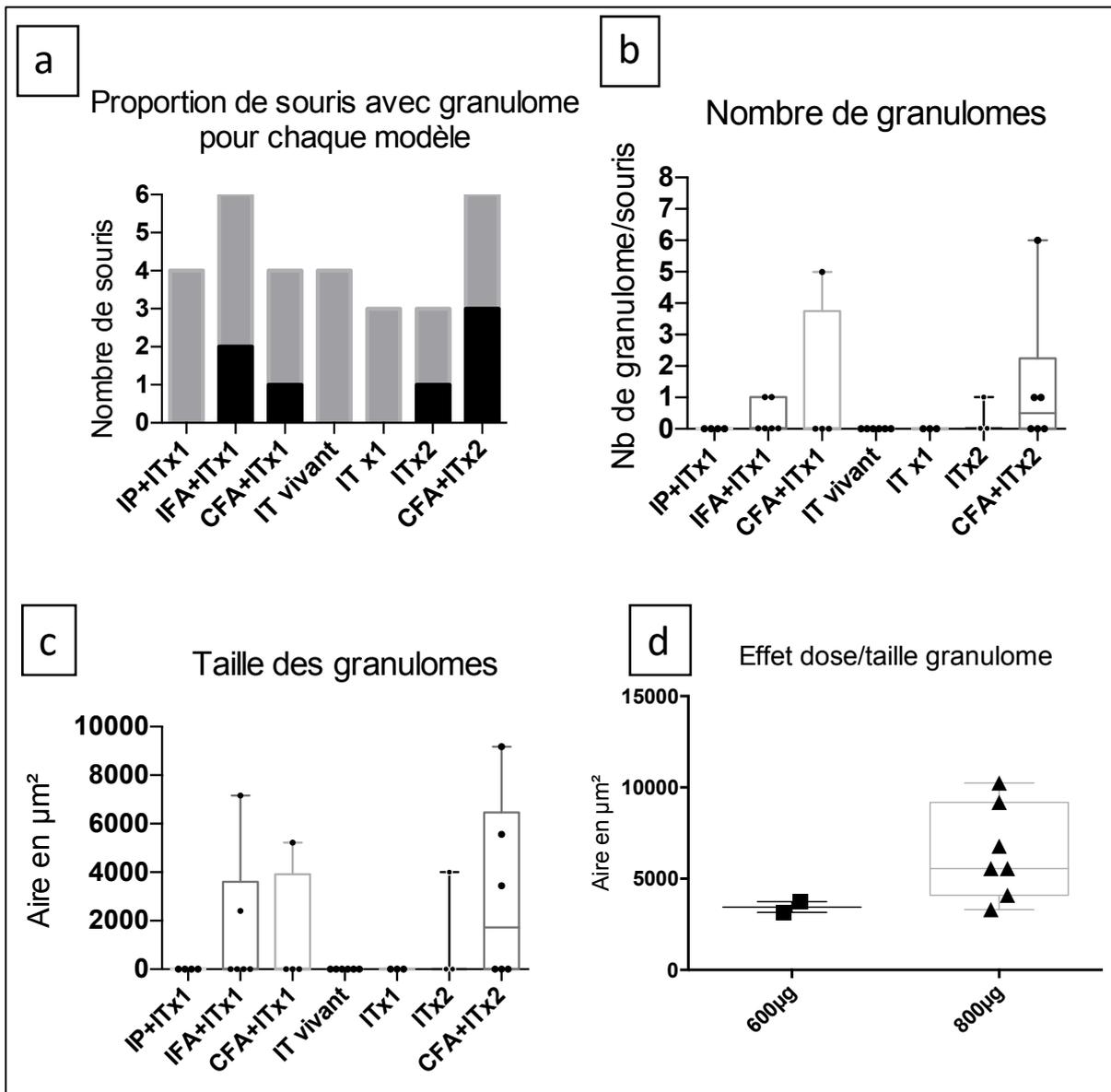


Figure 32: Morphométrie de la mise au point du modèle de granulomatose induite par PA

Morphométrie de la mise au point du modèle de granulomatose induite par PA

Différents modèles de granulomatose pulmonaire par PA ont été testés **a** : Proportion dans chaque modèle du nombre de souris présentant des granulomes (Gris : souris sans granulome, Noir : souris avec granulome) dans chaque modèle **b** : nombres de granulomes par souris dans chaque modèle **c** : aire moyenne des granulomes par souris dans chaque modèle **d** : aire moyenne des granulomes par souris selon la dose de PA, au sein du protocole 7 (CFA+ ITx2).

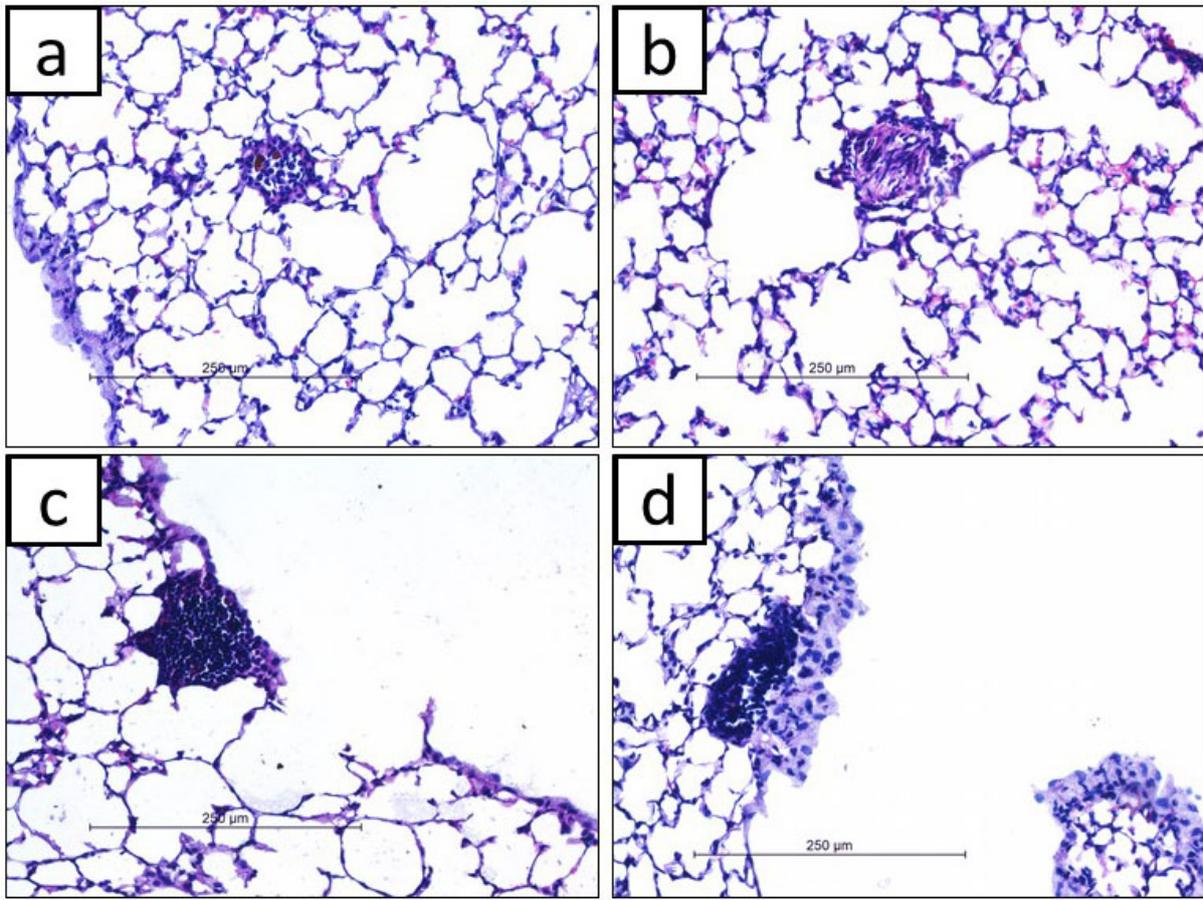


Figure 33: Histologie de la mise au point modèle de granulomatosse induite par PA
 Coloration HE sur coupes histologiques issues du **(a)** Protocole 2 : IFA+ITx1 ; **(b)** Protocole 3 : CFA+ITx1; **(c)** Protocole 7; **(d)** Protocole 6 : IT x 2 (dose de PA2000µg). Grossissement 200x

2.2.1 Résultats histologiques de l'effet de l'hypoxie sur la granulomatosse induite par PA

2.2.1.1 Coloration HE

Les souris PBS/Nx ne présentaient pas d'anomalie histologique particulière (Figure 34a). Les souris PBS/Hx ne présentaient pas de granulomes, mais un épaissement des parois alvéolaires pulmonaires, ainsi qu'une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires témoignant d'une alvéolite (Figure 34b).

Les 2/3 des souris PA/Nx présentaient des granulomes contre 4/12 des souris PA/Hx (test χ^2 : p = 0,0812) (Figure 35a). La taille et le nombre des granulomes étaient comparables entre le groupe PA/Nx et PA/Hx. (Figure 35b,c). Les granulomes des souris PA/Nx et PA/Hx étaient constitués principalement d'agrégats denses de macrophages associés à des lymphocytes en une structure les différenciant d'une simple alvéolite (Figure 34 d,e)

On observait chez les souris PBS/Hx et PA/Hx des lésions sous pleurales, focales, constituées d'infiltrats inflammatoires macrophagiques et lymphocytaires, associés à un épaissement

important du parenchyme alvéolaire. Ces lésions ont été retrouvées chez 1 souris sur 5 des PBS/Hx, (Figure 34c) et 2 sur 12 des souris PA/Hx (Figure 34f) mais pas chez les souris PBS/Nx et PA/Nx (Figure 35d).

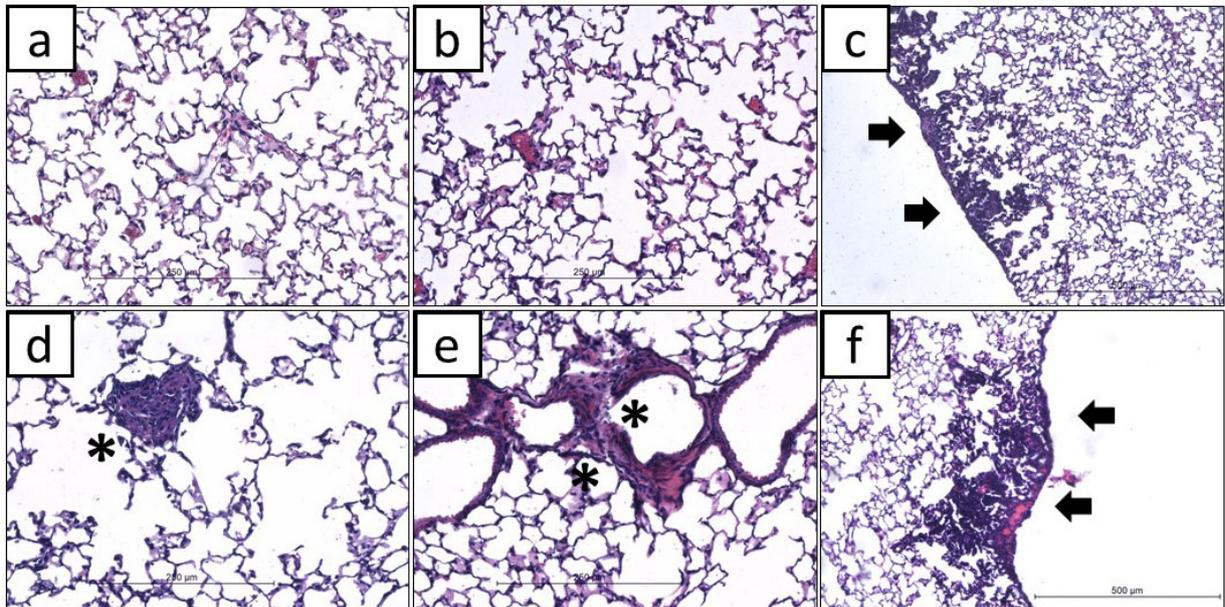


Figure 34: Histologie de la granulomatose induite par PA.

Coloration HE sur coupes histologiques issues de souris (a) PBS/Nx ; (b,c) PBS/Hx (c) : zone fibrotique sous-pleurale ; (d) PA/Nx ; (e,f) PA/Hx, (f) : zone fibrotique sous-pleurale. Grossissement 200x ; * : structure granulomateuse ; → : zone fibrotique.

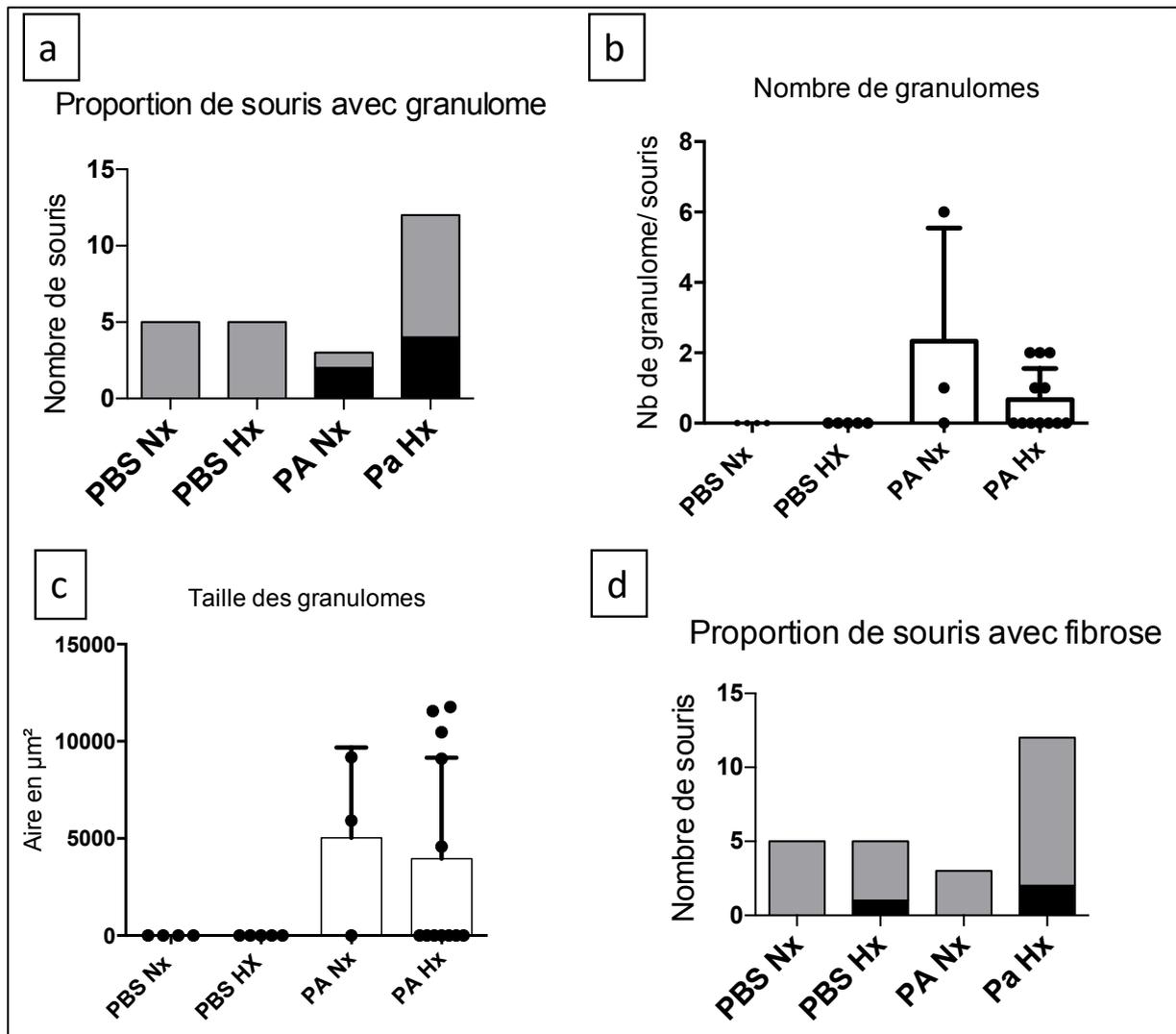


Figure 35: Morphométrie du modèle de granulomatose induite par PA en milieu hypoxique
a) Proportion des souris présentant un granulome (Gris : souris sans granulome, Noir : souris avec granulome ; **b)** Nombre de granulomes ; **c)** Surface moyenne des granulomes ; **d)** Proportion du nombre de souris présentant une fibrose (Gris : souris sans granulome, Noir : souris avec granulome).

2.2.1.2 Coloration au Trichrome de Masson

La coloration au trichrome de Masson révélait la présence de collagène de type I au sein des granulomes de souris PA/Nx (Figure 36d) et des souris PA/Hx (Figure 36e). Cette coloration mettait en évidence au sein des lésions sous pleurales inflammatoires, la présence d'une fibrose importante uniquement chez les souris PBS/Hx et PA/Hx ((Figure 36c et f).

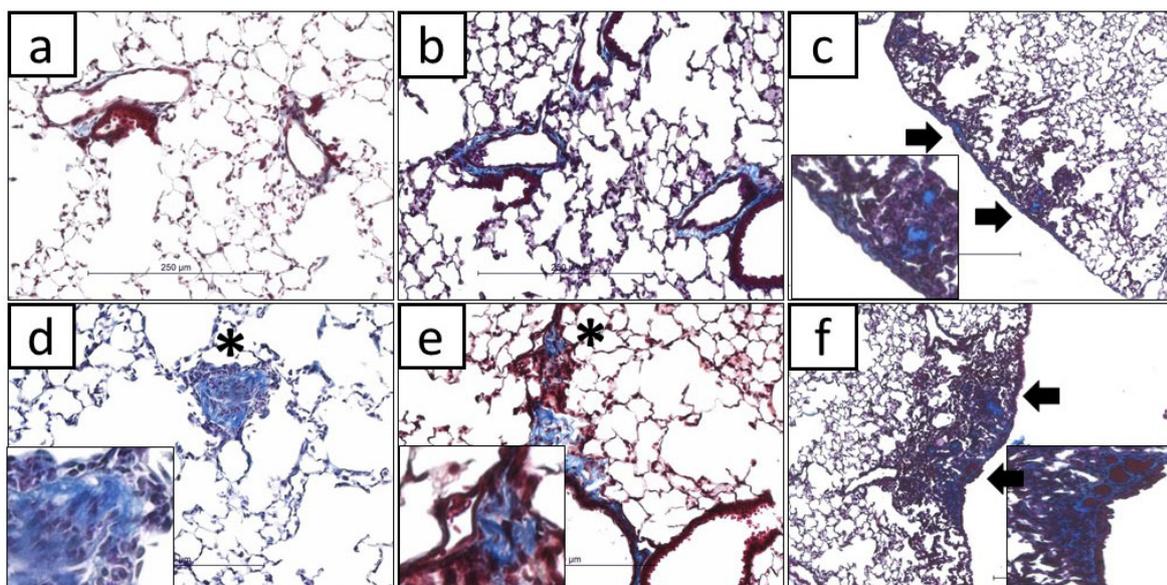


Figure 36: Lésions fibrotiques dans la granulomatose induite par PA
 Coloration Trichrome Masson sur coupes histologiques issues de souris **(a)** PBS/Nx ; **(b,c)** PBS/Hx (c) : zone fibrotique sous-pleurale ; **(d)** PA/Nx ; **(e,f)** PA/Hx, (f) : zone fibrotique sous-pleurale. Grossissement 200x ; *, structure granulomateuse ; ➔, zone fibrotique.

2.2.1.3 Marquage de HIF-1 α

Chez les souris PBS/Nx (Figure 37a), un immunomarquage de HIF-1 α était rarement détecté au niveau des noyaux des cellules épithéliales alvéolaires. Les souris PBS/Hx (Figure 37b), présentaient une augmentation du marquage d'HIF-1 α dans les noyaux de cellules épithéliales et macrophagiques. Les souris PA/Nx et PA/Hx présentaient une augmentation très nette de l'immunomarquage d'HIF-1 α sur les cellules épithéliales comme sur les cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes) (Figure 37d,e).

On notait également la présence d'un immunomarquage d'HIF-1 α des macrophages, situés au sein des granulomes des souris PA/Hx (Figure 37e). On retrouvait moins fréquemment le marquage d'HIF-1 α au sein des granulomes des souris PA/Nx (Figure 37d,d'). Enfin, on identifiait au sein de la fibrose sous pleurale, un immunomarquage principalement des macrophages, et plus important comparé aux autres zones pulmonaires chez la même souris (Figure 37c, f).

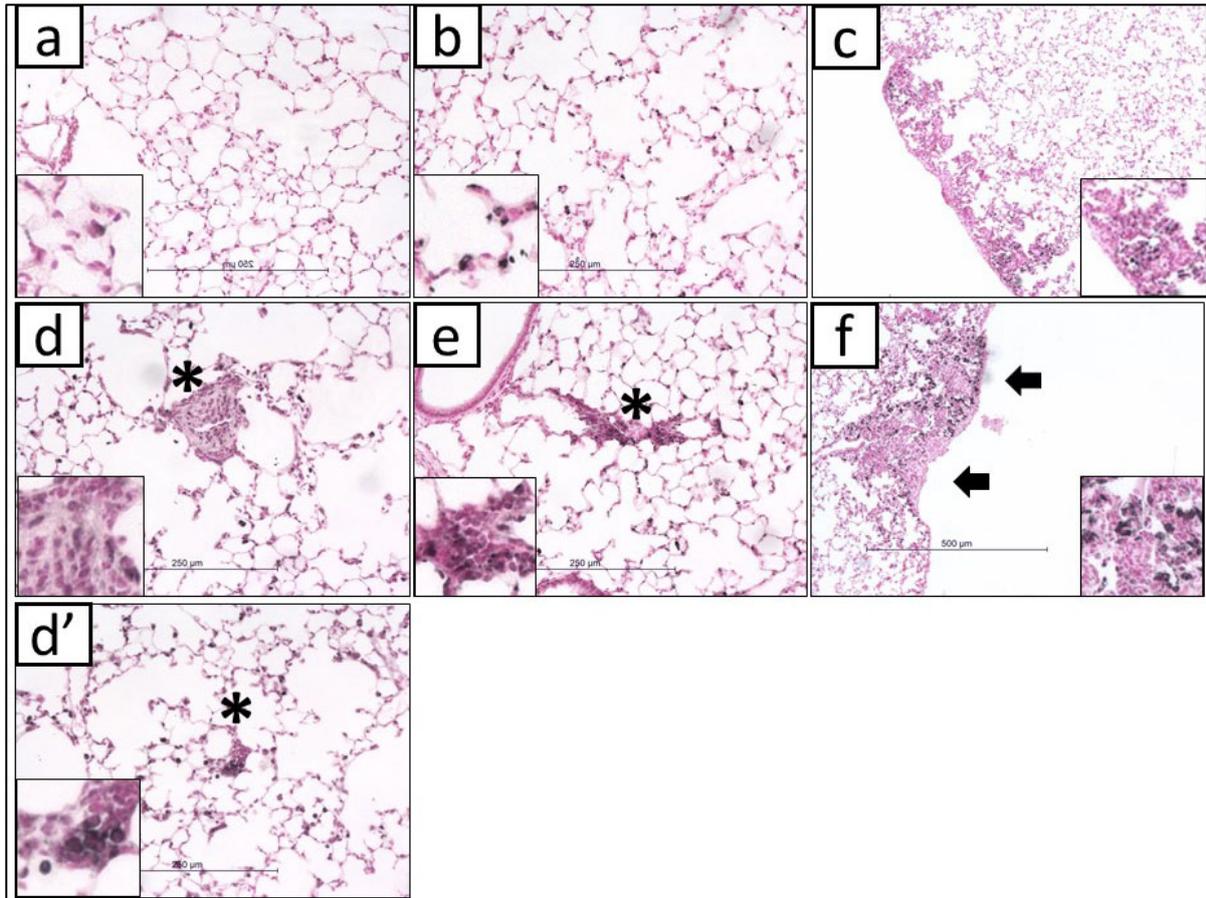


Figure 37: Présence de HIF-1 α dans la granulomateuse induite par PA
 Immunomarquage HIF-1 α sur coupes histologiques issues de souris (a) PBS/Nx ; (b,c) PBS/Hx, (c) : zone fibrotique sous-pleurale ; (d et d') PA/Nx ; (e,f) PA/Hx (f),zone fibrotique sous-pleurale. Grossissement 200x ; *, structure granulomateuse ; ➔, zone fibrotique.

2.2.2 Régulation transcriptionnelle par l'hypoxie dans le modèle de granulomateuse induite par PA

Afin de déterminer l'effet de l'hypoxie sur le recrutement des cellules inflammatoires et la fibrogénèse dans les modèles de granulomatoses induites chez la souris, nous avons mesuré le taux des ARNm de différents marqueurs par RT-qPCR : (i) pro-inflammatoires (*Tnfa*, *Il18*, *Ccl4*, *Cxcl9*, *Il12b*, *Il4*), (ii) proangiogénique (*Vegfa*), et (iii) associés à la fibrose (*Pdgfb*, *Ctgf*, *Col3a1*, *Fn1*) à partir de broyats pulmonaires. Pour chaque modèle testé de granulomateuse induite, le groupe de souris en condition normoxique recevant l'instillation de PBS servait de groupe témoin (PBS/Nx).

2.2.2.1 Cytokines pro-inflammatoires

En Nx, l'instillation de PA augmentait l'expression de *Tnfa* par rapport à l'instillation de PBS ($p < 0,05$). L'hypoxie ne modifiait pas l'expression de *Tnfa* par rapport à la condition

normoxique. La double exposition PA/Hx ne modifiait pas l'expression de *Tnfa*, par rapport à la condition normoxie (Figure 38a)

En Nx, l'instillation de PA augmentait l'expression de *Il12b* par rapport à l'instillation de PBS ($p < 0,05$). L'hypoxie ne modifiait pas l'expression de *Il12b* par rapport à la condition normoxique. La double exposition PA/Hx induisait l'expression de *Il12b*, par rapport à la condition PBS/Hx. (Figure 38b)

En Nx, l'instillation de PA ne modifiait pas l'expression de l'*Il18* par rapport à l'instillation de PBS. De même, l'hypoxie ne modifiait pas l'expression de l'*Il18* par rapport à la condition normoxique. Par contre, la double exposition PA/Hx augmentait l'expression d'IL18 par rapport aux souris PA/Nx ($p < 0,05$) et aux souris PBS/Hx ($p < 0,01$) (Figure 38c).

Pour *Ccl4*, *Cxcl9* et *Il4*, leur expression a été induite par l'instillation de PA. En condition Hx, on observait une diminution significative ($p < 0,01$) de l'expression de *Ccl4*, *Cxcl9* et *Il4* chez les souris PBS et PA. (Figure 38 d,e,f)

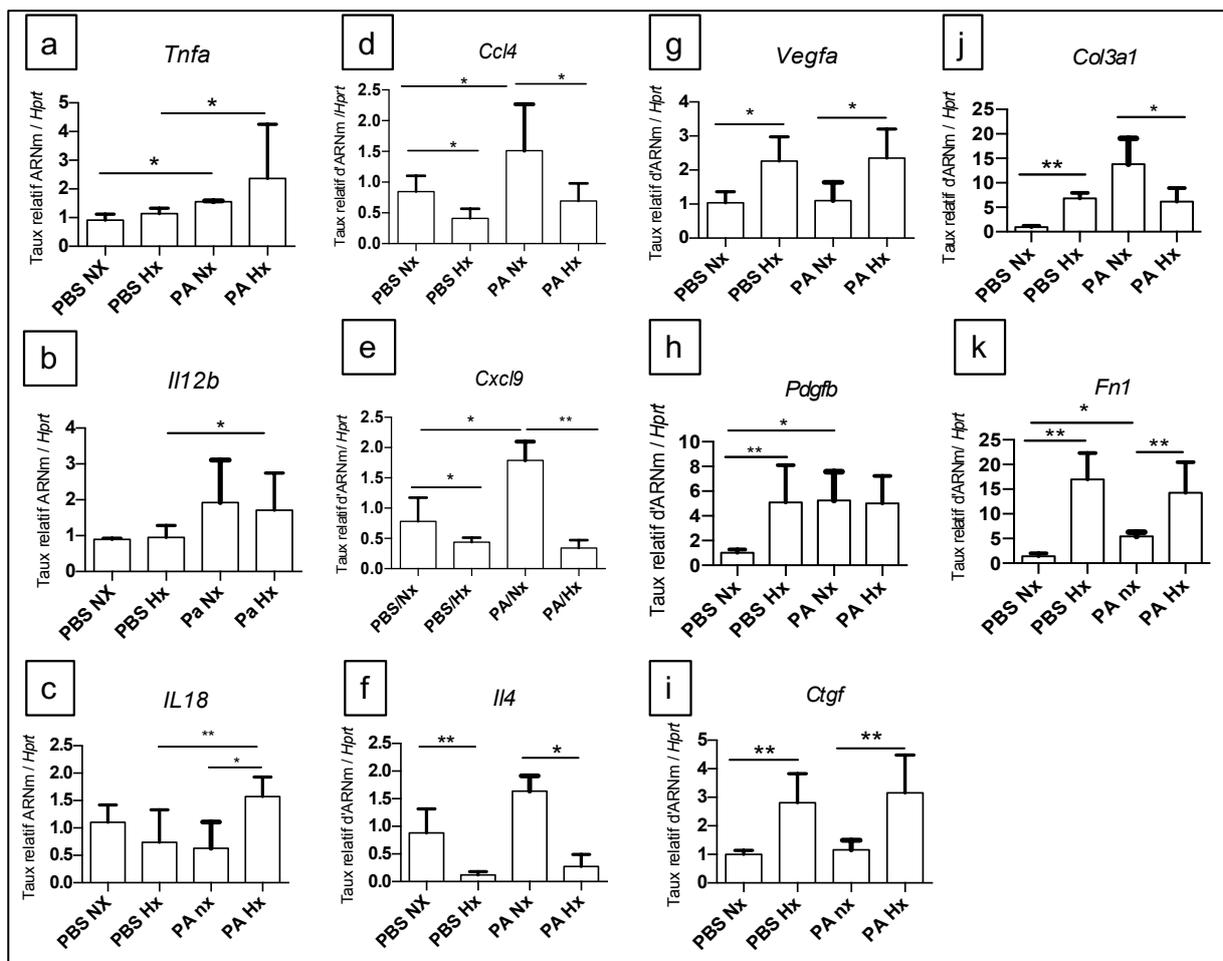


Figure 38: Taux d'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation, l'hypoxie et la fibrogénèse dans le modèle murin de granulomatose induite par PA

Les taux d'ARNm sont mesurés par RT-qPCR à partir d'homogénats pulmonaires de souris ayant reçu une instillation de PBS sous normoxie (PBS Nx), de PBS sous Hypoxie (PBS Hx), de PA sous normoxie (PA Nx), de PA sous hypoxie (PA Hx). Les gènes étudiés sont : a) *Tnfa*, b) *Il12b*, c) *Il18*, d) *Ccl4*, e) *Cxcl9*, f) *IL4*, g) *Vegfa*,

h) *Pdgfb*, i) *ctgf*, j) *Col3a*, k) *Fnl*. Données représentées en moyennes et écart-types. * : $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. (test de Mann Whitney). N=8 pour PBS NX, n=5 PBS HX, n=3 pour PA NX ; n=12 pour PA HX

2.2.2.2 Marqueurs associés à la fibrose

En Nx, l'instillation de PA ne modifiait pas l'expression de *Vegfa* par rapport à l'instillation de PBS. Également en condition hypoxique, l'instillation de PA ne modifiait pas l'expression de *Vegfa*. Comme attendu, l'hypoxie augmentait l'expression de *Vegfa* par rapport à la condition normoxique chez les souris instillées avec le PBS ($p < 0,05$) et chez les souris instillées avec le PA ($p < 0,05$) (Figure 38 g).

En Nx, l'instillation de PA augmentait l'expression de *Pdgfb* et *Col3a1* par rapport à l'instillation de PBS ($p < 0,05$). L'hypoxie augmentait l'expression de *Pdgfb* et *Col3a1* par rapport à la condition normoxique ($p < 0,01$). La double exposition à PA/Hx n'entraîne pas d'induction plus importante soit de *Pdgfb*, soit de *Col3a1* par rapport aux conditions PA seule ou Hx seule (Figure 38 h,j). L'expression de *Ctgf* était induite seulement en réponse de l'hypoxie ; l'instillation de PA n'avait aucun effet (Figure 38 i)

L'instillation de PA augmentait l'expression de *Fnl* par rapport à l'instillation de PBS en Nx ($p < 0,05$). L'hypoxie induisait l'expression de *Fnl* chez les souris instillées avec le PBS ($p < 0,01$). La double exposition à PA/Hx n'entraînait pas d'induction plus importante soit de *Fnl* par rapport à Hx seule (Figure 38 k).

2.2.3 Résultats histologiques de l'effet de l'hypoxie sur la granulomatose induite par les nanotubes de carbone (NTs).

Le modèle de granulomatose pulmonaire induite par les nanotubes de carbone a également été utilisé pour étudier l'effet de l'hypoxie sur le développement des granulomes pulmonaires. Le groupe des souris traitées par nanotubes recevait une instillation de 100 μ g de nanotubes, sans sensibilisation, et était sacrifié 90 jours après l'instillation, tel que décrit d'après l'équipe de Huizar (Huizar et al. 2011), Un groupe de souris était soumis à l'hypoxie 15 jours avant le sacrifice (NT/Hx), un autre restait en normoxie (NT/Nx). Ces groupes étaient comparés à des souris instillées avec le PBS (PBS/Nx) et à des souris instillées avec le PBS sous hypoxie 15 jours avant le sacrifice (PBS/Hx).

2.2.3.1 Coloration Hématoxyline Eosine

Les souris PBS/Nx ne présentaient pas de lésions histologiques (Figure 39a). Les souris PBS/Hx présentaient une alvéolite macrophagique modérée, mais sans granulomatose (Figure

39b). Parmi les souris NT/Hx 12 sur 14 avaient des granulomes, contre 2 sur 4 pour les souris NT/Nx (test χ^2 : $p < 0,0001$) (Figure 40a). Dans les deux groupes de souris, la présence de nanotubes de carbone dans les granulomes était inconstante (comme dans Figure 39e). Ces granulomes étaient constitués de macrophages et de quelques lymphocytes (comme dans Figure 39d,e). L'absence de différence significative portant sur la taille ou le nombre de granulomes a été notée entre les deux groupes NT (Figure 40c,d). On a observé également la présence de lésions focales sous pleurales associant infiltrats inflammatoires denses et épaissements parenchymateux importants (Figure 39c,f). Ces lésions étaient retrouvées chez 1 souris sur 10 du groupe PBS/Hx (Figure 40d), et 6 souris sur 12 dans le groupe NT/Hx (test χ^2 : $p = 0,0337$, (Figure 40d). Aucune de ces lésions ne furent détectées chez les souris NT/Nx et PBS/Nx (Figure 39a,d).

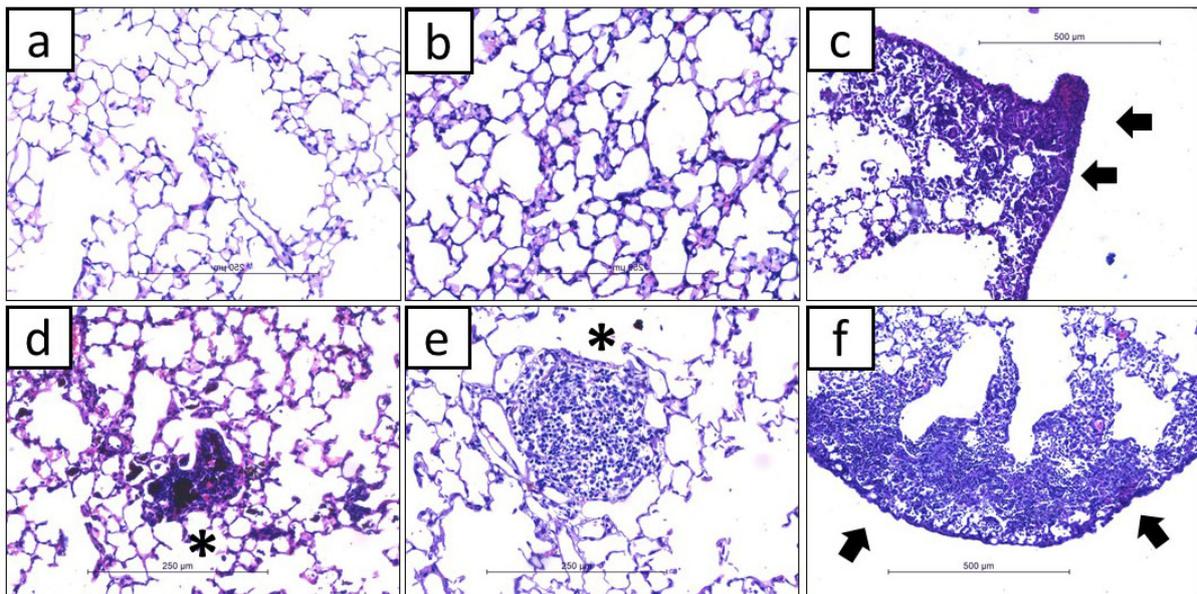


Figure 39: Histologie de la granulomateuse induite par nanotubes de carbone

Coloration HE sur coupes histologiques issues de souris **(a)** PBS/Nx ; **(b,c)** PBS/Hx, **(c)** zone fibrotique sous-pleurale ; **(d)** NT/Nx ; **(e,f)** NT/Hx **(f)** zone fibrotique sous-pleurale. Grossissement 200x ; *, structure granulomateuse ; ➔, zone fibrotique.

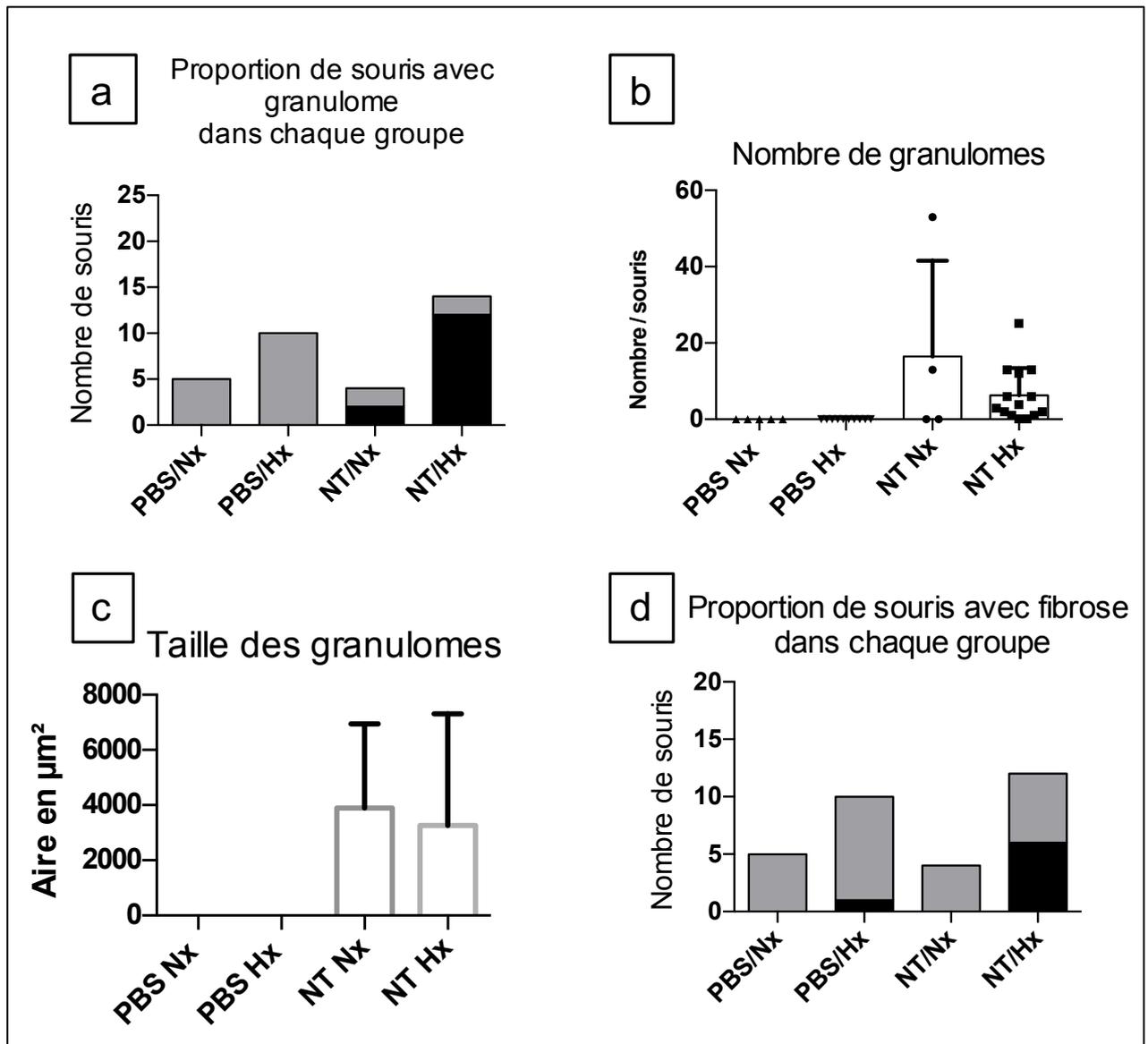


Figure 40: Morphométrie du modèle de granulomatose induite par les NTs

Dans les 4 groupes expérimentaux, ont été mesurés : a, la proportion des souris présentant un granulome (Gris : souris sans granulome, Noir : souris avec granulome) b, le nombre de granulomes/souris ; c ; la surface moyenne des granulomes ; d, la proportion du nombre de souris présentant une fibrose

2.2.3.2 Coloration au Trichrome Masson

La coloration au Trichrome Masson confirmait la présence de fibrose au sein des lésions sous pleurales, uniquement chez les souris PBS/Hx et NT/Hx (Figure 41 c,f). Au sein des granulomes des souris NT/Hx et NT/Nx, une présence faible de collagène était détectée sans différence notable entre les 2 groupes (Figure 41 d, d', e).

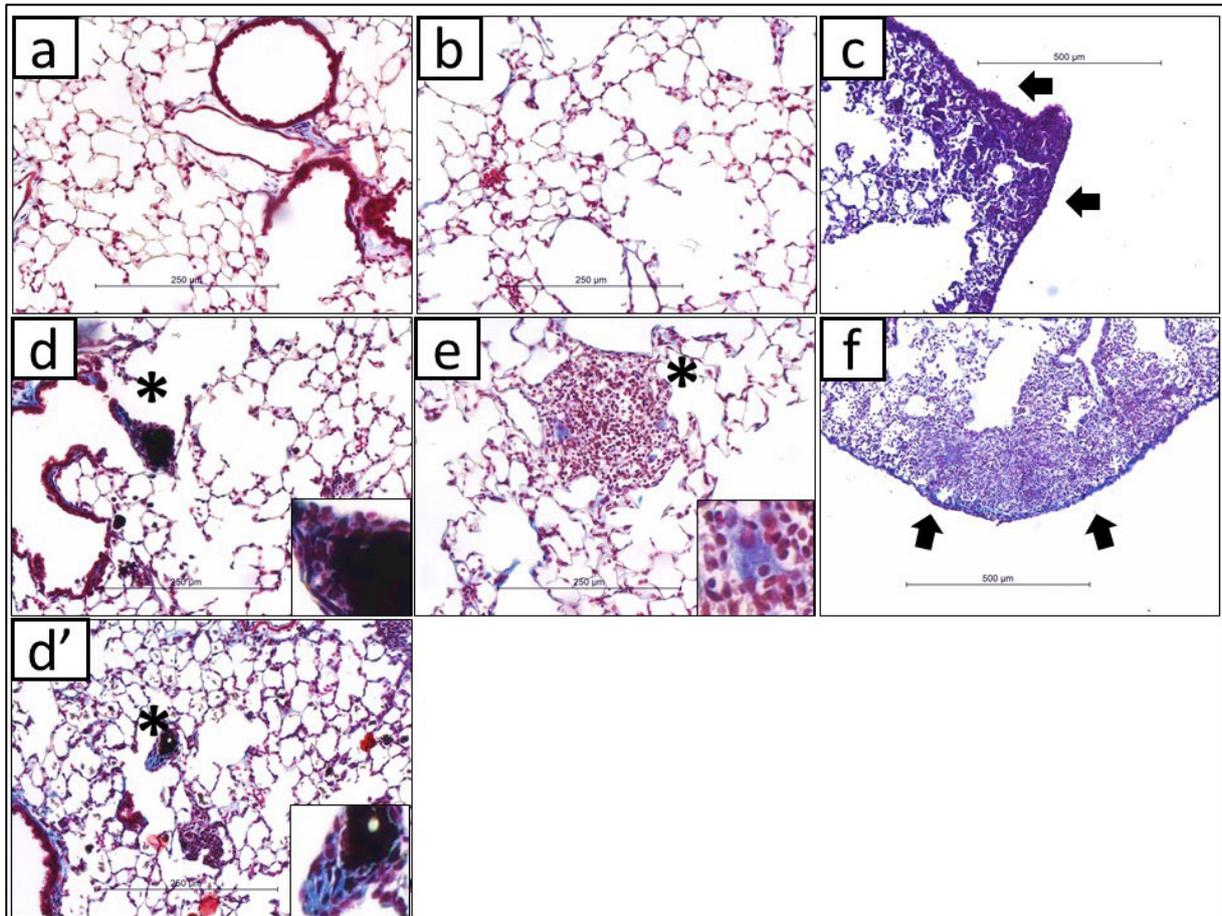


Figure 41: Lésions fibrotiques dans la granulomatose induite par nanotubes de carbone
 Coloration Trichrome Masson sur coupes histologiques issues de souris (a) PBS/Nx ; (b,c) PBS/Hx (c) : zone fibrotique sous-pleurale ; (d,d') NT/Nx ; (e,f) NT/Hx, (f) : zone fibrotique sous-pleurale. Grossissement 200x ; *, structure granulomateuse ; ➔, zone fibrotique.

2.2.3.3 Marquage HIF-1 α

Chez les souris PBS/Nx, un rare immunomarquage d'HIF-1 α a été observé, uniquement au niveau des noyaux de quelques cellules épithéliales alvéolaires (Figure 42a). Cet immunomarquage était légèrement augmenté chez les souris NT/Nx au niveau des noyaux de cellules épithéliales mais également de macrophages et de lymphocytes (Figure 42d). L'immunomarquage HIF-1 α était augmenté de façon beaucoup plus notable chez les souris en hypoxie (NT/Hx et PBS/Hx), dans les cellules épithéliales et également beaucoup plus sur des macrophages (Figure 42 b,e).

Le marquage HIF-1 α dans les macrophages situés au sein des granulomes était bien identifié sur les souris NT/Hx (Figure 42e), mais était beaucoup plus discret chez les souris NT/Nx (Figure 42d).

Enfin, sur les lésions de fibrose précédemment décrite, retrouvées uniquement chez les souris PBS/Hx et NT/Hx, l'immunomarquage HIF-1 α principalement des macrophages était diffus et nettement plus important que dans le reste du parenchyme pulmonaire (Figure 42c et f).

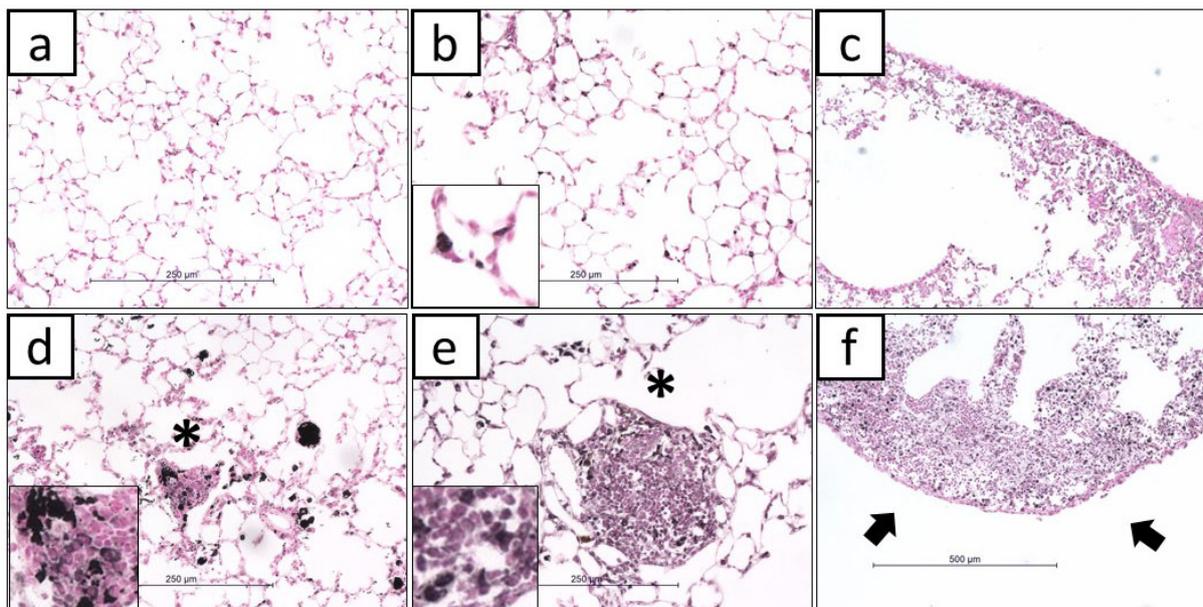


Figure 42: Présence de HIF α dans la granulomateuse induite par nanotubes de carbone.

Immunomarquage HIF-1 α sur coupes histologiques issues de souris (a) PBS/Nx ; (b,c) PBS/Hx, (c) : zone fibrotique sous-pleurale ; (d) NT/Nx ; (e,f) NT/Hx (f) zone fibrotique sous-pleurale. Grossissement 200x ; *, structure granulomateuse ; ➔, zone fibrotique.

2.2.4 Régulation transcriptionnelle par l'hypoxie dans le modèle de granulomateuse induite par NT

2.2.4.1 Cytokines pro-inflammatoires

Le taux d'ARNm de *Tnfa* n'était pas modifié en réponse aux NT en Nx, ni en réponse à l'Hx seule. Par contre, la double exposition NT/Hx induisait significativement l'expression de *Tnfa* par rapport aux souris PBS/Nx ($p < 0,05$), et aux souris PBS/Hx ($p < 0,01$). Une tendance vers l'augmentation était aussi notée par rapport aux souris sous normoxie instillées aux NT ($p = 0,07$) (Figure 43a)

Le taux d'ARNm de *Il12b* n'était pas modifié en réponse aux NT en Nx, ni en réponse à l'Hx seule. Par contre, la double exposition NT/Hx induisait significativement l'expression de *Il12b* par rapport aux souris NT/Nx ($p < 0,05$), et aux souris PBS/Hx ($p < 0,01$) (Figure 43b)

Le taux d'ARNm de *Il18* n'était pas modifié en réponse aux NT (Nx et Hx). En condition hypoxique, l'expression de *Il18* était induite chez les souris PBS ($p < 0,01$) et les souris NT ($p < 0,05$) (Figure 43c).

Pour *Ccl4*, *Cxcl9* et *Il4*, leur expression n'était pas modifiée par l'instillation de NT. En condition Hx, on observait une diminution significative ($p < 0,01$) de l'expression de *Ccl4*, *Cxcl9* et *Il4* chez les souris PBS, et une diminution significative de *Ccl4* et *Cxcl9*, chez les souris NT ($p < 0,01$) (Figure 43d,e,f).

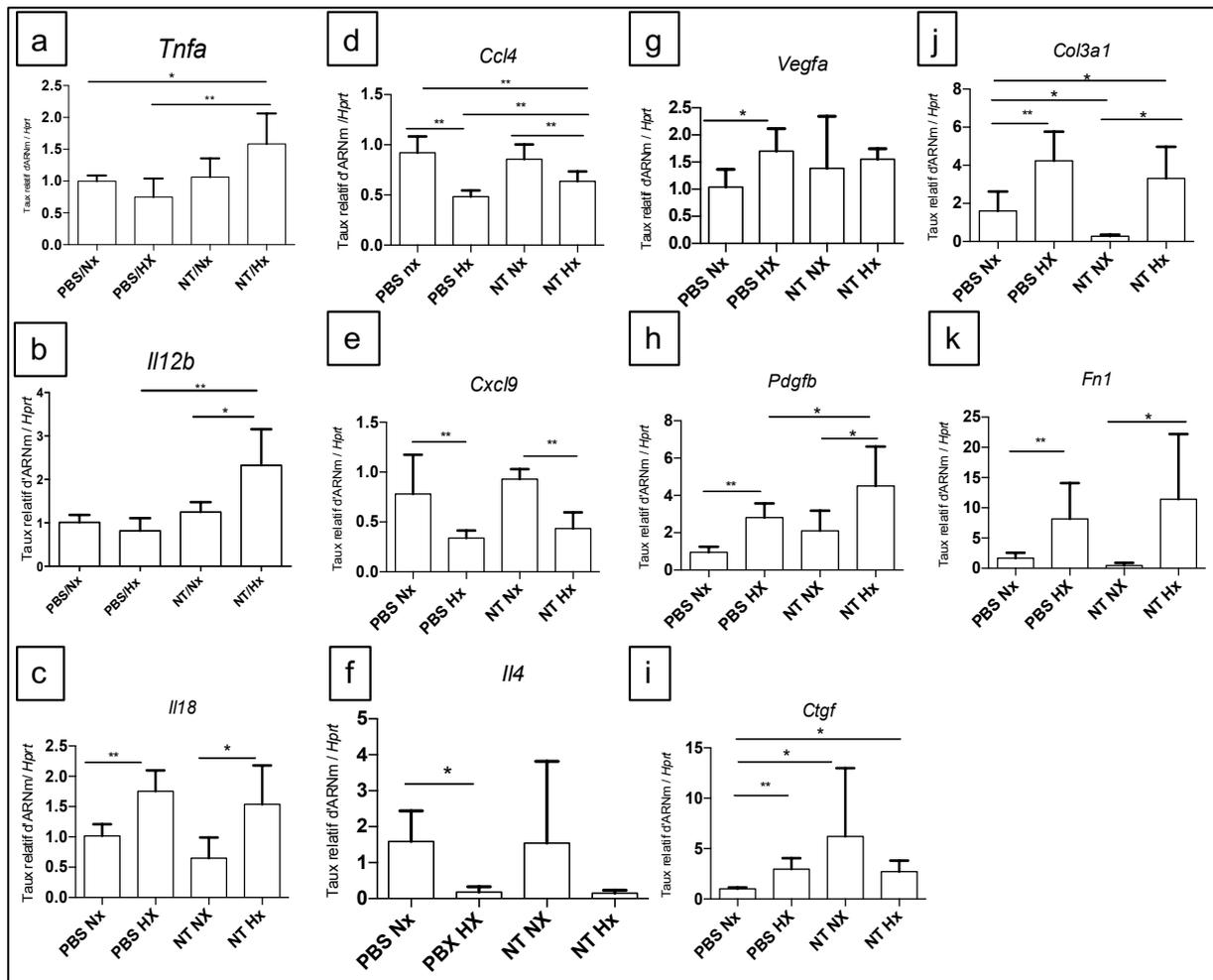


Figure 43 : Taux d'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation, et la fibrogénèse dans le modèle murin de granulomatose induite par les nanotubes de carbone.

Les taux d'ARNm sont mesurés par RT-qPCR à partir d'homogénats pulmonaires de souris ayant reçu une instillation de PBS sous normoxie (PBS Nx), de PBS sous hypoxie (PBS Hx), de NT sous normoxie (NT Nx), de NT sous hypoxie (NT Hx). Les gènes étudiés sont : a) *Tnfa*, b) *Il12b*, c) *Il18*, d) *Ccl4*, e) *Cxcl9*, f) *IL4*, g) *Vegfa*, h) *Pdgfb*, i) *ctgf*, j) *Col3a*, k) *Fn1*. Donnée représentée en moyennes et écart-types. * : $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (test de Mann Whitney). N=8 pour PBS NX, n=5 PBS HX, n=3 pour NT NX ; n=12 pour NT HX

2.2.4.2 Marqueurs associés à la fibrose

En Nx, l'instillation de NT ne modifiait pas l'expression de *Vegfa* par rapport aux souris PBS/Nx. L'hypoxie augmentait l'expression de *Vegfa* par rapport à la condition normoxique chez les souris PBS ($p < 0,05$) mais pas chez les souris exposées aux NT (Figure 43g).

En Nx, l'instillation de NT ne modifiait pas l'expression de *Pdgfb*. L'hypoxie augmentait l'expression de *Pdgfb* par rapport à la condition Nx, chez les souris PBS ($p < 0,01$). La double exposition NT/Nx augmentait l'expression de *Pdgfb*, par rapport aux souris NT/Nx ($p < 0,05$) et aux souris PBS/Nx ($p < 0,01$) (Figure 43h).

En Nx, l'instillation de NT augmentait l'expression de *Ctgf* par rapport à l'instillation de PBS ($p < 0,05$). L'hypoxie augmentait l'expression de *Ctgf* chez les souris PBS. De façon surprenante, la double exposition NT/Hx n'induisait pas l'expression de *Ctgf* de façon significative ((Figure 43i).

En Nx, les NT n'induisaient pas l'expression de gènes associés à la matrice extracellulaire (*Col3a1* et *Fnl*). Par contre, ces gènes sont fortement induits en réponse à l'hypoxie ($p < 0,01$). La réponse à une double exposition NT/Hx est similaire à celle de l'Hx seule (Figure 43j,k). Les similarités et différences entre le modèle P acnes et le modèle nanotubes sont récapitulées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : résumé de l'effet de l'hypoxie dans les deux modèles de granulomatose induite chez la souris.

		Modèle <i>P. acnes</i>			Modèle Nanotubes		
		Hx	PA	PA+Hx	Hx	NT	NT+Hx
Proportion de souris avec granulome		0	↗↗	↗	0	↗	↗↗
Proportion de souris avec fibrose pulmonaire		↗	0	↗	↗	0	↗↗
HIF-1 α dans le granulome		/	+	++	/	+	++
Inflammation	<i>Tnfa</i>	→	↗	↗	→	→	↗↗
	<i>Il12</i>	→	↗	↗	→	→	↗↗
	<i>IL18</i>	→	→	↗↗	↗	→	↗
	<i>Ccl4</i>	↘	↗	↘	↘	→	→
	<i>Cxcl9</i>	↘	↗	↘	↘	→	↘
	<i>Il4</i>	↘	→	↘	↘	→	↘
Fibrose	<i>Vegfa</i>	↗	→	↗	↗	→	→
	<i>Pdgfb</i>	↗	↗	→	↗	→	↗↗
	<i>Ctgf</i>	↗	→	↗	↗	↗	→
	<i>Col3a1</i>	↗	↗	↘	↗	↘	↗
	<i>Fnl</i>	↗	↗	↗	↗	→	↗

Effet de l'hypoxie (Hx) seule du *p acnes* (PA) des nanotubes (NT) en comparaison avec la condition normoxie PBS dans deux modèles murins de granulomatose induite par les NT ou le PA. Effet de la double exposition (PA+Hx) ou (NT+Nx) *versus* une des simples expositions. Augmentation en rouge, pas de modification en blanc et diminution par rapport à la condition contrôle. En rouge foncée augmentation de la double condition par rapport aux 2 autres simples expositions.

Discussion générale et perspectives

1. L'hypoxie et la sarcoïdose, un thème nouveau

Les facteurs intervenant dans l'initiation et la progression de la sarcoïdose notamment vers la fibrose sont mal compris. L'impact du facteur micro-environnemental hypoxique au cours de la sarcoïdose n'a jamais été étudié à la différence des pathologies tumorales (Petrova et al. 2018) ou dans d'autres maladies granulomateuses infectieuses comme la tuberculose (Prosser et al. 2017; Via et al. 2008) ou non infectieuses comme la maladie de Crohn (Cummins et Crean 2017). L'hypoxie tissulaire/cellulaire est d'une part liée au défaut de vascularisation du microenvironnement des cellules. Par exemple, au cours des tumeurs, la prolifération des cellules les éloigne progressivement des vaisseaux (Petrova et al. 2018) ; dans les granulomes tuberculeux, le centre nécrotique est en hypoxie profonde (Via et al. 2008), ou dans le cadre de la micro-anatomie de l'intestin dont la vascularisation présente un différentiel important de PO₂ entre les cryptes et les villosités. D'autre part, l'hypoxie est le résultat d'une augmentation de la consommation d'oxygène par les cellules hypermétaboliques tumorales ou inflammatoires. De plus, l'hypoxie et HIF semblent également intervenir dans la fibrogénèse d'autres pathologies fibrosantes du poumon comme la FPI (Tzouvelekis et al. 2007; Delbrel et al. 2018). Dans les granulomes pulmonaires de sarcoïdose, un défaut de vascularisation du cœur du granulome a pu être observé en microscopie optique et électronique ce qui suggère fortement que ces structures sont en hypoxie (Kambouchner et al. 2011; Soler et al. 1976). En effet il a été montré et ce, dans le cadre de tumeurs, que la PO₂ diminuait drastiquement en fonction de la distance à la vascularisation (Petrova et al. 2018). Une constatation intéressante a été d'observer qu'une minorité de granulomes interalvéolaires de petit diamètre et proches des capillaires sanguins ou des espaces alvéolaires (donc granulomes potentiellement peu hypoxiques) n'étaient pas associés à une couronne fibreuse (Kambouchner et al. 2011). L'hypothèse d'un granulome hypoxique est également étayé par la mise en évidence de la captation du ¹⁸F-MISO, élément réduit et séquestré en cas d'hypoxie profonde (<10mmHg) (Chakhoyan et al. 2017; Fleming et al. 2015) par les cellules de ganglions thoraciques ou de granulomes pulmonaires de patient atteints de sarcoïdose (Furuya et al. 2019). De plus, HIF-1 α a été mis en évidence au centre de granulomes pulmonaires et ganglionnaires ainsi qu'une de ses cibles, le VEGF (Talreja et al. 2019; Tzouvelekis et al. 2012).

A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au rôle de l'hypoxie au cours de la sarcoïdose. Pour tenter de répondre à l'effet de l'hypoxie, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de macrophages

dérivés de monocytes sanguin humains, et des modèles *in vivo* murins de granulomatoses induites par le PA ou les NT.

2. Justification des deux types d'expérimentations et des méthodes utilisées, avantages et limites.

Un bon modèle expérimental de sarcoïdose doit : reproduire les caractéristiques moléculaires et morphologiques humaines des granulomes ; reproduire son histoire naturelle de son initiation à sa résolution ou son évolution progressive ; tester divers antigènes suspectés comme pouvant être facteurs causaux dans la sarcoïdose et tester les différentes thérapies possibles ; être capable de représenter les divers phénotypes de la maladie ; et pouvoir être reproduit facilement à faible coût pour faciliter la multiplication de résultats. Toutefois, en raison de sa complexité et de l'absence de cause connue, la sarcoïdose est un véritable défi pour créer un bon modèle. J'ai participé à la rédaction de trois revues sur les modèles de granulomatoses utilisés pour modéliser la sarcoïdose (Jeny et al. 2016; Besnard et Jeny 2020; Jeny et Grutters 2020), (figurant en annexe 0 à 3). Les buts de ces revues étaient de présenter les divers modèles, leurs avantages et inconvénients et comment ont-ils contribué à la compréhension et aux approches thérapeutiques de la sarcoïdose. Enfin, des orientations futures étaient également proposées afin de surmonter les limites des modèles actuels.

2.1 Modèle *in vitro*

2.1.1 Choix du type de cellules

Nous avons fait le choix d'utiliser des macrophages dérivés de monocytes sanguins plutôt que des macrophages alvéolaires pour plusieurs raisons :

- De nombreux arguments permettent de penser que les macrophages dérivés de monocytes sanguins sont les cellules constituant les granulomes plutôt que les macrophages alvéolaires résidents comme présenté dans le chapitre de l'introduction (2.3.1.1.2). Les PBMCs de patients ont par ailleurs été utilisés avec succès dans des modèles *in vitro* de granulome après culture avec des peptides ou microparticules de mycobactérie couplées ou non à des billes (Crouser et al. 2017; Zhang et al. 2020) ou dans des modèles de granulomes 3D sur « poumons-sur-puce » (*lung on a chip*) (Calcagno et al. 2021), et se sont révélés être pertinents pour l'étude de la sarcoïdose, mettant en évidence une modulation de certaines voies de signalisation (voie de l'IL13,

mTOR par exemple) (Locke, Schlesinger, et Crouser 2020; Crouser, Locke, et al. 2020).

- Il aurait bien sûr été intéressant d'étudier les cellules collectées lors du LBA comprenant non seulement des macrophages résidents mais également des macrophages dérivés de monocytes, dont le phénotype est différent des cellules périphériques au cours de la sarcoïdose (Grunewald 2019). Ces cellules sont moins accessibles que les cellules périphériques et ne représenteraient principalement que des patients dont la maladie est active et récente, le LBA étant principalement réalisé au diagnostic. Les macrophages présents dans les alvéoles sont par ailleurs probablement moins exposés à l'hypoxie que les macrophages constituant les granulomes.

Afin d'étudier la réponse locale pulmonaire nous avons réalisé sur des granulomes pulmonaires de biopsies pulmonaires chirurgicales des analyses immunohistochimiques de HIF-1 et une de ses cibles PAI-1.

2.1.2 Critère de l'activité pulmonaire

Comme vu précédemment dans le chapitre 1.5 de l'introduction, l'activité de la maladie est difficile à définir. Nous avons utilisé un score d'évaluation de l'activité pulmonaire aCTAS qui a été validé par deux équipes (Benamore et al. 2016; Duan et al. 2018). Ce score est bien corrélé à la réponse au traitement évalué par la CVF. La réponse au traitement étant également un marqueur important d'activité dans la sarcoïdose. Nous avons choisi un seuil de aCTAS \geq 2 en raison des données de Benamore et al. Dans notre travail les patients classés avec une forte activité pulmonaire (AS) (aCTAS \geq 2) présentaient un taux d'ECA sérique plus importante, une fonction respiratoire plus altérée et un traitement était introduit plus fréquemment. Ces éléments confortent la classification par l'aCTAS. Un point fort également de notre étude a été d'obtenir des prélèvements de patients ne recevant aucun traitement pouvant modifier le profil inflammatoire des cellules.

2.1.3 Conditions de cultures

Nous avons choisi d'utiliser du M-CSF à des doses (5ng/ml) équivalentes aux doses retrouvées dans le sérum de sujets sains (Morishita et al. 2008). Le M-CSF a été utilisé plutôt que le GM-CSF. En effet le M-CSF est une cytokine homéostatique exerçant un rôle sur la prolifération, et la différenciation et est généralement utilisée *in vitro* pour différencier les monocytes sanguins humains en macrophages. Contrairement au M-CSF, qui est exprimé de manière

constitutive dans la circulation, le GM-CSF est exprimé à de faibles niveaux dans la circulation en condition homéostatique. Le GM-CSF est augmenté dans les tissus en condition inflammatoire (Ushach et Zlotnik 2016). De plus, ils ont des effets opposés ; le GM-CSF exerce une stimulation pro-inflammatoire plus forte sur les macrophages que le M-CSF ; la polarisation induite est plutôt de type M1 par le GM-CSF et M2 pour le M-CSF (Trus, Basta, et Gee 2020). Les macrophages induits par le GM-CSF sont plus différenciés et ressemblent d'avantage à des macrophages résidents et ceux par le M-CSF plus représentatifs de l'hétérogénéité des macrophages (Akagawa et al. 2006). Par conséquent nous voulions travailler sur des macrophages dérivés de monocytes capables d'être des macrophages ubiquitaires dans des conditions plus homéostatiques et physiologiques (Mosser, Hamidzadeh, et Goncalves 2021).

2.1.4 Niveaux d'oxygénation

Les niveaux d'oxygénation auxquels sont exposées les cellules immunitaires est difficile à déterminer puisqu'il existe de grandes variations du niveau d'O₂ dans les vaisseaux, lors de leur migration à travers des tissus inflammatoires et au sein des granulomes (Keeley et Mann 2019). Néanmoins la captation du ¹⁸F-MISO dans les granulomes indiquerait que le centre des granulomes sarcoïdiens est fortement hypoxique (<10mmHg). Avec une FiO₂ à 1,5% ce qui correspond dans le milieu de culture à une PO₂ de 40mmHg (Gille 2011). Par contre la PO₂ au niveau cellulaire est probablement plus basse, comme illustré par le marquage positif au pimonidazole en immunofluorescence (figure 1 de l'article ci-dessus). En revanche le niveau de 21% d'O₂ correspond à des niveaux d'hyperoxie (PO₂ dans le milieu de 150mmHg) (Gille 2011) auxquels ne sont pas exposées les macrophages interstitiels. Néanmoins les modèles de culture cellulaire classiquement étudiés dans la sarcoïdose sont réalisés en 21%, et la mesure péricellulaire des macrophages cultivés en 21% est plutôt de l'ordre de 40mmHg (Keeley et Mann 2019).

2.2 Modèles in vivo

Les modèles *in vivo* de granulomatoses induites permettent d'étudier de façon plus globale le granulome et son environnement, ainsi que les différentes phases constituant son évolution. Il n'existe par contre pas de modèle animal spontané de sarcoïdose utilisable et pas de modèle animal permettant de répliquer la diversité de cette maladie polygénique. De plus les modèles utilisés sont représentatifs d'une atteinte pulmonaire unique et pas d'une maladie systémique.

Dans notre travail tel qu'il est exposé ci-dessus, dans les conditions actuelles, la taille des effectifs pour chaque groupe expérimental présente une variabilité due à des problèmes de mortalité lors des instillations intra-trachéales et rendent encore incertains les résultats. Par ailleurs, la présence de granulomes n'a été définie que sur de simples critères histologiques, sans immunomarquage permettant de confirmer l'identité des populations cellulaires présentes.

2.2.1 Modèle lié au *P.acnes*, avantages et inconvénients

Les modèles liés au PA, ont l'avantage d'utiliser un antigène suspecté comme facteur causal au cours de la sarcoïdose, certains modèles *in vivo* utilisent d'ailleurs des souches de PA issus de ganglions de patients (Minami et al. 2003; Werner et al. 2017; Yorozu et al. 2015). Nous avons utilisé la souche bactérienne la plus utilisée dans la littérature et plus facilement accessible (ATCC 6929) (Kishi et al. 2011; Jiang et al. 2016; McCaskill et al. 2006). Un désavantage de la sensibilisation effectuée dans ce modèle est que le mécanisme de formation des granulomes peut se rapporter à celui des pneumopathies d'hypersensibilité. Le protocole pour le modèle induit par PA utilisé dans ce travail a suivi plusieurs optimisations, aboutissant au protocole utilisant : l'adjonction de CFA lors de la sensibilisation, des instillations répétées intra-trachéales de PA et une dose plus élevée de PA à 800µg (*vs* 400 µg). Pour le modèle induit par PA, l'adjonction de CFA lors de la sensibilisation, a permis d'augmenter la fréquence des granulomes par rapport aux souris sensibilisées sans adjuvant, et une augmentation du nombre de granulomes par rapport à l'adjuvant incomplet. Cet adjuvant a été utilisé dans les protocoles de Nishiwaki, Iio et Minami (Nishiwaki et al. 2004; Iio et al. 2010; Minami et al. 2003). Dans l'étude d'Iio, l'adjonction du CFA a permis d'obtenir des granulomes ayant une morphologie plus mature (Iio et al. 2010). Il est reconnu que le CFA par rapport à l'IFA, permettrait une activation des lymphocytes CD4+ vers un phénotype Th1, ce qui expliquerait sa plus grande efficacité pour induire des modèles inflammatoires basé sur ce phénotype (Billiau et Matthys 2001). Par contre, sachant que les mycobactéries peuvent induire une granulomatose, l'utilisation du CFA rend ce modèle de granulomatose moins spécifique d'une réaction immunitaire spécifique aux antigènes de PA. Il faut noter pour ce modèle l'absence de survenue de granulome par l'adjonction seule de CFA.

Une autre modification a été l'ajout d'un challenge par PA 15 jours, après le premier. Le principe de favoriser la mémoire antigénique et donc la réponse inflammatoire par l'administration répétée du même antigène a été testée par Jiang (Jiang et al. 2016). Cette

répétition des challenges effectués à 15 jours d'intervalles a permis d'augmenter le nombre de granulomes et leur taille, leur persistance dans le temps et leur évolution vers la fibrose. Les différentes études ayant utilisé du PA pour induire une granulomatose pulmonaire présentent une grande variabilité dans les protocoles concernant le mode d'administration (SC, IV, IT), la présence ou non d'adjuvant et son type (IFA, CFA), la dose, la souche, le traitement du PA (inactivé, vivant), le nombre de challenges, la date du sacrifice... Ceci reflète sans doute les difficultés des équipes à « optimiser » leur protocole, et suggère le manque de reproductibilité du modèle d'un centre/animalerie à l'autre.

2.2.2 Modèle lié aux nanotubes avantages et inconvénients

Le modèle induit par les **nanotubes de carbone**, a été reproduit avec le même protocole que l'équipe de Huizar (Huizar et al. 2011), avec une pénétrance de 50% en condition normoxique. Ce modèle a été utilisé dans plusieurs publications. Il partage des similarités transcriptionnelles avec les macrophages alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose ou une déficience de PPAR γ (Barna et al. 2016; Mohan et al. 2018). Le désavantage principal de ce modèle est qu'il peut être assimilé à une granulomatose à corps étranger (Locke, Schlesinger, et Crouser 2020). De plus, la mortalité liée à l'instillation de nanotubes de carbone, ayant tendance à s'agglomérer, rendent cette technique délicate. Enfin, en immunohistochimie, la coloration noire associée à la transformation du substrat DAB par la peroxydase est parfois difficile à distinguer des nanotubes de carbone. L'utilisation d'anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline (marquage rouge) ou couplés à des molécules fluorescentes permettraient d'améliorer l'analyse des coupes histologiques.

2.2.3 Exposition à l'hypoxie des modèles murins

Nous avons exposé à l'hypoxie les souris sous conditions hypobariques avec une pression de 375 mmHg (correspondant à une altitude de 5570 mètres, ou équivalent d'une FiO₂ à 10% en condition normobarique). En effet, la petite taille des granulomes selon les données de la littérature ne laissait pas présager un centre hypoxique du granulome hypoxique. L'immunomarquage HIF-1 α est une méthode qualitative ne permettant pas d'évaluer avec précision le statut hypoxique des tissus, puisque HIF-1 α peut être induit en normoxie. Une autre méthode serait nécessaire pour confirmer la présence d'une hypoxie tissulaire, notamment par l'injection de pimonidazole avant le sacrifice des souris. Le pimonidazole permettrait de

localiser les zones d'hypoxie sévère. D'autre part, il pourrait être intéressant d'étudier chez nos modèles l'impact de l'hypoxie sur le métabolisme grâce à des imagerie isotopique de type NanoPET au Fluor18, notamment en développant une collaboration avec la plateforme FRIM- (Fédération de recherche en imagerie Multimodalité) UMS34 de l'Université Paris Diderot-Paris 7.

3. Discussion du modèle in vitro chez l'homme à partir de monocytes circulants

Notre étude in vitro a pu montrer que l'hypoxie induisait un profil à la fois proinflammatoire et profibrotique, une modulation de la phagocytose et de la présentation antigénique des macrophages dérivés des monocytes (hMDMs) et ce de façon plus marquée pour les cas de sarcoïdose classés comme de forte activité AS. Ceci était accompagné par une activation de HIF-1 plus importante. Ces différents points sont d'ailleurs résumés dans ce Tableau 9 (également présenté dans l'article 1).

Tableau 9: Résumé de l'impact de l'hypoxie sur plusieurs fonctions du macrophage

		Témoins	IS	AS
HIF-1	HIF expression	+	+	+
	HIF-1 activation	↗	↗	↗↗
Phagocytose et présentation antigénique	Phagocytose/CD36	↘	→	→
	CD80	↘	→	↘
	CD86	↘	→	↘
	HLA-DR	→	↘	↘
Inflammation †	CXCL8	→	→	↗
	TNF- α	→	→	↗↗
	IL-1 β	→	→	↗↗
	IL-18	→	→	↗
	IL-5	↗	→	↗
	IL-10	→	→	↘
	NF- κ B activation	→	→	↘
Fibrose †	TGF- β 1	→	→	↘ (*)
	PDGF-BB	↗	→	↗
	PAI-1	↗	↗	↗↗
	VEGF-A	→	→	↗
Mobilité des fibroblastes**	Refermeture de "plaie" calibrée par NHLF	↘	↘	↘↘

(Les résultats en normoxie ne sont pas indiqués car les différences entre les témoins et les groupes de patients ont été jugées peu informatives). En blanc : aucune différence avec l'état normoxique apparié ; en bleu (foncé et clair) : diminution par rapport à l'état normoxique apparié ; en rouge (foncé et clair) : augmentation par rapport à l'état normoxique apparié. En rouge foncé ou bleu : l'état est significativement différent des autres groupes de patients ; † résultats pour les cytokines exprimés en concentrations dans les milieux conditionnés ; * Notez que dans l'état

hypoxique, les niveaux de TGF- β 1 ont eu tendance à être plus élevés dans la sarcoïdose active que chez les témoins ($p=0,06$). **La réduction de la motilité des fibroblastes, telle qu'évaluée par le test de fermeture du NHFL, est un indicateur de l'immobilisation des fibroblastes. Sarcoïdose de forte activité pulmonaire (AS) et sarcoïdose pulmonaire de faible activité ou inactive (IS)

3.1 Modulation de l'expression et de l'activité de HIF, facteurs explicatifs ?

De façon inattendue, nous avons observé en immunofluorescence une forte expression de HIF-1 α à la fois nucléaire et cytoplasmique dans les hMDMs de patients et témoins en normoxie et sans différence avec les conditions hypoxiques alors que HIF-1 α est habituellement dégradé dans le protéasome en condition normoxique.

Talreja *et al.* ont également retrouvé HIF-1 α en normoxie dans les monocytes et les macrophages alvéolaires (Talreja et al. 2019) mais ont observé un niveau d'expression plus élevé de HIF-1 α par western Blot et cytométrie de flux au cours de la sarcoïdose par rapport aux témoins (Talreja et al. 2019). Dans notre étude, aucune différence n'était détectable entre les patients atteints de sarcoïdose et les témoins en immunofluorescence qui est une technique plus qualitative que quantitative. En évaluant l'activation de HIF-1 plutôt que l'expression, nous n'avons également pas retrouvé de différence entre les témoins et sarcoïdose AS et IS. Divers facteurs pourraient expliquer la présence de HIF-1 α en normoxie dans les monocytes-macrophages, par augmentation de leur transcription ou traduction ou via des mécanismes post traductionnels (cf chapitre 3.2.1.1). Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β , la voie NF- κ B (Lin et Simon 2016; Palazon et al. 2014), la voie mTOR (Weichhart, Hengstschläger, et Linke 2015), les espèces réactives à l'oxygène et MAPK (Lin et Simon 2016; Palazon et al. 2014), ou STAT3 peuvent contribuer au maintien de l'expression de HIF-1 α .

Contrairement à Talreja et al. (Talreja et al. 2019) qui ont réalisé leur analyse sur des cellules fraîchement prélevées et influencées par l'environnement cytokinique pro-inflammatoire des patients, nous avons utilisé des hMDMs après 10 jours de culture. Il est possible également que le M-CSF connu pour induire une translocation nucléaire de l'HIF-1 α en hypoxie (Fangradt et al. 2012) ou que l'activation par le plastique de la boîte de culture aient pu modifier l'expression de HIF.

Par contre, nous avons observé une augmentation de l'activation de HIF-1 en hypoxie plus importante pour les cas de sarcoïdose AS et ce malgré 10 jours de culture. Une hypothèse serait que des mécanismes épigénétiques ou des ARN non codants aient pu moduler l'expression, la stabilisation de HIF et son activation (Watson et al. 2010, 201; Choudhry et Harris 2018) dans les formes de sarcoïdose AS. Inversement, l'hypoxie influence les facteurs épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, et affecte profondément

l'expression de nombreuses classes d'ARN non codants (Watson et al. 2010, 201; Choudhry et Harris 2018). Des études récentes suggèrent une association avec le pronostic de facteurs épigénétiques et de la signature des micro-ARN avec le pronostic dans la sarcoïdose (Yang et al. 2019; Ascoli et al. 2017). On pourrait faire l'hypothèse que chez les patients présentant une sarcoïdose AS, avec une fonction respiratoire plus altérée et des granulomes plus florides, les cellules de l'immunité soient plus confrontées à un environnement hypoxique et inflammatoire pouvant induire également des modifications épigénétiques (Brigati et al. 2010).

Une limite de notre étude est l'absence d'étude de l'activation de HIF-2 α alors que son expression semble différente entre les deux groupes (cf Figure 28). Talreja et al. ont montré que HIF-2 α était principalement exprimé dans les macrophages alvéolaires mais peu dans les monocytes sanguins. D'autre part, l'inhibition de HIF-2 α n'avait pas d'effet sur l'expression de l'IL-1 β ou l'IL-17 contrairement à HIF-1 α (Talreja et al. 2019).

3.2 Effet de l'hypoxie sur le phénotype sécrétoire des hMDMs, implication de HIF ?

Une limite de l'étude est l'absence de l'étude de l'imputabilité de HIF-1 α sur la modification du phénotype du macrophage en hypoxie. Est-ce que HIF-1 α est responsable du profil pro-inflammatoire et profibrotique du macrophage en hypoxie. Cependant, plusieurs cibles de HIF porteuses d'un domaine HRE comme le *VEGF*, *TGF β 1* ou la protéine PAI-1 avaient un niveau d'expression significativement plus augmenté en hypoxie dans les cas de sarcoïdose AS. Les cytokines pro-inflammatoires TNF α , ou IL1 β connues pour être impliquées dans la pathogénie de la sarcoïdose (Grunewald et al. 2019; Huppertz et al. 2020) ou CXCL8 (médiateur de l'immunité innée, favorisant l'attraction de neutrophiles et de macrophages et leur pouvoir de phagocytose) étaient augmentées par l'hypoxie, en particulier dans la sarcoïdose AS ; ces cytokines induites par l'hypoxie dans les macrophages pouvaient donc l'être directement par l'intermédiaire de HIF (Lewis et Elks 2019; Fang et al. 2009).

NF- κ B, une autre voie intervenant dans l'inflammation et régulée par l'hypoxie ne semble pas, dans nos travaux, être impliquée dans la modification inflammatoire ni dans l'activation de l'HIF dans l'hypoxie. Au contraire, l'activation du NF- κ B (sous-unités p65 et p50) était diminuée dans les formes de sarcoïdose AS, et il a été démontré que HIF-1 pourrait avoir un rétrocontrôle négatif sur NF- κ B (D'Ignazio, Bandarra, et Rocha 2016; Bandarra et al. 2015).

3.3 Effet de l'hypoxie sur la phagocytose et la présentation antigénique

Nous avons cherché à savoir si l'hypoxie pouvait moduler la phagocytose et la transformation/présentation des antigènes, qui sont des étapes initiales clé dans l'initiation des mécanismes pro-inflammatoires. Dans notre étude, la phagocytose était maintenue ainsi que l'expression du récepteur impliqué dans la phagocytose CD36 en hypoxie en cas de sarcoïdose AS ou IS, mais diminuée chez les témoins.

Dans d'autres travaux portant sur la sarcoïdose, il a été montré une augmentation de l'activité phagocytaire mais également une augmentation des voies de signalisation associées à la phagocytose et aux phagolysosomes (Talreja et al. 2017; Pettersen, Johnson, et Osen 1990; Silva et al. 2013; Crouser, Locke, et al. 2020). Cependant, la conséquence exacte d'une augmentation de la phagocytose au cours de la sarcoïdose n'est pas élucidée. Dans une étude portant sur l'analyse transcriptomique de monocytes de patients atteints de sarcoïdose, l'expression des gènes relatifs à la phagocytose et à l'activité lysosomale était augmentée, en revanche il existait une régulation négative des gènes impliqués dans la dégradation par le protéasome (Talreja et al. 2017). Il pourrait ainsi exister une accumulation de produits de dégradation phagocytaire intracellulaire pouvant causer une inflammation persistante et perturbant l'homéostasie cellulaire (Talreja et al. 2017). Ces résultats sont en lien direct avec les données d'analyse génétique familiale d'Alain Calender et coll. concernant des anomalies génétiques des gènes impliqués dans l'autophagie (Calender et al. 2019).

L'effet de l'hypoxie sur la phagocytose dans la sarcoïdose pourrait passer par HIF-1. Anand et al. ont montré une augmentation de l'activité de la phagocytose sur des macrophages de souris en hypoxie de façon dépendante de HIF-1 α (Anand et al. 2007). De même l'augmentation de CD36 sur une lignée humaine de macrophage était médiée par HIF-1 α en hypoxie et associée à une augmentation de la phagocytose (Ortiz-Masià et al. 2012). CD36 pourrait être également impliqué dans la fusion des macrophages pour former des cellules géantes multinucléées (Helming, Winter, et Gordon 2009).

Dans notre étude l'hypoxie diminuait considérablement les marqueurs de co-stimulation CD80 et CD86 du lymphocyte T, et la molécule de présentation antigénique HLA-DR. La diminution de CD80 et CD86 en hypoxie était moins marquée pour les cas de sarcoïdose IS et ces derniers présentaient une augmentation en normoxie de l'HLA-DR. L'hypoxie agirait notamment dans les formes actives en diminuant la capacité du macrophage à activer le lymphocyte T ce qui laisserait entendre que les zones propices à l'activation initiale pourraient être normoxiques, à distance de la zone de constitution des granulomes. Nous avons rapporté dans le chapitre 2.3.3

que la pérennisation du granulome pourrait être paradoxalement liée à une réponse immunitaire inefficace avec un épuisement de la réponse T. Celle-ci pourrait être aggravée par un défaut d'activation des cellules présentatrices d'antigènes. De façon similaire, il a été démontré que l'hypoxie diminuait l'expression de CD80 sur les macrophages de souris ou de CD80, CD86 et le CMH de classe II sur les cellules dendritiques humaines, ce qui réduirait leur capacité à déclencher des réponses immunitaires adaptatives efficaces (Lahat et al. 2003; Mancino et al. 2008).

3.4 Effet de l'hypoxie sur le profil pro-fibrotique des macrophages.

Dans notre étude nous avons montré que l'hypoxie augmentait la sécrétion par les hMDMs de cytokines pro-fibrosantes (VEGF, PDGF) et de manière plus marquée pour PAI-1 dans les formes de sarcoïdose AS.

Comme rapporté dans le chapitre 2.3.4.1 le rôle du TGF β 1 paraît complexe au cours de la sarcoïdose. Certaines études montrent qu'il est associé à des formes résolutives car agissant comme une cytokine anti inflammatoire. Dans notre travail, nous avons montré que l'hypoxie diminuait la sécrétion par les hMDMs de TGF β 1 uniquement pour les AS avec un profil similaire à celui d'IL-10. Un élément intéressant était la présence en normoxie d'une réserve de TGF β 1 sous forme latente plus importante dans les formes de sarcoïdose AS. Une hypothèse pourrait être un défaut de clivage de la LAP (*latency-associated peptide*), ce qui freinerait la réponse anti inflammatoire. Par exemple PAI-1 est une cytokine qui inhibe l'activation du TGF β -1 par son activité anti plasminogène (Lyons et al. 1990; Otsuka et al. 2006).

Nous avons étudié l'effet du milieu conditionné des hMDMs exposés à l'hypoxie ou à la normoxie sur des fibroblastes pulmonaires humains. Les différents milieux n'avaient pas d'effet sur la prolifération des NHLF ou leur différenciation en myofibroblastes. En revanche la mobilité des fibroblastes normaux humains d'origine pulmonaire (NHLFs) était significativement diminuée lorsque ces cellules étaient exposées à un milieu provenant de hMDMs en condition « hypoxique » et surtout en cas de sarcoïdose AS en raison de la présence de PAI-1.

PAI-1, est le principal inhibiteur des activateurs du plasminogène et joue un rôle clé dans le développement de la fibrose pulmonaire. L'inhibition de l'activité du PAI-1 permet la dégradation du collagène par activation des MMP et la réduction du dépôt de la matrice fibrotique dans ces organes (Flevaris et Vaughan 2017). Dans la sarcoïdose, il a été mis en évidence dans le lavage bronchoalvéolaire une diminution de l'activité fibrinolytique et une

augmentation du niveau de PAI-1 (C Lardot Y Sibille B Wallaert C Hermans D Lison 1999; Hasday et al. 1988). D'autres études ont montré que PAI-1 diminuait la mobilité cellulaire (Zhong et al. 2014; Lazar et al. 2004) par sa liaison à la vitronectine connue pour entraver l'adhérence et la migration des cellules (Stefansson et Lawrence 1996). L'inhibition de la migration des cellules par PAI-1 peut être bénéfique dans les maladies cardiaques ou entraîner un défaut de réparation et une fibrose dans des modèles murins de fibrose pulmonaire (Zhong et al. 2014; Lazar et al. 2004). Le défaut de migration des fibroblastes pourrait expliquer l'organisation périphérique en couronne concentrique de fibrose autour des granulomes. PAI-1 exprimé et sécrété par les cellules épithélioïdes au centre du granulome pourrait immobiliser et séquestrer les fibroblastes, ici pulmonaires, autour du granulome.

4. Modèles *in vivo*, comment ces résultats préliminaires complètent ce qui a été observé *in vitro*

4.1 Effet de l'hypoxie sur la présence de granulomes et l'inflammation

Dans le modèle à PA une tendance vers une diminution de la fréquence des granulomes était observée en hypoxie. Cette diminution pourrait éventuellement s'expliquer par la diminution de l'expression des cytokines *Ccl4* et *Cxcl9*, en condition hypoxique, cytokines impliquées respectivement dans le recrutement monocyttaire (Barczyk et al. 2014) et lymphocytaire (Nishioka et al. 2007).

Dans le modèle à nanotubes de carbone NT, on notait une proportion de souris atteintes de granulomatose plus importante dans le groupe NT/Hx que dans le groupe NT/Nx (86% vs 50%). Cependant le nombre de granulomes par souris et leur taille n'étaient pas modifiés par l'exposition à l'hypoxie. L'étude transcriptionnelle a montré chez les souris NT/Hx une augmentation de l'expression du *Tnfa*, de l'*Il12b* et de l'*Il18*. Le $TNF\alpha$ est une cytokine majeure, impliquée dans le développement de la granulomatose induite par les NT (Huizar et al. 2011) et également dans la sarcoïdose, via l'activation et le recrutement de macrophages, ainsi que leur différenciation en cellules épithélioïdes et géantes multinucléées. L'*Il-12b* et l'*Il-18* sont également impliquées dans l'activation du lymphocyte $CD4^+$ vers un phénotype $Th1$ et vers une sécrétion d' $IFN\gamma$ (Shigehara et al. 2001). Ainsi l'augmentation de ces 3 cytokines, en situation hypoxique pourrait expliquer cette granulomatose plus importante.

Bien que la réponse de ces deux modèles de granulomatose à l'hypoxie présente certains points communs (augmentation de *Tnfa*, *Il12b*, *Il18* et diminution de *Cxcl9* et *Ccl4*), ils se distinguent par le fait que l'hypoxie semble augmenter la proportion de souris avec granulomes dans le

modèle NT, mais le diminuer dans le modèle PA (sous réserve d'un nombre de souris testées encore trop faible dans certains groupes expérimentaux). Cette différence pourrait venir en partie de l'importance relative des cytokines CXCL9 et CCL4 dans ces modèles. L'implication de CXCL9 dans la sarcoïdose a été montrée sur l'élévation de sa concentration dans les LBA dans les formes précoces de sarcoïdose (Nishioka et al. 2007) (stade I), mais cette élévation disparaît dans des formes plus chroniques (stade II et III) (Busuttill et al. 2009). De même, l'implication de CCL4 a été montrée sur des LBA de patients ne présentant pas d'atteinte fonctionnelle respiratoire. Or le modèle de granulomatose induite par PA est réversible et court (15 jours si un seul challenge, 70 jours si plusieurs challenges), comparé à celui utilisant des nanotubes de carbone (persistance des granulomes et des nanotubes après 90 jours). On peut supposer que les cytokines CXCL9 et CCL4 dont l'expression est réduite en hypoxie sont particulièrement importantes dans la phase initiale du développement d'une granulomatose secondaire à un antigène relativement fugace (comme PA), mais qu'elles seraient moins cruciales dans le cadre d'une granulomatose face à des antigènes persistants, tels que les nanotubes. Cette hypothèse pourrait par exemple être testée en traitant les souris PA en hypoxie par un agoniste des récepteurs de CXCL9 et CCL4 et vérifier l'augmentation des granulomes.

4.2 Hypoxie et fibrose

L'hypoxie seule dans notre étude était associée dans nos modèles expérimentaux chez la souris à une fibrose sous pleurale et focale constituée d'infiltrat inflammatoires (macrophages), de dépôts de collagène en sous pleural. Des dépôts de collagène au niveau des infiltrats inflammatoires des espaces périfonchovasculaires et au sein des granulomes (indifféremment de la condition, en normoxie ou en hypoxie) étaient présents dans les groupes PA et NT. De façon intéressante la double exposition aux NT et à l'hypoxie semble augmenter la proportion de souris développant de la fibrose, et ceci est accompagné d'une augmentation en hypoxie des transcrits ARNm des gènes de la matrice extracellulaire (*Fnl*, *Col3a1*) et de facteurs profibrosants tel que le *Pdgfb*. Cette topographie de fibrose au sein du granulome et de localisation sous pleurale s'éloigne néanmoins de celle observée au cours de la sarcoïdose.

La présence de fibrose a été décrite dans le modèle induit par 2 challenges de PA (Jiang et al. 2016), ainsi que dans le modèle par instillation de NT (Mercer et al. 2011). Cependant, à notre connaissance, la description de zones de fibrose sous pleurale focale en rayon de miel n'a jamais été évoquée dans ces deux modèles.

4.3 Expression de HIF-1 α dans les modèles murins

De façon intéressante, et de façon similaire à l'étude *in vitro* la présence du facteur de transcription HIF-1 α , détecté par immunomarquage, a été observée comme attendu chez les souris en hypoxie, mais également chez les souris en normoxie traitée par NT et PA.

Au sein des granulomes des souris en normoxie, un immunomarquage d'HIF-1 α a été détecté préférentiellement dans les macrophages comme lors de l'examen des biopsies pulmonaires. Les diamètres des granulomes chez la souris étant inférieurs à 150 μ m, une hypoxie tissulaire semble moins probable, contrairement à l'hypothèse que l'on peut envisager d'une stabilisation d'HIF-1 α par d'autres mécanismes sus cités, comme le TNF α .

Les lésions de fibrose sous pleurale que nous avons observées présentaient également un immunomarquage cellulaire d'HIF-1 α a priori au niveau des macrophages. La présence de ces lésions histologiquement importantes pourrait être à l'origine d'une hypoxie tissulaire locale, responsable de l'expression d'HIF-1 α . La stabilisation de l'HIF-1 α pourrait être associée au phénomène de fibrogénèse, notamment par le biais d'une activation du TGF β 1, puissant inducteur de fibrose, qui peut réciproquement activer HIF-1 α par l'inhibition de PHD (Roth et Copple 2015). Dans notre modèle, les macrophages HIF-1 α pourraient participer au processus fibrosant du fait de leur capacité à sécréter des facteurs profibrosants (PDGF-BB) (Roth et Copple 2015).

5. Perspectives

5.1 Perspectives concernant le modèle *in vivo*

Les perspectives des modèles *in vivo* dont les données sont encore préliminaires sont pour le moment des perspectives à court terme. Nous allons possiblement concentrer la poursuite de nos travaux sur le modèle induit par les nanotubes de carbone NT dont la maîtrise et l'obtention de granulomes étaient plus aisées que pour le modèle PA. Les groupes témoins de souris en normoxie vont être complétés pour l'analyse complémentaire histologique, immunohistochimique et transcriptionnelle. Il sera également nécessaire d'étudier les populations cellulaires constituant les réactions inflammatoires et granulomateuses notamment par immunohistochimie ou cytométrie sur prélèvements de tissus entiers. L'étude des phénotypes des populations lymphocytaires et des marqueurs d'activation macrophagiques sous l'effet des nanotubes et de l'hypoxie est envisagée.

Nous confirmerons les résultats retrouvés en RTqPCR par des techniques de type ELISA pour les cytokines de type TNF α , IL-12 β et PDGF-BB sur tissus entier et/ou LBA. Nous confronterons également les résultats de l'étude *in vitro* avec l'étude de PAI-1 dans ce modèle par ELISA et immunohistochimie.

Si dans le modèle NT nous confirmons que l'hypoxie aggrave l'inflammation granulomateuse et la fibrose, nous pourrions nous servir de ce modèle afin d'étudier d'autres voies de signalisation récemment identifiées comme impliquées dans la sarcoïdose (inflammasome, mTOR, JAK-STAT) et leur lien/interaction avec l'hypoxie et HIF. Nous pourrions utiliser des modèles de souris transgénique invalidées pour HIF-1 α (hétérozygote) afin d'étudier l'impact de HIF-1 α sur la formation du granulome, les marqueurs d'inflammation et du granulome. Le modèle nanotube pourrait permettre de tester l'efficacité de molécules inhibant HIF-1 ou PAI-1.

5.2 Perspectives concernant le modèle *in vitro*

L'hypoxie est responsable de modifications du métabolisme cellulaire du macrophage. Nous pourrions étudier les conséquences de l'hypoxie sur le métabolisme du macrophage (glycolyse, phosphorylation oxydative, oxydation des acides gras) et l'intégration notamment des autres voies de signalisation de type mTOR, PPAR γ (Wilson, Mayr, et Weichhart 2019) à ces modifications métabolique. L'étude de l'inhibition de HIF (par si-RNA par exemple) en hypoxie pourrait nous permettre d'étudier son implication dans les différentes modulations des fonctions biologiques macrophagiques observés dans notre travail mais également les interactions existantes entre hypoxie/HIF et voies de l'inflammasome, JAK-STAT, mTOR notamment dans des formes sévères de sarcoïdose.

Il est important d'étendre l'étude de l'effet de l'hypoxie aux autres populations que le macrophage. Nous n'avons pas étudié directement l'effet de l'hypoxie sur les lymphocytes en raison de résultats préliminaires nous montrant l'absence de modulation transcriptionnelle en hypoxie et du fait du marquage de HIF-1 α dans les granulomes humains restreint aux cellules épithélioïdes (Talreja et al. 2019). Il serait par contre intéressant d'étudier l'effet de la modulation de l'environnement cytokinique du macrophage sur des lymphocytes et d'étudier d'éventuelles modifications de leur polarisation en particulier Th1 vers Th2, Th17.1. D'autre part dans le laboratoire nous mettons actuellement au point un modèle *in vitro* de granulome 3D grâce au travail de thèse de Mme Thininane Iskounen adapté de Tezera et al. (Tezera et al. 2017). Les PBMCs sont incorporés dans des billes d'alginate, une substance inerte, et peuvent

être cultivés dans un espace sphérique clos reproduisant une matrice pour la formation de granulome. Grâce à ce modèle nous pourrions étudier l'effet de l'hypoxie sur les différentes phases de formation du granulome.

Concernant des perspectives cliniques, si l'hypoxie est impliquée dans la pathogénie de la sarcoïdose, une perspective réalisable à court terme, serait d'étudier dans des formes pulmonaires de sarcoïdose, l'intérêt du TEP au ¹⁸F-MISO couplé d'ailleurs à celui au ¹¹⁸F-FDG. L'objectif de cette étude serait de rechercher une corrélation entre le niveau de rétention du F-MISO, l'activité de la maladie, sa sévérité et son pronostic.

HIF pourrait représenter une cible thérapeutique dans les formes sévères de sarcoïdose. En effet des inhibiteurs de HIF-1 α ou HIF-2 α sont utilisés dans des études précliniques en oncologie et y améliorent la survie en association avec d'autres traitements anticancéreux (Semenza 2019). Néanmoins compte tenu de l'effet ubiquitaire et multiple de HIF (Semenza 2019), il est nécessaire d'identifier des cibles précises de HIF responsables de mécanismes pathogéniques dans la sarcoïdose comme par exemple des inhibiteurs de PAI-1 (Vousden et al. 2019) (NCT04634799).

Conclusion

Les cellules principalement dérivées de macrophages, eux-mêmes dérivés de monocytes constituant le granulome sarcoïdien sont probablement exposées à l'hypoxie à différents moments d'évolution de la réaction inflammatoire-granulomateuse. Notre étude, a pu montrer que la réponse à l'hypoxie des macrophages dérivés de monocytes sanguins de patients atteints de sarcoïdose pulmonaire en particulier dans les formes actives est caractérisée par une réponse pro-inflammatoire, pro-fibrosante, et une phagocytose plus importante que les témoins ou les patients ayant une maladie peu active. Ces modifications sont accompagnées d'une augmentation de l'activité de HIF-1 α en hypoxie. HIF-1 α ainsi qu'une de ses cibles PAI-1 ont pu être mis en évidence dans les cellules de granulomes épithélioïdes pulmonaire sarcoïdiens. De même l'hypoxie semble favoriser la survenue des granulomes et l'évolution vers la fibrose dans des modèles *in vivo* de granulomatose induite par l'instillation intratrachéale de nanotubes de carbone. L'hypoxie et HIF pourraient donc être des facteurs favorisant le maintien du granulome et son évolution vers la fibrose et représenter un nouvel axe de recherche dans cette pathologie dont les facteurs modulant l'évolution de la maladie sont mal connus.

Références bibliographiques

- Abehsera, M., D. Valeyre, P. Grenier, H. Jaillet, J. P. Battesti, et M. W. Brauner. 2000. « Sarcoidosis with pulmonary fibrosis: CT patterns and correlation with pulmonary function ». *AJR. American journal of roentgenology* 174 (6) : 1751-57. <https://doi.org/10.2214/ajr.174.6.1741751>.
- Adams, D. O. 1976. « The granulomatous inflammatory response. A review ». *The American Journal of Pathology* 84 (1) : 164-92.
- Adrianto, Indra, Chee Paul Lin, Jessica J. Hale, Albert M. Levin, Indrani Datta, Ryan Parker, Adam Adler, et al. 2012. « Genome-Wide Association Study of African and European Americans Implicates Multiple Shared and Ethnic Specific Loci in Sarcoidosis Susceptibility ». *PLoS ONE* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043907>.
- Agostini, C., L. Trentin, A. Perin, M. Facco, M. Siviero, F. Piazza, U. Basso, F. Adami, R. Zambello, et G. Semenzato. 1999. « Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process ». *The American Journal of Physiology* 277 (2) : L240-250. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.2.L240>.
- Akagawa, Kiyoko S., Iwao Komuro, Hiroko Kanazawa, Toshio Yamazaki, Keiko Mochida, et Fumio Kishi. 2006. « Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 11 Suppl (janvier) : S32-36. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00805.x>.
- Akira, Masanori, Takenori Kozuka, Yoshikazu Inoue, et Mitsunori Sakatani. 2005. « Long-term follow-up CT scan evaluation in patients with pulmonary sarcoidosis ». *Chest* 127 (1) : 185-91. <https://doi.org/10.1378/chest.127.1.185>.
- Anand, Rahul J., Steven C. Gribar, Jun Li, Jeff W. Kohler, Maria F. Branca, Theresa Dubowski, Chhinder P. Sodhi, et David J. Hackam. 2007. « Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 α -dependent manner ». *Journal of Leukocyte Biology* 82 (5) : 1257-65. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307195>.
- Arakelyan, A., E. Kriegova, Z. Kubistova, F. Mrazek, M. Kverka, R. M. du Bois, V. Kolek, et M. Petrek. 2009. « Protein levels of CC chemokine ligand (CCL)15, CCL16 and macrophage stimulating protein in patients with sarcoidosis ». *Clinical and Experimental Immunology* 155 (3) : 457-65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03832.x>.
- Arango Duque, Guillermo, et Albert Descoteaux. 2014. « Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases ». *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.
- Arger, Nicholas K., Melissa E. Ho, Isabel E. Allen, Bryan S. Benn, Prescott G. Woodruff, et Laura L. Koth. 2020. « CXCL9 and CXCL10 are differentially associated with systemic organ involvement and pulmonary disease severity in sarcoidosis ». *Respiratory Medicine* 161 (janvier) : 105822. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.105822>.
- Arger, Nicholas K., Melissa Ho, Prescott G. Woodruff, et Laura L. Koth. 2019. « Serum CXCL11 correlates with pulmonary outcomes and disease burden in sarcoidosis ». *Respiratory Medicine* 152 (juin) : 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.04.005>.
- Arkema, Elizabeth V., et Yvette C. Cozier. 2020. « Sarcoidosis epidemiology: recent estimates of incidence, prevalence and risk factors ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 26 (5) : 527-34. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000715>.
- Arkema, Elizabeth V., Johan Grunewald, Susanna Kullberg, Anders Eklund, et Johan Askling. 2016. « Sarcoidosis incidence and prevalence: a nationwide register-based assessment in Sweden ». *The European Respiratory Journal* 48 (6) : 1690-99. <https://doi.org/10.1183/13993003.00477-2016>.
- Asakawa, Naoya, Keisuke Uchida, Mamoru Sakakibara, Kazunori Omote, Keiji Noguchi, Yusuke Tokuda, Kiwamu Kamiya, et al. 2017. « Immunohistochemical identification of Propionibacterium acnes in granuloma and inflammatory cells of myocardial tissues obtained from cardiac sarcoidosis patients ». *PLoS One* 12 (7) : e0179980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179980>.
- Ascoli, Christian, Yue Huang, Cody Schott, Benjamin A. Turturice, Ahmed Metwally, David L. Perkins, Patricia W. Finn, et ACCESS Research Group. 2017. « A Circulating Micro-RNA Signature Serves as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, août. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0207OC>.
- ATS/ERS/WASOG. 1999. « Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160 (2) : 736-55. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99>.
- Baay-Guzman, Guillermina J., Marco A. Duran-Padilla, Jesus Rangel-Santiago, Belen Tirado-Rodriguez, Gabriela Antonio-Andres, Jorge Barrios-Payan, Dulce Mata-Espinosa, et al. 2018. « Dual role of hypoxia-

- inducible factor 1 α in experimental pulmonary tuberculosis: its implication as a new therapeutic target ». *Future Microbiology* 13 (juin) : 785-98. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0168>.
- Bandarra, Daniel, John Biddlestone, Sharon Mudie, H.-Arno J. Müller, et Sonia Rocha. 2015. « HIF-1 α restricts NF- κ B-dependent gene expression to control innate immunity signals ». *Disease Models & Mechanisms* 8 (2) : 169-81. <https://doi.org/10.1242/dmm.017285>.
- Barczyk, A., E. Pierzchała, G. Caramori, et E. Sozańska. 2014. « Increased Expression of CCL4/MIP-1 β IN CD8+ Cells and CD4+ Cells in Sarcoidosis ». *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 27 (2) : 185-93. <https://doi.org/10.1177/039463201402700205>.
- Bargagli, E., B. Magi, C. Olivieri, N. Bianchi, C. Landi, et P. Rottoli. 2011. « Analysis of serum amyloid A in sarcoidosis patients ». *Respiratory Medicine* 105 (5) : 775-80. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.12.010>.
- Barna, Barbara P., Matthew McPeck, Anagha Malur, Michael B. Fessler, Christopher J. Wingard, Larry Dobbs, Kathryn M. Verbanac, Mark Bowling, Marc A. Judson, et Mary Jane Thomassen. 2016. « Elevated MicroRNA-33 in Sarcoidosis and a Carbon Nanotube Model of Chronic Granulomatous Disease ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54 (6) : 865-71. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0332OC>.
- Barnard, Juliana, Cecile Rose, Lee Newman, Martha Canner, John Martyny, Chuck McCammon, Eddy Bresnitz, et al. 2005. « Job and industry classifications associated with sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) ». *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 47 (3) : 226-34. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000155711.88781.91>.
- Baughman RP, Engel PJ, Taylor L, Lower EE. 2010 Survival in sarcoidosis-associated pulmonary hypertension: the importance of hemodynamic evaluation. *Chest*. 2010 Nov;138(5):1078-85. doi: 10.1378/chest.09-2002. Epub 2010 Mar 26. PMID: 20348196.
- Baughman RP, Drent M, Kavuru M, Judson MA, Costabel U, du Bois R, Albera C, Brutsche M, Davis G, Donohue JF, Müller-Quernheim J, Schlenker-Herceg R, Flavin S, Lo KH, Oemar B, Barnathan ES; 2006 Sarcoidosis Investigators. Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 1;174(7):795-802. doi: 10.1164/rccm.200603-402OC. Epub 2006 Jul 13. PMID: 16840744.
- Baughman, R. P., S. Nagai, et Et Al M. Balter. 2011. « Defining the clinical outcome status (COS) in sarcoidosis: results of WASOG Task Force ». *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Disease* 28 (1) : 56-64.
- Baughman, R. P., A. S. Teirstein, M. A. Judson, M. D. Rossman, H. Yeager, E. A. Bresnitz, L. DePalo, et al. 2001. « Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (10 Pt 1) : 1885-89. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104046>.
- Baughman, Robert P., Shelli Field, Ulrich Costabel, Ronald G. Crystal, Daniel A. Culver, Marjolein Drent, Marc A. Judson, et Gerhard Wolff. 2016. « Sarcoidosis in America. Analysis Based on Health Care Use ». *Annals of the American Thoracic Society* 13 (8) : 1244-52. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201511-760OC>.
- Baughman, Robert P., Oksana A. Shlobin, Athol U. Wells, Esam H. Alhamad, Daniel A. Culver, Joseph Barney, Francis C. Cordova, et al. 2018. « Clinical features of sarcoidosis associated pulmonary hypertension: Results of a multi-national registry ». *Respiratory Medicine* 139 : 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.04.015>.
- Beaudry, Michèle, Magdalena Hidalgo, Thierry Launay, Valérie Bello, et Thierry Darribère. 2016. « Regulation of myogenesis by environmental hypoxia ». *Journal of Cell Science* 129 (15) : 2887-96. <https://doi.org/10.1242/jcs.188904>.
- Becker, André, Giovanna Vella, Valentina Galata, Katharina Rentz, Christoph Beisswenger, Christian Herr, Jörn Walter, et al. 2019. « The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study ». *Respiratory Research* 20 (1) : 46. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1013-2>.
- Beghè, Deborah, Luca Dall'Asta, Claudia Garavelli, Augusto Alberto Pastorelli, Marilena Muscarella, Gloria Saccani, Marina Aiello, et al. 2017. « Sarcoidosis in an Italian province. Prevalence and environmental risk factors ». *PLoS ONE* 12 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176859>.
- Beijer, E., R. Kraaijvanger, C. Roodenburg, J. C. Grutters, B. Meek, et M. Veltkamp. 2021. « Simultaneous testing of immunological sensitization to multiple antigens in sarcoidosis reveals an association with inorganic antigens specifically related to a fibrotic phenotype ». *Clinical and Experimental Immunology* 203 (1) : 115-24. <https://doi.org/10.1111/cei.13519>.
- Beijer, E., B. Meek, X. Bossuyt, S. Peters, R. C. H. Vermeulen, H. Kromhout, et M. Veltkamp. 2020. « Immunoreactivity to metal and silica associates with sarcoidosis in Dutch patients ». *Respiratory Research* 21 (1) : 141. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01409-w>.
- Benamore, Rachel, Yvonne R. Kendrick, Emmanouela Repapi, Emma Helm, Suzanne L. Cole, Stephen Taylor, et Ling-Pei Ho. 2016. « CTAS: a CT score to quantify disease activity in pulmonary sarcoidosis ». *Thorax*

- 71 (12) : 1161-63. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208833>.
- Bennett, David, Paolo Cameli, Nicola Lanzarone, Loredana Carobene, Nicola Bianchi, Annalisa Fui, Luigi Rizzi, et al. 2020. « Chitotriosidase: a biomarker of activity and severity in patients with sarcoidosis ». *Respiratory Research* 21 (1) : 6. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1263-z>.
- Berge, Bregje Ten, Alex KleinJan, Femke Muskens, Hamida Hammad, Henk C. Hoogsteden, Rudi W. Hendriks, Bart N. Lambrecht, et Bernt Van den Blink. 2012. « Evidence for local dendritic cell activation in pulmonary sarcoidosis ». *Respiratory Research* 13 (1) : 33. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-33>.
- Bernard, Olivier, Florence Jeny, Yurdagül Uzunhan, Elisabetta Dondi, Rahma Terfous, Rabab Label, Angela Sutton, et al. 2018. « Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 314 (3) : L360-71. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00153.2017>.
- Bernaudin, Jean-François, Philippe Moguelet, Florence Jeny, Valérie Besnard, Dominique Valeyre, et Marianne Kambouchner. 2019. « Chapter 6 - Pathology of Granuloma ». Dans *Sarcoidosis*. Sous la direction de Robert Phillip Baughman et Dominique Valeyre, 75-83. Philadelphia : Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54429-0.00006-9>.
- Besnard, Valérie, Alain Calender, Diane Bouvry, Yves Pacheco, Catherine Chapelon-Abric, Florence Jeny, Hilario Nunes, Carole Planès, et Dominique Valeyre. 2018. « G908R NOD2 variant in a family with sarcoidosis ». *Respiratory Research* 19 (1) : 44. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0748-5>.
- Besnard, Valérie, et Florence Jeny. 2020. « Models Contribution to the Understanding of Sarcoidosis Pathogenesis: “Are There Good Models of Sarcoidosis?” » *Journal of Clinical Medicine* 9 (8). <https://doi.org/10.3390/jcm9082445>.
- Bianchi, Marco E. 2007. « DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger ». *Journal of Leukocyte Biology* 81 (1) : 1-5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>.
- Bickett, Alexandra N., Elyse E. Lower, et Robert P. Baughman. 2018. « Sarcoidosis Diagnostic Score: A Systematic Evaluation to Enhance the Diagnosis of Sarcoidosis ». *Chest* 154 (5) : 1052-60. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.05.003>.
- Biddlestone, John, Daniel Bandarra, et Sonia Rocha. 2015. « The role of hypoxia in inflammatory disease (review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 35 (4) : 859-69. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2079>.
- Billiau, Alfons, et Patrick Matthys. 2001. « Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases ». *Journal of Leukocyte Biology* 70 (6) : 849-60.
- Bonello, Steve, Christian Zähringer, Rachida S. BelAiba, Taliya Djordjevic, John Hess, Carine Michiels, Thomas Kietzmann, et Agnes Görlach. 2007. « Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (4) : 755-61. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000258979.92828.bc>.
- Bosse-Henck, Andrea, Rainer Koch, Hubert Wirtz, et Andreas Hinz. 2017. « Fatigue and Excessive Daytime Sleepiness in Sarcoidosis: Prevalence, Predictors, and Relationships between the Two Symptoms ». *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 94 (2) : 186-97. <https://doi.org/10.1159/000477352>.
- Boucly, Athénaïs, Vincent Cottin, Hilario Nunes, Xavier Jaïs, Abdelatif Tazi, Grégoire Prévôt, Martine Reynaud-Gaubert, et al. 2017. « Management and long-term outcomes of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension ». *The European Respiratory Journal* 50 (4). <https://doi.org/10.1183/13993003.00465-2017>.
- Braga, Tarcio Teodoro, Juan Sebastian Henao Agudelo, et Niels Olsen Saraiva Camara. 2015. « Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe ». *Frontiers in Immunology* 6 : 602. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00602>.
- Braun, Nicole A., Lindsay J. Celada, Jose D. Herazo-Maya, Susamma Abraham, Guzel Shaginurova, Carla M. Sevin, Jan Grutters, et al. 2014. « Blockade of the programmed death-1 pathway restores sarcoidosis CD4(+) T-cell proliferative capacity ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 190 (5) : 560-71. <https://doi.org/10.1164/rccm.201401-0188OC>.
- Brauner, M. W., S. Lenoir, P. Grenier, P. Cluzel, J. P. Batesti, et D. Valeyre. 1992. « Pulmonary sarcoidosis: CT assessment of lesion reversibility ». *Radiology* 182 (2) : 349-54. <https://doi.org/10.1148/radiology.182.2.1732948>.
- Braverman, Jonathan, Kimberly M. Sogi, Daniel Benjamin, Daniel K. Nomura, et Sarah A. Stanley. 2016. « HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 197 (4) : 1287-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600266>.
- Brewer, Sarah, Michael McPherson, Daisuke Fujiwara, Olga Turovskaya, David Ziring, Ling Chen, Hidetoshi Takedatsu, Stephan R. Targan, Bo Wei, et Jonathan Braun. 2008. « Molecular imaging of murine intestinal inflammation with 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose and positron emission tomography ». *Gastroenterology* 135 (3) : 744-55. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.040>.

- Brigati, Claudio, Barbara Banelli, Angela di Vinci, Ida Casciano, Giorgio Allemanni, Alessandra Forlani, Luana Borzi, et Massimo Romani. 2010. « Inflammation, HIF-1, and the epigenetics that follows ». *Mediators of Inflammation* 2010 : 263914. <https://doi.org/10.1155/2010/263914>.
- Brito-Zerón, Pilar, Nihan Acar-Denizli, Antoni Sisó-Almirall, Xavier Bosch, Fernanda Hernández, Sergi Vilanova, Mireia Villalta, et al. 2018. « The Burden of Comorbidity and Complexity in Sarcoidosis: Impact of Associated Chronic Diseases ». *Lung* 196 (2) : 239-48. <https://doi.org/10.1007/s00408-017-0076-4>.
- Brito-Zerón, Pilar, Belchin Kostov, Daphne Superville, Robert P. Baughman, Manuel Ramos-Casals, et Autoimmune Big Data Study Group. 2019. « Geoepidemiological big data approach to sarcoidosis: geographical and ethnic determinants ». *Clinical and Experimental Rheumatology* 37 (6) : 1052-64.
- Broos, Caroline E., Laura L. Koth, Menno van Nimwegen, Johannes C. C. M. In 't Veen, Sandra M. J. Paulissen, Jan Piet van Hamburg, Jouke T. Annema, et al. 2018. « Increased T-helper 17.1 cells in sarcoidosis mediastinal lymph nodes ». *The European Respiratory Journal* 51 (3). <https://doi.org/10.1183/13993003.01124-2017>.
- Broos, Caroline E., Menno van Nimwegen, Henk C. Hoogsteden, Rudi W. Hendriks, Mirjam Kool, et Bernt van den Blink. 2013. « Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis ». *Frontiers in Immunology* 4 (décembre) : 437. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00437>.
- Broos, Caroline E., Menno van Nimwegen, Johannes C. C. M. In 't Veen, Henk C. Hoogsteden, Rudi W. Hendriks, Bernt van den Blink, et Mirjam Kool. 2015. « Decreased Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 Expression on Regulatory T Cells and Th17 Cells in Sarcoidosis: Double Trouble? » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (6) : 763-65. <https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0635LE>.
- Broos, Caroline E., Menno van Nimwegen, Alex Kleinjan, Bregje ten Berge, Femke Muskens, Johannes C. C. M. in 't Veen, Jouke T. Annema, et al. 2015. « Impaired survival of regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis ». *Respiratory Research* 16 (septembre) : 108. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0265-8>.
- Broos, Caroline E., Linda H. C. Poell, Caspar W. N. Looman, Johannes C. C. M. In 't Veen, Marco J. J. H. Grootenboers, Roxane Heller, Leon M. van den Toorn, et al. 2018. « No evidence found for an association between prednisone dose and FVC change in newly-treated pulmonary sarcoidosis ». *Respiratory Medicine* 138S : S31-37. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.10.022>.
- Broos, Caroline E., Monique Wapenaar, Caspar W. N. Looman, Johannes C. C. M. In 't Veen, Leon M. van den Toorn, Maria J. Overbeek, Marco J. J. H. Grootenboers, et al. 2018. « Daily home spirometry to detect early steroid treatment effects in newly treated pulmonary sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 51 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.02089-2017>.
- Brugarolas, James, Kui Lei, Rebecca L. Hurley, Brendan D. Manning, Jan H. Reiling, Ernst Hafen, Lee A. Witters, Leif W. Ellisen, et William G. Kaelin. 2004. « Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex ». *Genes & Development* 18 (23) : 2893-2904. <https://doi.org/10.1101/gad.1256804>.
- Bühling, F., A. Reisenauer, A. Gerber, S. Krüger, E. Weber, D. Brömme, A. Roessner, S. Ansorge, T. Welte, et C. Röcken. 2001. « Cathepsin K--a marker of macrophage differentiation? » *The Journal of Pathology* 195 (3) : 375-82. <https://doi.org/10.1002/path.959>.
- Burke, W. M., A. Keogh, P. J. Maloney, W. Delprado, D. H. Bryant, et P. Spratt. 1990. « Transmission of sarcoidosis via cardiac transplantation ». *Lancet (London, England)* 336 (8730) : 1579. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93354-r](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)93354-r).
- Busuttill, A., S. S. Weigt, M. P. Keane, Y. Y. Xue, V. Palchevskiy, M. D. Burdick, C. Huang, et al. 2009. « CXCR3 ligands are augmented during the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis ». *European Respiratory Journal* 34 (3) : 676-86. <https://doi.org/10.1183/09031936.00157508>.
- C Lardot Y Sibille B Wallaert C Hermans D Lison, null. 1999. « Depressed urokinase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis, silicosis or idiopathic pulmonary Rbrosis: relationship to disease severity ». *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* 4 (5) : 361-72. <https://doi.org/10.1080/135475099230741>.
- Cain, H., et B. Kraus. 1983. « Immunofluorescence microscopic demonstration of vimentin filaments in asteroid bodies of sarcoidosis. A comparison with electron microscopic findings ». *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* 42 (2) : 213-26. <https://doi.org/10.1007/BF02890384>.
- Calcagno, Tess M., Chongxu Zhang, Runxia Tian, Babak Ebrahimi, et Mehdi Mirsaedi. 2021. « Novel three-dimensional biochip pulmonary sarcoidosis model ». *PLOS ONE* 16 (2) : e0245805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245805>.
- Calender, Alain, Clarice X. Lim, Thomas Weichhart, Adrien Buisson, Valérie Besnard, Pierre Antoine Rollat-Farnier, Claire Bardel, et al. 2019. « Exome sequencing and pathogenicity-network analysis of five French families implicate mTOR signalling and autophagy in familial sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 54 (2). <https://doi.org/10.1183/13993003.00430-2019>.
- Calender, Alain, Thomas Weichhart, Dominique Valeyre, et Yves Pacheco. 2020. « Current Insights in Genetics

- of Sarcoidosis: Functional and Clinical Impacts ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (8). <https://doi.org/10.3390/jcm9082633>.
- Capelli, Armando, Antonino Di Stefano, Mirco Lusuardi, Isabelle Gnemmi, et Claudio F. Donner. 2002. « Increased macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-1beta levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients affected by different stages of pulmonary sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (2): 236-41. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.2106084>.
- Carlson, I., K. Tognazzi, E. J. Manseau, H. F. Dvorak, et L. F. Brown. 1997. « Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 77 (1) : 103-8.
- Celada, Lindsay J., Jonathan A. Kropski, Jose D. Herazo-Maya, Weifeng Luo, Amy Creecy, Andrew T. Abad, Ozioma S. Chioma, et al. 2018. « PD-1 up-regulation on CD4+ T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF- β 1 production ». *Science Translational Medicine* 10 (460). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar8356>.
- Chakhoyan, Ararat, Jean-Sebastien Guillo, Solène Collet, François Kauffmann, Nicolas Delcroix, Emmanuèle Lechapt-Zalcman, Jean-Marc Constans, et al. 2017. « FMISO-PET-derived brain oxygen tension maps: application to glioblastoma and less aggressive gliomas ». *Scientific Reports* 7 (1): 10210. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08646-y>.
- Chen, Edward S. 2016. « Innate immunity in sarcoidosis pathobiology ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 22 (5) : 469-75. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000305>.
- Chen, Edward S., et David R. Moller. 2014. « Etiologic role of infectious agents ». *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 35 (3) : 285-95. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1376859>.
- Chen, Edward S., Zhimin Song, Matthew H. Willett, Shannon Heine, Rex C. Yung, Mark C. Liu, Steve D. Groshong, Ying Zhang, Rubin M. Tuder, et David R. Moller. 2010. « Serum Amyloid A Regulates Granulomatous Inflammation in Sarcoidosis through Toll-like Receptor-2 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (4) : 360-73. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0696OC>.
- Chen, Xu, Xuan Li, Wenyan Zhang, Jie He, Bo Xu, Bin Lei, Zhenhua Wang, Courtney Cates, Thomas Rousselle, et Ji Li. 2018. « Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF- κ B pathway ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 83 (juin) : 256-70. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.03.004>.
- Chen, Yalei, Indra Adrianto, Michael C. Ianuzzi, Lori Garman, Courtney G. Montgomery, Benjamin A. Rybicki, Albert M. Levin, et Jia Li. 2019. « Extended methods for gene-environment-wide interaction scans in studies of admixed individuals with varying degrees of relationships ». *Genetic Epidemiology* 43 (4) : 414-26. <https://doi.org/10.1002/gepi.22196>.
- Choudhry, Hani, et Adrian L. Harris. 2018. « Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology ». *Cell Metabolism* 27 (2) : 281-98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005>.
- Cinetto, Francesco, Riccardo Scarpa, Alessandro Dell'Edera, et Mark G. Jones. 2020. « Immunology of sarcoidosis: old companions, new relationships ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 26 (5) : 535-43. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000711>.
- Cohen, Sara B., Benjamin H. Gern, Jared L. Delahaye, Kristin N. Adams, Courtney R. Plumlee, Jessica K. Winkler, David R. Sherman, Michael Y. Gerner, et Kevin B. Urdahl. 2018. « Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination ». *Cell Host & Microbe* 24 (3) : 439-446.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.001>.
- Colboc, H., P. Moguelet, D. Bazin, C. Bachmeyer, V. Frochot, R. Weil, E. Letavernier, C. Jouanneau, M. Daudon, et J. F. Bernaudin. 2019. « Physicochemical characterization of inorganic deposits associated with granulomas in cutaneous sarcoidosis ». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 33 (1) : 198-203. <https://doi.org/10.1111/jdv.15167>.
- Collins, Bridget F., Robyn L. McClelland, Lawrence A. Ho, Carmen R. Mikacenic, Jennifer Hayes, Carolyn Spada, et Ganesh Raghu. 2018. « Sarcoidosis and IPF in the same patient-a coincidence, an association or a phenotype? » *Respiratory Medicine* 144S (novembre) : S20-27. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.08.008>.
- « Consensus conference: activity of sarcoidosis. Third WASOG meeting, Los Angeles, USA, September 8-11, 1993 ». 1994. *The European Respiratory Journal* 7 (3) : 624-27.
- Copple, Bryan L., Sophia Kaska, et Callie Wentling. 2012. « Hypoxia-inducible factor activation in myeloid cells contributes to the development of liver fibrosis in cholestatic mice ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341 (2) : 307-16. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.189340>.
- Cramer, Thorsten, Yuji Yamanishi, Björn E. Clausen, Irmgard Förster, Rafal Pawlinski, Nigel Mackman, Volker H. Haase, et al. 2003. « HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation ». *Cell* 112 (5) : 645-57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00154-5).
- Cronan, Mark R., Rebecca W. Beerman, Allison F. Rosenberg, Joseph W. Saelens, Matthew G. Johnson, Stefan

- H. Oehlers, Dana M. Sisk, et al. 2016. « Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies Mycobacterial Granuloma Formation and Promotes Infection ». *Immunity* 45 (4) : 861-76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.014>.
- Crouser, Elliott D., Landon W. Locke, Mark W. Julian, Sabahattin Bicer, Wolfgang Sadee, Peter White, et Larry S. Schlesinger. 2020. « Phagosome-regulated mTOR Signalling during Sarcoidosis Granuloma Biogenesis ». *The European Respiratory Journal*, septembre. <https://doi.org/10.1183/13993003.02695-2020>.
- Crouser, Elliott D., Lisa A. Maier, Kevin C. Wilson, Catherine A. Bonham, Adam S. Morgenthau, Karen C. Patterson, Eric Abston, et al. 2020. « Diagnosis and Detection of Sarcoidosis. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 201 (8) : e26-51. <https://doi.org/10.1164/rccm.202002-0251ST>.
- Crouser, Elliott D., Peter White, Evelyn Guirado Caceres, Mark W. Julian, Audrey C. Papp, Landon W. Locke, Wolfgang Sadee, et Larry S. Schlesinger. 2017. « A Novel In Vitro Human Granuloma Model of Sarcoidosis and Latent Tuberculosis Infection ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57 (4) : 487-98. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0321OC>.
- Culver, Daniel A., Barbara P. Barna, Baisakhi Raychaudhuri, Tracey L. Bonfield, Susamma Abraham, Anagha Malur, Carol F. Farver, Mani S. Kavuru, et Mary Jane Thomassen. 2004. « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity is deficient in alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30 (1) : 1-5. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0304RC>.
- Cummins, Eoin P., et Daniel Crean. 2017. « Hypoxia and inflammatory bowel disease ». *Microbes and Infection* 19 (3) : 210-21. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.09.004>.
- Dalhoff, K., S. Bohnet, J. Braun, B. Kreft, et K. J. Wiessmann. 1993. « Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in the pathogenesis of mononuclear cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis ». *Thorax* 48 (11) : 1140-44. <https://doi.org/10.1136/thx.48.11.1140>.
- Damsky, William, Durga Thakral, Nkiruka Emeagwali, Anjela Galan, et Brett King. 2018. « Tofacitinib Treatment and Molecular Analysis of Cutaneous Sarcoidosis ». *The New England Journal of Medicine* 379 (26) : 2540-46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805958>.
- Damsky, William, Durga Thakral, Meaghan K. McGeary, Jonathan Leventhal, Anjela Galan, et Brett King. 2020. « Janus kinase inhibition induces disease remission in cutaneous sarcoidosis and granuloma annulare ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 82 (3) : 612-21. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.05.098>.
- Darby, Ian A., et Tim D. Hewitson. 2016. « Hypoxia in tissue repair and fibrosis ». *Cell and Tissue Research* 365 (3) : 553-62. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>.
- Davis, J. Muse, et Lalita Ramakrishnan. 2009. « The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection ». *Cell* 136 (1) : 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.014>.
- De Margerie-Mellon, Constance, Geneviève Dion, Julien Darlay, Imene Ridene, Marianne Kambouchner, Nadia Brauner, Michel Brauner, Dominique Valeyre, et Pierre-Yves Brillet. 2016. « High-resolution computed tomography to differentiate chronic diffuse infiltrative lung diseases with chronic multifocal consolidation patterns using logical analysis of data ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 33 (4) : 355-71.
- Delbrel, Eva, Abdoulaye Soumare, Adnan Naguez, Rabab Label, Olivier Bernard, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, et al. 2018. « HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis ». *Scientific Reports* 8 (décembre). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36063-2>.
- Delprat, Victor, Céline Tellier, Catherine Demazy, Martine Raes, Olivier Feron, et Carine Michiels. 2020. « Cycling hypoxia promotes a pro-inflammatory phenotype in macrophages via JNK/p65 signaling pathway ». *Scientific Reports* 10 (1) : 882. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57677-5>.
- Demirkok, Sevtap Sipahi, Metin Basaranoglu, Elif Coker, et Tuncer Karayel. 2007. « Seasonality of the onset of symptoms, tuberculin test anergy and Kveim positive reaction in a large cohort of patients with sarcoidosis ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 12 (4) : 591-93. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01062.x>.
- Dengler, Franziska. 2020. « Activation of AMPK under Hypoxia: Many Roads Leading to Rome ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072428>.
- Deretic, Vojo. 2016. « Autophagy in leukocytes and other cells: mechanisms, subsystem organization, selectivity, and links to innate immunity ». *Journal of Leukocyte Biology* 100 (5) : 969-78. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0216-079R>.
- D'Ignazio, Laura, Daniel Bandarra, et Sonia Rocha. 2016. « NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses ». *The FEBS journal* 283 (3) : 413-24. <https://doi.org/10.1111/febs.13578>.
- « Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. Silicosis and Silicate Disease

- Committee ». 1988. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 112 (7) : 673-720.
- Distler, Jörg H. W., Astrid Jüngel, Margarita Pileckyte, Jochen Zwerina, Beat A. Michel, Renate E. Gay, Otylia Kowal-Bielecka, et al. 2007. « Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis ». *Arthritis and Rheumatism* 56 (12) : 4203-15. <https://doi.org/10.1002/art.23074>.
- Dorrington, Michael G., et Iain D. C. Fraser. 2019. « NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00705>.
- Drent, M., R. van den Berg, G. R. Haenen, H. van den Berg, E. F. Wouters, et A. Bast. 2001. « NF-kappaB activation in sarcoidosis ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 18 (1) : 50-56.
- Drent, M., R. M. Wirnsberger, J. de Vries, M. P. van Diejen-Visser, E. F. Wouters, et A. M. Schols. 1999. « Association of fatigue with an acute phase response in sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 13 (4) : 718-22. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.13d03.x>.
- Drent, Marjolein, Elyse E. Lower, et Jolanda De Vries. 2012. « Sarcoidosis-associated fatigue ». *The European Respiratory Journal* 40 (1) : 255-63. <https://doi.org/10.1183/09031936.00002512>.
- Duan, Cunming. 2016. « Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 310 (4) : C260-269. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2015>.
- Duan, Jianghui, Yanyan Xu, Haixu Zhu, Haibo Zhang, Shilong Sun, Hongliang Sun, Wu Wang, et Sheng Xie. 2018. « Relationship between CT activity score with lung function and the serum angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis on chest HRCT ». *Medicine* 97 (36) : e12205. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012205>.
- Duchemann, Boris, Isabella Annesi-Maesano, Camille Jacobe de Naurois, Shreosi Sanyal, Pierre-Yves Brillet, Michel Brauner, Marianne Kambouchner, et al. 2017. « Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris ». *The European Respiratory Journal* 50 (2). <https://doi.org/10.1183/13993003.02419-2016>.
- Dumas, Oriane, Krislyn M Boggs, Yvette C Cozier, Meir J Stampfer, et Carlos A Camargo. 2017. « Prospective study of body mass index and risk of sarcoidosis in U.S. women ». *The European respiratory journal* 50 (4). <https://doi.org/10.1183/13993003.01397-2017>.
- Ebe, Y., S. Ikushima, T. Yamaguchi, K. Kohno, A. Azuma, K. Sato, I. Ishige, Y. Usui, T. Takemura, et Y. Eishi. 2000. « Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from Propionibacterium acnes DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 17 (3) : 256-65.
- Eberhardt, Christian, Muhunthan Thillai, Robert Parker, Nazneen Siddiqui, Lee Potiphar, Rob Goldin, John F. Timms, et al. 2017. « Proteomic Analysis of Kveim Reagent Identifies Targets of Cellular Immunity in Sarcoidosis ». *PLoS One* 12 (1) : e0170285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170285>.
- Eltzschig, Holger K., et Peter Carmeliet. 2011. « Hypoxia and inflammation ». *The New England Journal of Medicine* 364 (7) : 656-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0910283>.
- Enomoto, Riyo, Makoto Imamori, Ayumi Seon, Kozue Yoshida, Aya Furue, Hirofumi Tsuruda, et Eibai Lee-Hiraiwa. 2013. « Proposal for a new evaluation of phagocytosis using different sizes of fluorescent polystyrene microspheres ». *Advances in Biological Chemistry* 03 (06) : 556. <https://doi.org/10.4236/abc.2013.36064>.
- Epstein, William L., J. Richard Skahen, et Hedy Krasnobrod. 1963. « The Organized Epithelioid Cell Granuloma: Differentiation of Allergic (Zirconium) from Colloidal (Silica) Types ». *The American Journal of Pathology* 43 (3) : 391-405.
- Erdohazi, M., et R L Newman. 1971. « Aluminium hydroxide granuloma. » *British Medical Journal* 3 (5775) : 621-23.
- Esteves, Tiago, Gloria Aparicio, et Vicente Garcia-Patos. 2016. « Is there any association between Sarcoidosis and infectious agents?: a systematic review and meta-analysis ». *BMC pulmonary medicine* 16 (1) : 165. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0332-z>.
- Eurelings, Laura E. M., Jelle R. Miedema, Virgil A. S. H. Dalm, Paul L. A. van Daele, P. Martin van Hagen, Jan A. M. van Laar, et Willem A. Dik. 2019. « Sensitivity and specificity of serum soluble interleukin-2 receptor for diagnosing sarcoidosis in a population of patients suspected of sarcoidosis ». *PLoS One* 14 (10) : e0223897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223897>.
- Evavold, Charles L., et Jonathan C. Kagan. 2019. « Inflammasomes: Threat-Assessment Organelles of the Innate Immune System ». *Immunity* 51 (4) : 609-24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.005>.
- Evren, Elza, Emma Ringqvist, et Tim Willinger. 2020. « Origin and ontogeny of lung macrophages: from mice to humans ». *Immunology* 160 (2) : 126-38. <https://doi.org/10.1111/imm.13154>.
- Facco, Monica, Anna Cabrelle, Antonella Teramo, Valeria Olivieri, Marianna Gnoato, Sara Teolato, Elisa Ave, et al. 2011. « Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder ». *Thorax* 66 (2) : 144-50.

- <https://doi.org/10.1136/thx.2010.140319>.
- Falta, Michael T., Clemencia Pinilla, Douglas G. Mack, Alex N. Tinega, Frances Crawford, Marc Giulianotti, Radleigh Santos, et al. 2013. « Identification of beryllium-dependent peptides recognized by CD4+ T cells in chronic beryllium disease ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (7) : 1403-18. <https://doi.org/10.1084/jem.20122426>.
- Fang, Chuling, Hui Huang, et Zuojun Xu. 2016. « Immunological Evidence for the Role of Mycobacteria in Sarcoidosis: A Meta-Analysis ». *PloS One* 11 (8) : e0154716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154716>.
- Fang, Hsin-Yu, Russell Hughes, Craig Murdoch, Seth B. Coffelt, Subhra K. Biswas, Adrian L. Harris, Randall S. Johnson, et al. 2009. « Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia ». *Blood* 114 (4) : 844-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195941>.
- Fangradt, Monique, Martin Hahne, Timo Gaber, Cindy Strehl, Roman Rauch, Paula Hoff, Max Löhning, Gerd-Rüdiger Burmester, et Frank Buttgerit. 2012. « Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia ». *Arthritis Research & Therapy* 14 (4) : R181. <https://doi.org/10.1186/ar4011>.
- Fehrenbach, H., G. Zissel, T. Goldmann, T. Tschernig, E. Vollmer, R. Pabst, et J. Müller-Quernheim. 2003. « Alveolar macrophages are the main source for tumour necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 21 (3) : 421-28. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00083002>.
- Fidler, Lee M., Meyer Balter, Jolene H. Fisher, Teresa To, Matthew B. Stanbrook, et Andrea Gershon. 2019. « Epidemiology and health outcomes of sarcoidosis in a universal healthcare population: a cohort study ». *The European Respiratory Journal* 54 (4). <https://doi.org/10.1183/13993003.00444-2019>.
- Flaherty, Kevin R., Athol U. Wells, Vincent Cottin, Anand Devaraj, Simon L. F. Walsh, Yoshikazu Inoue, Luca Richeldi, et al. 2019. « Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases ». *The New England Journal of Medicine* 381 (18) : 1718-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908681>.
- Fleming, I. N., R. Manavaki, P. J. Blower, C. West, K. J. Williams, A. L. Harris, J. Domarkas, S. Lord, C. Baldry, et F. J. Gilbert. 2015. « Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography ». *British Journal of Cancer* 112 (2) : 238-50. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.610>.
- Flevaris, Panagiotis, et Douglas Vaughan. 2017. « The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Fibrosis ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 43 (2) : 169-77. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1586228>.
- Forbes, Amy, Mike Pickell, Mehry Foroughian, Li-Juan Yao, James Lewis, et Ruud Veldhuizen. 2007. « Alveolar macrophage depletion is associated with increased surfactant pool sizes in adult rats ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 103 (2) : 637-45. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00995.2006>.
- Fraser, Simon D., Laura R. Sadofsky, Paul M. Kaye, et Simon P. Hart. 2016. « Reduced expression of monocyte CD200R is associated with enhanced proinflammatory cytokine production in sarcoidosis ». *Scientific Reports* 6 (décembre) : 38689. <https://doi.org/10.1038/srep38689>.
- Fukuda, Ryo, Kiichi Hirota, Fan Fan, Young Do Jung, Lee M. Ellis, et Gregg L. Semenza. 2002. « Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (41) : 38205-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203781200>.
- Furth, R. van, J. A. Raeburn, et T. L. van Zwet. 1979. « Characteristics of human mononuclear phagocytes ». *Blood* 54 (2) : 485-500.
- Furusawa, Haruhiko, Yoshimi Suzuki, Yasunari Miyazaki, Naohiko Inase, et Yoshinobu Eishi. 2012. « Th1 and Th17 immune responses to viable *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis ». *Respiratory Investigation* 50 (3) : 104-9. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2012.07.001>.
- Furuya, Sho, Masanao Naya, Osamu Manabe, Kenji Hirata, Hiroshi Ohira, Tadao Aikawa, Kazuhiro Koyanagawa, et al. 2019. « 18F-FMISO PET/CT detects hypoxic lesions of cardiac and extra-cardiac involvement in patients with sarcoidosis ». *Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, décembre. <https://doi.org/10.1007/s12350-019-01976-6>.
- Gabrilovich, M. I., J. Walrath, J. van Lunteren, D. Nethery, M. Seifu, J. A. Kern, C. V. Harding, et al. 2013. « Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis ». *Clinical and Experimental Immunology* 173 (3) : 512-22. <https://doi.org/10.1111/cei.12138>.
- Garman, Lori, Richard C. Pelikan, Astrid Rasmussen, Caleb A. Lareau, Kathryn A. Savoy, Umesh S. Deshmukh, Harini Bagavant, et al. 2020. « Single Cell Transcriptomics Implicate Novel Monocyte and T Cell Immune Dysregulation in Sarcoidosis ». *Frontiers in Immunology* 11 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567342>.
- Gille, Thomas. 2011. « Réponses des cellules épithéliales alvéolaires à l'hypoxie et l'hypoxie intermittente ».

- These en préparation, Sorbonne Paris Cité. <http://theses.fr/s224448>.
- Gkiozos, Ioannis, Alexandra Kopitopoulou, Alexandros Kalkanis, Ioannis N. Vamvakaris, Marc A. Judson, et Konstantinos N. Syrigos. 2018. « Sarcoidosis-Like Reactions Induced by Checkpoint Inhibitors ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 13 (8) : 1076-82. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.04.031>.
- Gleeson, Laura E., Frederick J. Sheedy, Eva M. Palsson-McDermott, Denise Triglia, Seonadh M. O'Leary, Mary P. O'Sullivan, Luke A. J. O'Neill, et Joseph Keane. 2016. « Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (6) : 2444-49. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501612>.
- Gordon, Siamon. 2016a. « Elie Metchnikoff, the Man and the Myth ». *Journal of Innate Immunity* 8 (3) : 223-27. <https://doi.org/10.1159/000443331>.
- Gordon, Siamon. 2016b. « Phagocytosis: An Immunobiologic Process ». *Immunity* 44 (3) : 463-75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.
- Gordon, Siamon, et Luisa Martinez-Pomares. 2017. « Physiological roles of macrophages ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 469 (3-4) : 365-74. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1945-7>.
- Graff, Pål, Johanna Larsson, Ing-Liss Bryngelsson, Pernilla Wiebert, et Per Vihlborg. 2020. « Sarcoidosis and silica dust exposure among men in Sweden: a case-control study ». *BMJ open* 10 (9) : e038926. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038926>.
- Greaves, Sarah A., Shaikh M. Atif, et Andrew P. Fontenot. 2020. « Adaptive Immunity in Pulmonary Sarcoidosis and Chronic Beryllium Disease ». *Frontiers in Immunology* 11 : 474. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00474>.
- Grenier, P., S. Chevret, C. Beigelman, M. W. Brauner, C. Chastang, et D. Valeyre. 1994. « Chronic diffuse infiltrative lung disease: determination of the diagnostic value of clinical data, chest radiography, and CT and Bayesian analysis ». *Radiology* 191 (2) : 383-90. <https://doi.org/10.1148/radiology.191.2.8153310>.
- Gribbin, J., R. B. Hubbard, I. Le Jeune, C. J. P. Smith, J. West, et L. J. Tata. 2006. « Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK ». *Thorax* 61 (11) : 980-85. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.062836>.
- Grunewald, Johan, et Anders Eklund. 2007. « Sex-specific manifestations of Löfgren's syndrome ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (1) : 40-44. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1197OC>.
- . 2009. « Löfgren's syndrome: human leukocyte antigen strongly influences the disease course ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179 (4) : 307-12. <https://doi.org/10.1164/rccm.200807-1082OC>.
- Grunewald, Johan, Jan C. Grutters, Elizabeth V. Arkema, Lesley Ann Saketkoo, David R. Moller, et Joachim Müller-Quernheim. 2019. « Sarcoidosis ». *Nature Reviews. Disease Primers* 5 (1) : 45. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0096-x>.
- Grutters, J. C., et J. M. M. van den Bosch. 2006. « Corticosteroid treatment in sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 28 (3) : 627-36. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00105805>.
- Guilliams, Martin, Florent Ginhoux, Claudia Jakubzick, Shalin H. Naik, Nobuyuki Onai, Barbara U. Schraml, Elodie Segura, Roxane Tussiwand, et Simon Yona. 2014. « Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (8) : 571-78. <https://doi.org/10.1038/nri3712>.
- Guo, Haitao, Justin B. Callaway, et Jenny P.-Y. Ting. 2015. « Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics ». *Nature Medicine* 21 (7) : 677-87. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Gupta, Rohit, et Robert P. Baughman. 2020. « Advanced Pulmonary Sarcoidosis ». *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 41 (5) : 700-715. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709495>.
- Gustafsson, Maria V., Xiaowei Zheng, Teresa Pereira, Katarina Gradin, Shaobo Jin, Johan Lundkvist, Jorge L. Ruas, Lorenz Poellinger, Urban Lendahl, et Maria Bondesson. 2005. « Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state ». *Developmental Cell* 9 (5) : 617-28. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.010>.
- Hasday, J. D., P. R. Bachwich, J. P. Lynch, et R. G. Sitrin. 1988. « Procoagulant and plasminogen activator activities of bronchoalveolar fluid in patients with pulmonary sarcoidosis ». *Experimental Lung Research* 14 (2) : 261-78. <https://doi.org/10.3109/01902148809115128>.
- Hauber, H.-P., D. Gholami, A. Meyer, et A. Pforte. 2003. « Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis ». *Thorax* 58 (6) : 519-24. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.6.519>.
- Hawkins, Charlene, Guzel Shaginurova, D. Auriel Shelton, Jose D. Herazo-Maya, Kyra A. Oswald-Richter, Joseph E. Rotsinger, Anjuli Young, et al. 2017. « Local and Systemic CD4+ T Cell Exhaustion Reverses with Clinical Resolution of Pulmonary Sarcoidosis ». *Journal of Immunology Research* 2017 : 3642832. <https://doi.org/10.1155/2017/3642832>.

- Heij, Lara, Albert Dahan, et Elseke Hoitsma. 2012. « Sarcoidosis and pain caused by small-fiber neuropathy ». *Pain Research and Treatment* 2012 : 256024. <https://doi.org/10.1155/2012/256024>.
- Helming, Laura, Julia Winter, et Siamon Gordon. 2009. « The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 4): 453-59. <https://doi.org/10.1242/jcs.037200>.
- Hena, Kerry M., Jennifer Yip, Nadia Jaber, David Goldfarb, Kelly Fullam, Krystal Clevon, William Moir, et al. 2018. « Clinical Course of Sarcoidosis in World Trade Center-Exposed Firefighters ». *Chest* 153 (1) : 114-23. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.10.014>.
- Henry, M. T., K. McMahon, A. J. Mackarel, K. Prikk, T. Sorsa, P. Maisi, R. Sepper, M. X. Fitzgerald, et C. M. O'Connor. 2002. « Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF ». *The European Respiratory Journal* 20 (5) : 1220-27. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00022302>.
- Herbert, Cristan, Hasib Ahmadzai, et Paul S. Thomas. 2017. « Chapter 8 - Proinflammatory and Regulatory Cytokines in Sarcoidosis ». Dans *Cytokine Effector Functions in Tissues*. Sous la direction de Maria Foti et Massimo Locati, 129-38. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804214-4.00007-5>.
- Hernandez-Pando, R., Q. L. Bornstein, D. Aguilar Leon, E. H. Orozco, V. K. Madrigal, et E. Martinez Cordero. 2000. « Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells ». *Immunology* 100 (3) : 352-58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00025.x>.
- Heron, M., C. H. M. van Moorsel, J. C. Grutters, T. W. J. Huizinga, A. H. M. van der Helm-van Mil, M. M. Nagtegaal, H. J. T. Ruven, et J. M. M. van den Bosch. 2011. « Genetic variation in GREM1 is a risk factor for fibrosis in pulmonary sarcoidosis ». *Tissue Antigens* 77 (2) : 112-17. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01590.x>.
- Herrtwich, Laura, Indrajit Nanda, Konstantinos Evangelou, Teodora Nikolova, Veronika Horn, Sagar, Daniel Erny, et al. 2016. « DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas ». *Cell* 167 (5) : 1264-1280.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.054>.
- Higgins, Debra F., Mangatt P. Biju, Yasuhiro Akai, Anton Wutz, Randall S. Johnson, et Volker H. Haase. 2004. « Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1 ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 287 (6) : F1223-1232. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00245.2004>.
- Homma, J. Y., C. Abe, H. Chosa, K. Ueda, J. Saegusa, M. Nakayama, H. Homma, M. Washizaki, et H. Okano. 1978. « Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis ». *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 48 (3) : 251-55.
- Honda, Kenya, et Dan R. Littman. 2016. « The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease ». *Nature* 535 (7610) : 75-84. <https://doi.org/10.1038/nature18848>.
- Huang, Hui, Zhiwei Lu, Chunguo Jiang, Jia Liu, Yanxun Wang, et Zuojun Xu. 2013. « Imbalance between Th17 and regulatory T-Cells in sarcoidosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (11) : 21463-73. <https://doi.org/10.3390/ijms141121463>.
- Hudson, Christine C., Mei Liu, Gary G. Chiang, Diane M. Otterness, Dawn C. Loomis, Fiona Kaper, Amato J. Giaccia, et Robert T. Abraham. 2002. « Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (20) : 7004-14. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.20.7004-7014.2002>.
- Huitema, Marloes P., Harold Mathijssen, Johannes J. Mager, Repke J. Snijder, Jan C. Grutters, et Marco C. Post. 2020. « Sarcoidosis-Associated Pulmonary Hypertension ». *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 41 (5) : 659-72. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713615>.
- Huizar, Isham, Anagha Malur, Yasmeen A. Midgette, Cindy Kukoly, Pengyu Chen, Pu Chun Ke, Ramakrishna Podila, et al. 2011. « Novel murine model of chronic granulomatous lung inflammation elicited by carbon nanotubes ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45 (4) : 858-66. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0401OC>.
- Hunninghake, Gary W. 1985. « Bronchoalveolar T lymphocytes and pulmonary sarcoidosis ». *Clinical Reviews in Allergy* 3 (2) : 227-34. <https://doi.org/10.1007/BF02992985>.
- Huppertz, Christine, Benedikt Jäger, Grazyna Wiczorek, Peggy Engelhard, Stephen J. Oliver, Franz-Georg Bauernfeind, Amanda Littlewood-Evans, Tobias Welte, Veit Hornung, et Antje Prasse. 2020. « The NLRP3 inflammasome pathway is activated in sarcoidosis and involved in granuloma formation ». *The European Respiratory Journal* 55 (3). <https://doi.org/10.1183/13993003.00119-2019>.
- Hussell, Tracy, et Thomas J. Bell. 2014. « Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (2) : 81-93. <https://doi.org/10.1038/nri3600>.
- Hutton Carlsen, Katrina, Georg Larsen, et Jørgen Serup. 2020. « Tattoo pigment agglomerates measured in skin biopsies by computerised light microscopy: Study of 161 patients with adverse reactions in black and red tattoos ». *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 26 (2) : 284-91. <https://doi.org/10.1111/srt.12798>.

- Iannuzzi, Michael C., et Joseph R. Fontana. 2011. « Sarcoidosis: clinical presentation, immunopathogenesis, and therapeutics ». *JAMA* 305 (4) : 391-99. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.10>.
- Iannuzzi, Michael C., Benjamin A. Rybicki, et Alvin S. Teirstein. 2007. « Sarcoidosis ». *New England Journal of Medicine* 357 (21) : 2153-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071714>.
- Idali, F., J. Wahlström, C. Müller-Suur, A. Eklund, et J. Grunewald. 2008. « Analysis of regulatory T cell associated forkhead box P3 expression in the lungs of patients with sarcoidosis ». *Clinical and Experimental Immunology* 152 (1) : 127-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03609.x>.
- Idzkowska, E., A. Eljaszewicz, P. Miklasz, W. J. Musial, A. M. Tycinska, et M. Moniuszko. 2015. « The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes ». *Scandinavian Journal of Immunology* 82 (3) : 163-73. <https://doi.org/10.1111/sji.12314>.
- Iio, Kouji, Tomoe Ueno Iio, Yuhei Okui, Hirohisa Ichikawa, Yasushi Tanimoto, Nobuaki Miyahara, Arihiko Kanehiro, Mitsune Tanimoto, Yasunari Nakata, et Mikio Kataoka. 2010. « Experimental pulmonary granuloma mimicking sarcoidosis induced by Propionibacterium acnes in mice ». *Acta Medica Okayama* 64 (2) : 75-83. <https://doi.org/10.18926/AMO/32852>.
- Ionescu, Diana N., Jennifer L. Hunt, Daren Lomago, et Samuel A. Yousem. 2005. « Recurrent sarcoidosis in lung transplant allografts: granulomas are of recipient origin ». *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B* 14 (3) : 140-45. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000176765.26047.6f>.
- Isohisa, Taro, Jun Asai, Mai Kanemaru, Takahiro Arita, Miho Tsutsumi, Yuka Kaneko, Yukiyasu Arakawa, Makoto Wada, Eiichi Konishi, et Norito Katoh. 2020. « CD163-positive macrophage infiltration predicts systemic involvement in sarcoidosis ». *Journal of Cutaneous Pathology* 47 (7) : 584-91. <https://doi.org/10.1111/cup.13675>.
- Izbicki, Gabriel, Robert Chavko, Gisela I. Banauch, Michael D. Weiden, Kenneth I. Berger, Thomas K. Aldrich, Charles Hall, Kerry J. Kelly, et David J. Prezant. 2007. « World Trade Center “sarcoid-like” granulomatous pulmonary disease in New York City Fire Department rescue workers ». *Chest* 131 (5) : 1414-23. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2114>.
- J, Xaus, Besalduch N, Comalada M, Marcoval J, Pujol R, Mañá J, et Celada A. 2003. « High expression of p21 Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation. » *Journal of Leukocyte Biology* 74 (2) : 295-301. <https://doi.org/10.1189/jlb.1202628>.
- Jakubzick, Claudia, Emmanuel L. Gautier, Sophie L. Gibbings, Dorothy K. Sojka, Andreas Schlitzer, Theodore E. Johnson, Stoyan Ivanov, et al. 2013. « Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes ». *Immunity* 39 (3) : 599-610. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.007>.
- James, D. Geraint, et Om P. Sharma. 2002. « From Hutchinson to now: a historical glimpse ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 8 (5) : 416-23. <https://doi.org/10.1097/00063198-200209000-00013>.
- James, W. Ennis, et Robert Baughman. 2018. « Treatment of sarcoidosis: grading the evidence ». *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11 (7) : 677-87. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1486706>.
- Jamilloux, Yvan, Delphine Maucort-Boulch, Sébastien Kerever, Mathieu Gerfaud-Valentin, Christiane Broussolle, Mireille Eb, Dominique Valeyre, et Pascal Seve. 2016. « Sarcoidosis-related mortality in France: a multiple-cause-of-death analysis ». *The European Respiratory Journal* 48 (6) : 1700-1709. <https://doi.org/10.1183/13993003.00457-2016>.
- Jaumouillé, Valentin, et Sergio Grinstein. 2016. « Molecular Mechanisms of Phagosome Formation ». *Microbiology Spectrum* 4 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0013-2015>.
- Jeny, F., J.-F. Bernaudin, F. Cohen Aubart, P.-Y. Brillet, D. Bouvry, H. Nunes, et D. Valeyre. 2020. « Diagnosis issues in sarcoidosis ». *Respiratory Medicine and Research* 77 (mars) : 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.resmer.2019.09.002>.
- Jeny, Florence, Pierre-Yves Brillet, Young-Wouk Kim, Olivia Freynet, Hilario Nunes, et Dominique Valeyre. 2019. « The place of high-resolution computed tomography imaging in the investigation of interstitial lung disease ». *Expert Review of Respiratory Medicine* 13 (1) : 79-94. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1556639>.
- Jeny, Florence, et Jan C. Grutters. 2020. « Experimental models of sarcoidosis: where are we now? » *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, juillet. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000708>.
- Jeny, Florence, Yves Pacheco, Valerie Besnard, Dominique Valeyre, et Jean-François Bernaudin. 2016. « Experimental models of sarcoidosis ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 22 (5) : 492-99. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000295>.
- Jeny, Florence, Yurdagül Uzunhan, Maxime Lacroix, Thomas Gille, Pierre-Yves Brillet, Annelise Nardi, Diane Bouvry, Carole Planès, Hilario Nunes, et Dominique Valeyre. 2020. « Predictors of mortality in fibrosing pulmonary sarcoidosis ». *Respiratory Medicine* 169 (mai) : 105997. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105997>.
- Jeny, Florence, et Dominique Valeyre. 2019. « [Sarcoidosis] ». *La Revue Du Praticien* 69 (1) : 83-95.

- Jeon, Mi Hye, Taeuk Kang, Sang Hoon Yoo, Heather S. Swan, Hyun Jung Kim, et Hyeong Sik Ahn. 2020. « The incidence, comorbidity and mortality of sarcoidosis in Korea, 2008-2015: a nationwide population-based study ». *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases* 37 (1) : 24-26. <https://doi.org/10.36141/svldd.v37i1.7660>.
- Jiang, B. H., E. Rue, G. L. Wang, R. Roe, et G. L. Semenza. 1996. « Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (30) : 17771-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>.
- Jiang, Dingyuan, Xiaoxi Huang, Jing Geng, Run Dong, Shuhong Li, Zheng Liu, Chen Wang, et Huaping Dai. 2016. « Pulmonary fibrosis in a mouse model of sarcoid granulomatosis induced by booster challenge with *Propionibacterium acnes* ». *Oncotarget* 7 (23) : 33703-14. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9397>.
- Judson, Marc A. 2015. « The Clinical Features of Sarcoidosis: A Comprehensive Review ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 49 (1) : 63-78. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8450-y>.
- Judson, Marc A. 2020. « Environmental Risk Factors for Sarcoidosis ». *Frontiers in Immunology* 11 (juin) : 1340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01340>.
- Judson, Marc A., Ulrich Costabel, Marjolein Drent, Athol Wells, Lisa Maier, Laura Koth, Hidenobu Shigemitsu, et al. 2014. « The WASOG Sarcoidosis Organ Assessment Instrument: An update of a previous clinical tool ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 31 (1) : 19-27.
- Judson, Marc A., Richard M. Marchell, MaryAnn Mascelli, Alexa Piantone, Elliot S. Barnathan, Kevin J. Petty, Dion Chen, et al. 2012. « Molecular profiling and gene expression analysis in cutaneous sarcoidosis: The role of interleukin-12, interleukin-23, and the T-helper 17 pathway ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 66 (6) : 901-910.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.06.017>.
- Judson, Marc A., Bruce W. Thompson, David L. Rabin, Joanne Steimel, Genell L. Knatterud, Daniel T. Lackland, Cecile Rose, et al. 2003. « The diagnostic pathway to sarcoidosis ». *Chest* 123 (2) : 406-12.
- Jumeau, Claire, Fawaz Awad, Eman Assrawi, Laetitia Cobret, Philippe Duquesnoy, Irina Giurgea, Dominique Valeyre, et al. 2019. « Expression of SAA1, SAA2 and SAA4 genes in human primary monocytes and monocyte-derived macrophages ». *PLoS One* 14 (5) : e0217005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217005>.
- Kaiser, Ylva, Rico Lepzien, Susanna Kullberg, Anders Eklund, Anna Smed-Sörensen, et Johan Grunewald. 2016. « Expanded lung T-bet+ROR γ T+ CD4+ T-cells in sarcoidosis patients with a favourable disease phenotype ». *The European Respiratory Journal* 48 (2) : 484-94. <https://doi.org/10.1183/13993003.00092-2016>.
- Kambouchner, M., D. Pirici, J.-F. Uhl, L. Mogoanta, D. Valeyre, et J.-F. Bernaudin. 2011. « Lymphatic and blood microvasculature organisation in pulmonary sarcoid granulomas ». *The European Respiratory Journal* 37 (4) : 835-40. <https://doi.org/10.1183/09031936.00086410>.
- Kamphuis, Lieke S., Femke Bonte-Mineur, Jan A. van Laar, P. Martin van Hagen, et Paul L. van Daele. 2014. « Calcium and vitamin D in sarcoidosis: is supplementation safe? ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 29 (11) : 2498-2503. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2262>.
- Kamphuis, Lieke S., Menno C. van Zelm, King H. Lam, Guus F. Rimmelzwaan, G. Seerp Baarsma, Willem A. Dik, H. Bing Thio, et al. 2013. « Perigranuloma localization and abnormal maturation of B cells: emerging key players in sarcoidosis? ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (4) : 406-16. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1024OC>.
- Kapellos, Theodore S., Lorenzo Bonaguro, Ioanna Gemünd, Nico Reusch, Adem Saglam, Emily R. Hinkley, et Joachim L. Schultze. 2019. « Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>.
- Karakaya, Bekir, Ylva Kaiser, Coline H. M. van Moorsel, et Johan Grunewald. 2017. « Löfgren's Syndrome: Diagnosis, Management, and Disease Pathogenesis ». *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 38 (4) : 463-76. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1602380>.
- Katchar, Kianoosh, Jan Wahlström, Anders Eklund, et Johan Grunewald. 2001. « Highly Activated T-Cell Receptor AV2S3+ CD4+ Lung T-Cell Expansions in Pulmonary Sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (7) : 1540-45. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2005028>.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2011. « Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity ». *Immunity* 34 (5) : 637-50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>.
- Kawanami, O., F. Basset, V. J. Ferrans, P. Soler, et R. G. Crystal. 1981. « Pulmonary Langerhans' cells in patients with fibrotic lung disorders ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 44 (3) : 227-33.
- Kearney, Gregory D., Ogugua Ndili Obi, Veeranna Maddipati, Arjun Mohan, Anagha Malur, J. Christopher Carter, et Mary Jane Thomassen. 2019. « Sarcoidosis deaths in the United States: 1999–2016 ». *Respiratory*

- Medicine* 149 (mars) : 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.11.010>.
- Keeley, Thomas P., et Giovanni E. Mann. 2019. « Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans ». *Physiological Reviews* 99 (1) : 161-234. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2017>.
- Keijsers, Ruth G. M., et Jan C. Grutters. 2020. « In Which Patients with Sarcoidosis Is FDG PET/CT Indicated? » *Journal of Clinical Medicine* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/jcm9030890>.
- Kelly, Brian D., Sean F. Hackett, Kiichi Hirota, Yuji Oshima, Zheqing Cai, Shannon Berg-Dixon, Ashley Rowan, Zhijiang Yan, Peter A. Campochiaro, et Gregg L. Semenza. 2003. « Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1 ». *Circulation Research* 93 (11) : 1074-81. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000102937.50486.1B>.
- Keogh, B. A., G. W. Hunninghake, B. R. Line, et R. G. Crystal. 1983. « The alveolitis of pulmonary sarcoidosis. Evaluation of natural history and alveolitis-dependent changes in lung function ». *The American Review of Respiratory Disease* 128 (2) : 256-65. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.128.2.256>.
- Kindt, Astrid, Keld-Erik Byg, Jimmi Wied, Torkell Ellingsen, Jesper Rømhild Davidsen, et Jakob Grauslund. 2020. « Altered retinal oxygen metabolism in patients with combined ocular and central nervous system sarcoidosis ». *Rheumatology*, n° keaa781 (décembre). <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa781>.
- Kirkegaard, Julius B, Ambre Bouillant, Alan O Marron, Kyriacos C Leptos, et Raymond E Goldstein. 2016. « Aerotaxis in the closest relatives of animals ». Sous la direction de Richard M Berry. *ELife* 5 (novembre) : e18109. <https://doi.org/10.7554/eLife.18109>.
- Kirkil, Gamze, Elyse E. Lower, et Robert P. Baughman. 2018. « Predictors of Mortality in Pulmonary Sarcoidosis ». *Chest* 153 (1) : 105-13. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.07.008>.
- Kishi, J., Y. Nishioka, T. Kuwahara, S. Kakiuchi, M. Azuma, Y. Aono, H. Makino, et al. 2011. « Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice ». *The European Respiratory Journal* 38 (2) : 415-24. <https://doi.org/10.1183/09031936.00070610>.
- Kishimoto, Izumi, Chuyen Thi Hong Nguyen, Naotomo Kambe, Nhung Thi My Ly, Yoko Ueki, Ikuko Ueda-Hayakawa, et Hiroyuki Okamoto. 2020. « Circulating intermediate monocytes produce TARC in sarcoidosis ». *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 69 (2) : 310-12. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.09.005>.
- Knaup, Karl X., Katrin Jozefowski, Regina Schmidt, Wanja M. Bernhardt, Alexander Weidemann, Jan Steffen Juergensen, Christina Warnecke, Kai-Uwe Eckardt, et Michael S. Wiesener. 2009. « Mutual regulation of hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin as a function of oxygen availability ». *Molecular cancer research: MCR* 7 (1) : 88-98. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0288>.
- Knochelmann, Hannah M., Connor J. Dwyer, Stefanie R. Bailey, Sierra M. Amaya, Dirk M. Elston, Joni M. Mazza-McCrann, et Chrystal M. Paulos. 2018. « When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity ». *Cellular & Molecular Immunology* 15 (5) : 458-69. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0004-4>.
- Kobak, Senol, Hatice Yilmaz, Fidan Sever, Arzu Duran, Nazime Sen, et Ahmet Karaarslan. 2014. « The prevalence of antinuclear antibodies in patients with sarcoidosis ». *Autoimmune Diseases* 2014 : 351852. <https://doi.org/10.1155/2014/351852>.
- Koeppen, Michael, Jae W. Lee, Seong-Wook Seo, Kelley S. Brodsky, Simone Kreth, Ivana V. Yang, Peter M. Buttrick, Tobias Eckle, et Holger K. Eltzschig. 2018. « Hypoxia-inducible factor 2-alpha-dependent induction of amphiregulin dampens myocardial ischemia-reperfusion injury ». *Nature Communications* 9 (1) : 816. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03105-2>.
- Kouranos, Vasileios, Simon Ward, Maria A. Kokosi, Diego Castillo, Felix Chua, Eoin P. Judge, Suzie Thomas, et al. 2020. « Mixed Ventilatory Defects in Pulmonary Sarcoidosis: Prevalence and Clinical Features ». *Chest* 158 (5) : 2007-14. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.074>.
- Kraaijvanger, Raisa, Montse Janssen Bonás, Adriane D. M. Vorselaars, et Marcel Veltkamp. 2020. « Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Sarcoidosis: Current Use and Future Prospects ». *Frontiers in Immunology* 11 : 1443. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01443>.
- Kriegova, E., R. Fillerova, T. Tomankova, B. Hutyrova, F. Mrazek, T. Tichy, V. Kolek, R. M. du Bois, et M. Petrek. 2011. « T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis ». *European Respiratory Journal* 38 (5) : 1136-44. <https://doi.org/10.1183/09031936.00089910>.
- Kron, Jordana, Adolfo Gabriele Mauro, Aldo Bonaventura, Stefano Toldo, Fadi N. Salloum, Kenneth A. Ellenbogen, et Antonio Abbate. 2019. « Inflammasome Formation in Granulomas in Cardiac Sarcoidosis ». *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 12 (9) : e007582. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.119.007582>.
- Kruit, Adrian, Jan C. Grutters, Henk J. T. Ruven, Coline H. M. van Moorsel, Ralf Weiskirchen, Senait Mengsteab, et Jules M. M. van den Bosch. 2006. « Transforming growth factor-beta gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis ». *Chest* 129 (6) : 1584-91.

- <https://doi.org/10.1378/chest.129.6.1584>.
- Kubota, R., S. Yamada, K. Kubota, K. Ishiwata, N. Tamahashi, et T. Ido. 1992. « Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 33 (11) : 1972-80.
- Lacronique, J., J. F. Bernaudin, P. Soler, F. Lange, O. Kawanami, G. Saumon, R. Georges, et F. Basset. 1983. « Alveolitis and granulomas: sequential course in pulmonary sarcoidosis ». *Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Pergamon Press, Paris*, 36-42.
- Lahat, Nitza, Michal A. Rahat, Mouna Ballan, Lea Weiss-Cerem, Miri Engelmayer, et Haim Bitterman. 2003. « Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF-alpha secretion ». *Journal of Leukocyte Biology* 74 (2) : 197-205. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303105>.
- Lamberto, Christine, Hilario Nunes, Philippe Le Toumelin, Florence Duperron, Dominique Valeyre, et Christine Clerici. 2004. « Membrane and capillary blood components of diffusion capacity of the lung for carbon monoxide in pulmonary sarcoidosis: relation to exercise gas exchange ». *Chest* 125 (6) : 2061-68. <https://doi.org/10.1378/chest.125.6.2061>.
- Land, Stephen C., et Andrew R. Tee. 2007. « Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (28) : 20534-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611782200>.
- Landi, C., E. Bargagli, A. Carleo, L. Bianchi, A. Gagliardi, G. Cillis, M. G. Perari, et al. 2015. « A functional proteomics approach to the comprehension of sarcoidosis ». *Journal of Proteomics* 128 (octobre) : 375-87. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.012>.
- Larsson, Johanna, Pål Graff, Ing-Liss Bryngelsson, et Per Vihlborg. 2020. « Sarcoidosis and increased risk of comorbidities and mortality in sweden ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 37 (2) : 104-35. <https://doi.org/10.36141/svldd.v37i2.9142>.
- Lavallard, Vanessa, David Cottet-Dumoulin, Charles-Henri Wassmer, Caroline Rouget, Géraldine Parnaud, Estelle Brioude, Fanny Lebreton, et al. 2020. « NLRP3 Inflammasome is Activated in Rat Pancreatic Islets by Transplantation and Hypoxia ». *Scientific Reports* 10 (1) : 7011. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64054-9>.
- Lazar, Michael H., Paul J. Christensen, Ming Du, Bi Yu, Natalya M. Subbotina, Kerstin E. Hanson, Jean M. Hansen, Eric S. White, Richard H. Simon, et Thomas H. Sisson. 2004. « Plasminogen activator inhibitor-1 impairs alveolar epithelial repair by binding to vitronectin ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31 (6) : 672-78. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0025OC>.
- Le Pavec, Jérôme, Dominique Valeyre, Pierre Gazengel, Are M. Holm, Hans Henrik Schultz, Michael Perch, Aurélie Le Borgne, et al. 2021. « Lung transplantation for sarcoidosis: outcome and prognostic factors ». *The European Respiratory Journal*, janvier. <https://doi.org/10.1183/13993003.03358-2020>.
- Le, Thanh-Thuy T., Harry Karmouty-Quintana, Ernestina Melicoff, Thanh-Truc T. Le, Tingting Weng, Ning-Yuan Chen, Mesias Pedroza, et al. 2014. « Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (7) : 3755-68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302470>.
- Leblond, Marine M., Aurélie N. Gérald, Aurélien Corroyer-Dulmont, Eric T. MacKenzie, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, et Samuel Valable. 2016. « Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models ». *Oncoimmunology* 5 (1) : e1056442. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1056442>.
- Lee, Hewang, Michael B. Fessler, Peng Qu, Jurgen Heymann, et Jeffrey B. Kopp. 2020. « Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease ». *BMC nephrology* 21 (1) : 270. <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01921-7>.
- Lee, Nam-Sihk, Laura Barber, Ali Kanchwala, Carter J. H. Childs, Yash P. Kataria, Marc A. Judson, Mark A. Mazer, et Sergio Arce. 2011. « Low levels of NF-κB/p65 mark anergic CD4+ T cells and correlate with disease severity in sarcoidosis ». *Clinical and vaccine immunology: CVI* 18 (2) : 223-34. <https://doi.org/10.1128/CVI.00469-10>.
- Lem, V. M., M. F. Lipscomb, J. C. Weissler, G. Nunez, E. J. Ball, P. Stastny, et G. B. Toews. 1985. « Bronchoalveolar cells from sarcoid patients demonstrate enhanced antigen presentation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 135 (3) : 1766-71.
- Lepzien, Rico, Sang Liu, Paulo Czarnewski, Mu Nie, Björn Österberg, Faezzah Baharom, Jamshid Pourazar, et al. 2021. « Monocytes in sarcoidosis are potent TNF producers and predict disease outcome ». *The European Respiratory Journal*, janvier. <https://doi.org/10.1183/13993003.03468-2020>.
- Lepzien, Rico, Gregory Rankin, Jamshid Pourazar, Ala Muala, Anders Eklund, Johan Grunewald, Anders Blomberg, et Anna Smed-Sörensen. 2019. « Mapping mononuclear phagocytes in blood, lungs, and lymph nodes of sarcoidosis patients ». *Journal of Leukocyte Biology* 105 (4) : 797-807. <https://doi.org/10.1002/JLB.5A0718-280RR>.

- Lewis, Amy, et Philip M. Elks. 2019. « Hypoxia Induces Macrophage tnf α Expression via Cyclooxygenase and Prostaglandin E2 in vivo ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02321>.
- Lhote, Raphael, Isabella Annesi-Maesano, Hilario Nunes, David Launay, Raphael Borie, Karim Sacré, Nicolas Schleinitz, et al. 2020. « Clinical phenotypes of extrapulmonary sarcoidosis: an analysis of a French, multiethnic, multicenter cohort ». *The European Respiratory Journal*, octobre. <https://doi.org/10.1183/13993003.01160-2020>.
- Li, Xinjun, Jan Sundquist, Tsuyoshi Hamano, et Kristina Sundquist. 2019. « Neighborhood Deprivation and Risks of Autoimmune Disorders: A National Cohort Study in Sweden ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (20). <https://doi.org/10.3390/ijerph16203798>.
- Liegeois, Maude, Celine Legrand, Christophe J. Desmet, Thomas Marichal, et Fabrice Bureau. 2018. « The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity ». *Cellular Immunology* 330 (août) : 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.001>.
- Lin, Nan, et M. Celeste Simon. 2016. « Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (10) : 3661-71. <https://doi.org/10.1172/JCI84426>.
- Linke, Monika, Ha Thi Thanh Pham, Karl Katholnig, Thomas Schnöller, Anne Miller, Florian Demel, Birgit Schütz, et al. 2017. « Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression ». *Nature Immunology* 18 (3) : 293-302. <https://doi.org/10.1038/ni.3655>.
- Lioy, Paul J., Clifford P. Weisel, James R. Millette, Steven Eisenreich, Daniel Vallero, John Offenberg, Brian Buckley, et al. 2002. « Characterization of the dust/smoke aerosol that settled east of the World Trade Center (WTC) in lower Manhattan after the collapse of the WTC 11 September 2001 ». *Environmental Health Perspectives* 110 (7) : 703-14. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110703>.
- Liu, Minna, Xiaoxuan Ning, Rong Li, Zhen Yang, Xiaoxia Yang, Shiren Sun, et Qi Qian. 2017. « Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21 (7) : 1248-59. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13060>.
- Liu, Yongzhe, Lan Qiu, Yanxun Wang, Halimulati Aimurola, Yuyue Zhao, Shan Li, et Zuojun Xu. 2016. « The Circulating Treg/Th17 Cell Ratio Is Correlated with Relapse and Treatment Response in Pulmonary Sarcoidosis Patients after Corticosteroid Withdrawal ». *PloS One* 11 (2) : e0148207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148207>.
- Locke, Landon W., Elliott D. Crouser, Peter White, Mark W. Julian, Evelyn Guirado Caceres, Audrey C. Papp, Van T. Le, Wolfgang Sadee, et Larry S. Schlesinger. 2019. « IL-13-regulated Macrophage Polarization during Granuloma Formation in an In Vitro Human Sarcoidosis Model ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 60 (1) : 84-95. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0053OC>.
- Locke, Landon W., Larry S. Schlesinger, et Elliott D. Crouser. 2020. « Current Sarcoidosis Models and the Importance of Focusing on the Granuloma ». *Frontiers in Immunology* 11 : 1719. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01719>.
- Lockstone, Helen E., Sharon Sanderson, Nina Kulakova, Dilair Baban, Andrew Leonard, Wai Ling Kok, Simon McGowan, Andrew J. McMichael, et Ling-Pei Ho. 2010. « Gene set analysis of lung samples provides insight into pathogenesis of progressive, fibrotic pulmonary sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (12) : 1367-75. <https://doi.org/10.1164/rccm.200912-1855OC>.
- Love, Charito, Maria B. Tomas, Gene G. Tronco, et Christopher J. Palestro. 2005. « FDG PET of infection and inflammation ». *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc* 25 (5) : 1357-68. <https://doi.org/10.1148/rg.255045122>.
- Lower, Elyse E., Madison Sturdivant, et Robert P. Baughman. 2019. « Presence of onconeural antibodies in sarcoidosis patients with parasarcoidosis syndrome ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 36 (4) : 254-60. <https://doi.org/10.36141/svdld.v36i4.8745>.
- Lukacs, N. W., C. Hogaboam, S. W. Chensue, K. Blease, et S. L. Kunkel. 2001. « Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis ». *Chest* 120 (1 Suppl) : 5S-8S. https://doi.org/10.1378/chest.120.1_suppl.s5.
- Lyons, R. M., L. E. Gentry, A. F. Purchio, et H. L. Moses. 1990. « Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin ». *The Journal of Cell Biology* 110 (4) : 1361-67. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1361>.
- Malur, Anagha, Arjun Mohan, Robert A. Barrington, Nancy Leffler, Amrita Malur, Barbara Muller-Borer, Gina Murray, et al. 2019. « Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Deficiency Exacerbates Fibrotic Response to Mycobacteria Peptide in Murine Sarcoidosis Model ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 61 (2) : 198-208. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0346OC>.
- Mañá, J., A. Salazar, et F. Manresa. 1994. « Clinical factors predicting persistence of activity in sarcoidosis: a multivariate analysis of 193 cases ». *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 61 (4) :

- 219-25. <https://doi.org/10.1159/000196341>.
- Mañá, Juan, Manuel Rubio-Rivas, Nadia Villalba, Joaquim Marcoval, Adriana Iriarte, María Molina-Molina, Roger Llatjos, et al. 2017. « Multidisciplinary approach and long-term follow-up in a series of 640 consecutive patients with sarcoidosis ». *Medicine* 96 (29). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007595>.
- Manabe, Osamu, Kenji Hirata, Okamoto Shozo, Tohru Shiga, Yuko Uchiyama, Kentaro Kobayashi, Shiro Watanabe, et al. 2017. « 18F-fluoromisonidazole (FMISO) PET may have the potential to detect cardiac sarcoidosis ». *Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 24 (1) : 329-31. <https://doi.org/10.1007/s12350-016-0495-2>.
- Mancino, Alessandra, Tiziana Schioppa, Paola Larghi, Fabio Pasqualini, Manuela Nebuloni, I.-Hsuan Chen, Silvano Sozzani, Jonathan M. Austyn, Alberto Mantovani, et Antonio Sica. 2008. « Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions ». *Blood* 112 (9) : 3723-34. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142091>.
- Mantovani, Alberto, Antonio Sica, et Massimo Locati. 2005. « Macrophage Polarization Comes of Age ». *Immunity* 23 (4) : 344-46. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.10.001>.
- Mantovani, Alberto, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunziata Vecchi, et Massimo Locati. 2004. « The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization ». *Trends in Immunology* 25 (12) : 677-86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- Marshall, Jean S., Richard Warrington, Wade Watson, et Harold L. Kim. 2018. « An introduction to immunology and immunopathology ». *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 14 (2) : 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.
- Martin, Sophie Grivaud, Louis-Philippe Kronek, Dominique Valeyre, Nadia Brauner, Pierre-Yves Brillet, Hilario Nunes, Michel W. Brauner, et Frédérique Réty. 2010. « High-resolution computed tomography to differentiate chronic diffuse interstitial lung diseases with predominant ground-glass pattern using logical analysis of data ». *European Radiology* 20 (6) : 1297-1310. <https://doi.org/10.1007/s00330-009-1671-4>.
- McCaskill, Joshua G., Kelly D. Chason, Xiaoyang Hua, Isabel P. Neuringer, Andrew J. Ghio, William K. Funkhouser, et Stephen L. Tilley. 2006. « Pulmonary immune responses to *Propionibacterium acnes* in C57BL/6 and BALB/c mice ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35 (3) : 347-56. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0285OC>.
- McGeachy, Mandy J., Daniel J. Cua, et Sarah L. Gaffen. 2019. « The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease ». *Immunity* 50 (4) : 892-906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>.
- McGettrick, Anne F., et Luke A. J. O'Neill. 2020. « The Role of HIF in Immunity and Inflammation ». *Cell Metabolism* 32 (4) : 524-36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002>.
- Mercer, Robert R., Ann F. Hubbs, James F. Scabilloni, Liying Wang, Lori A. Battelli, Sherri Friend, Vincent Castranova, et Dale W. Porter. 2011. « Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes ». *Particle and Fibre Toxicology* 8 (juillet) : 21. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-21>.
- Michalek, Ryan D., Valerie A. Gerriets, Sarah R. Jacobs, Andrew N. Macintyre, Nancie J. MacIver, Emily F. Mason, Sarah A. Sullivan, Amanda G. Nichols, et Jeffrey C. Rathmell. 2011. « Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (6) : 3299-3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>.
- Miedema, Jelle R., Ylva Kaiser, Caroline E. Broos, Marlies S. Wijsenbeek, Johan Grunewald, et Mirjam Kool. 2018. « Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe? ». *Journal of Autoimmunity* 87 (février) : 82-96. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.012>.
- Milman, N., C. B. Andersen, C. M. Burton, et M. Iversen. 2005. « Recurrent sarcoid granulomas in a transplanted lung derive from recipient immune cells ». *The European Respiratory Journal* 26 (3) : 549-52. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00127404>.
- Minami, Junko, Yoshinobu Eishi, Yuki Ishige, Intetsu Kobayashi, Ikuo Ishige, Daisuke Kobayashi, Noboru Ando, et al. 2003. « Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein of *Propionibacterium acnes* ». *Journal of Medical and Dental Sciences* 50 (4) : 265-74.
- Mirsaeidi, Mehdi, Hesham R. Omar, Andrew Calzadilla, Ahmad El Khatib, Philip Whitney, Nadera Sweiss, Daniel Culver, Michael Campos, Robert Baughman, et Roberto Machado. 2018. « Circulatory TGF-beta1 is significantly higher in early stage of pulmonary sarcoidosis ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 35 (3) : 213-17. <https://doi.org/10.36141/svdld.v35i3.6112>.
- Misharin, Alexander V., Luisa Morales-Nebreda, Paul A. Reyfman, Carla M. Cuda, James M. Walter, Alexandra C. McQuattie-Pimentel, Ching-I. Chen, et al. 2017. « Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8) : 2387-2404. <https://doi.org/10.1084/jem.20162152>.
- Miyara, Makoto, Zahir Amoura, Christophe Parizot, Cécile Badoual, Karim Dorgham, Salim Trad, Marianne Kambouchner, et al. 2006. « The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells ». *The Journal of*

- Experimental Medicine* 203 (2) : 359-70. <https://doi.org/10.1084/jem.20050648>.
- Mohan, Arjun, Anagha Malur, Matthew McPeck, Barbara P. Barna, Lynn M. Schnapp, Mary Jane Thomassen, et Sina A. Gharib. 2018. « Transcriptional survey of alveolar macrophages in a murine model of chronic granulomatous inflammation reveals common themes with human sarcoidosis ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 314 (4) : L617-25. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00289.2017>.
- Moller, D. R., J. D. Forman, M. C. Liu, P. W. Noble, B. M. Greenlee, P. Vyas, D. A. Holden, et al. 1996. « Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156 (12) : 4952-60.
- Moon, Jeon-Ok, Timothy P. Welch, Frank J. Gonzalez, et Bryan L. Copple. 2009. « Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 296 (3) : G582-592. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90368.2008>.
- Morales-Nebreda, Luisa, Alexander V. Misharin, Harris Perlman, et G. R. Scott Budinger. 2015. « The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 24 (137) : 505-9. <https://doi.org/10.1183/16000617.0031-2015>.
- Moreno Roig, Eloy, Ala Yaromina, Ruud Houben, Arjan J. Groot, Ludwig Dubois, et Marc Vooijs. 2018. « Prognostic Role of Hypoxia-Inducible Factor-2 α Tumor Cell Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis ». *Frontiers in Oncology* 8 (juin). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00224>.
- Morishita, Eriko, Akiko Sekiya, Tomoe Hayashi, Yasuko Kadohira, Mio Maekawa, Masahide Yamazaki, Hidesaku Asakura, Shinji Nakao, et Shigeki Ohtake. 2008. « Increased macrophage colony-stimulating factor levels in patients with Graves' disease ». *International Journal of Hematology* 88 (3) : 272-77. <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0155-7>.
- Mosser, David M., et Justin P. Edwards. 2008. « Exploring the full spectrum of macrophage activation ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (12) : 958-69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Mosser, David M., Kajal Hamidzadeh, et Ricardo Goncalves. 2021. « Macrophages and the maintenance of homeostasis ». *Cellular & Molecular Immunology* 18 (3) : 579-87. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00541-3>.
- Mostard, Rémy L. M., Johny A. Verschakelen, Marinus J. P. G. van Kroonenburgh, Patty J. Nelemans, Petal A. H. M. Wijnen, Stefan Vöö, et Marjolein Drent. 2013. « Severity of pulmonary involvement and (18)F-FDG PET activity in sarcoidosis ». *Respiratory Medicine* 107 (3) : 439-47. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.11.011>.
- Mowat, Allan McI, Charlotte L. Scott, et Calum C. Bain. 2017. « Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges ». *Nature Medicine* 23 (11) : 1258-70. <https://doi.org/10.1038/nm.4430>.
- Müller, N. L., P. Kullnig, et R. R. Miller. 1989. « The CT findings of pulmonary sarcoidosis: analysis of 25 patients ». *AJR. American journal of roentgenology* 152 (6) : 1179-82. <https://doi.org/10.2214/ajr.152.6.1179>.
- Murdoch, J., et N. L. Müller. 1992. « Pulmonary sarcoidosis: changes on follow-up CT examination ». *AJR. American journal of roentgenology* 159 (3) : 473-77. <https://doi.org/10.2214/ajr.159.3.1503008>.
- Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdt, Siamon Gordon, et al. 2014. « Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines ». *Immunity* 41 (1) : 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.
- Myatt, N., G. Coghill, K. Morrison, D. Jones, et I. A. Cree. 1994. « Detection of tumour necrosis factor alpha in sarcoidosis and tuberculosis granulomas using in situ hybridisation ». *Journal of Clinical Pathology* 47 (5) : 423-26. <https://doi.org/10.1136/jcp.47.5.423>.
- Naccache, Jean-Marc, Armelle Lavolé, Hilario Nunes, Christine Lamberto, Philippe Letoumelin, Michel Brauner, Dominique Valeyre, et Pierre Yves Brillet. 2008. « High-resolution computed tomographic imaging of airways in sarcoidosis patients with airflow obstruction ». *Journal of Computer Assisted Tomography* 32 (6) : 905-12. <https://doi.org/10.1097/RCT.0b013e31815b63dd>.
- Nakatsu, Masashi, Hiroto Hatabu, Kenji Morikawa, Hidemasa Uematsu, Yoshiharu Ohno, Koichi Nishimura, Sonoko Nagai, Takateru Izumi, Junji Konishi, et Harumi Itoh. 2002. « Large coalescent parenchymal nodules in pulmonary sarcoidosis: "sarcoid galaxy" sign ». *AJR. American journal of roentgenology* 178 (6) : 1389-93. <https://doi.org/10.2214/ajr.178.6.1781389>.
- Nardi, A., P.-Y. Brillet, P. Letoumelin, F. Girard, M. Brauner, Y. Uzunhan, J.-M. Naccache, D. Valeyre, et H. Nunes. 2011. « Stage IV sarcoidosis: comparison of survival with the general population and causes of death ». *The European Respiratory Journal* 38 (6) : 1368-73. <https://doi.org/10.1183/09031936.00187410>.
- Natarajan, Bhargavi, Vikas Arige, Abrar A. Khan, S. Santosh Reddy, Manoj K. Barthwal, et Nitish R. Mahapatra. 2020. « Hypoxia-mediated regulation of mitochondrial transcription factors in renal epithelial cells:

- implications for hypertensive renal physiology ». *Hypertension Research*, septembre, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41440-020-00539-4>.
- Neville, E., A. N. Walker, et D. G. James. 1983. « Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis: an analysis of 818 patients ». *The Quarterly Journal of Medicine* 52 (208) : 525-33.
- Newman, Lee S., Cecile S. Rose, Eddy A. Bresnitz, Milton D. Rossman, Juliana Barnard, Margaret Frederick, Michael L. Terrin, et al. 2004. « A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170 (12) : 1324-30. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-249OC>.
- Nguyen, Chuyen Thi Hong, Naotomo Kambe, Ikuko Ueda-Hayakawa, Izumi Kishimoto, Nhung Thi My Ly, Kana Mizuno, et Hiroyuki Okamoto. 2018. « TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis ». *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 67 (4) : 487-95. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.02.011>.
- Nicod, L. P., et P. Isler. 1997. « Alveolar macrophages in sarcoidosis coexpress high levels of CD86 (B7.2), CD40, and CD30L ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 17 (1) : 91-96. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.1.2781>.
- Nishimura, K., H. Itoh, M. Kitaichi, S. Nagai, et T. Izumi. 1993. « Pulmonary sarcoidosis: correlation of CT and histopathologic findings ». *Radiology* 189 (1) : 105-9. <https://doi.org/10.1148/radiology.189.1.8372178>.
- Nishioka, Y., K. Manabe, J. Kishi, W. Wang, M. Inayama, M. Azuma, et S. Sone. 2007. « CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages ». *Clinical and Experimental Immunology* 149 (2) : 317-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03423.x>.
- Nishiwaki, Tetsu, Hiroyuki Yoneyama, Yoshinobu Eishi, Naoki Matsuo, Koichiro Tatsumi, Hiroshi Kimura, Takayuki Kuriyama, et Kouji Matsushima. 2004. « Indigenous Pulmonary Propionibacterium acnes Primes the Host in the Development of Sarcoid-Like Pulmonary Granulomatosis in Mice ». *The American Journal of Pathology* 165 (2) : 631-39.
- Niu, Guilian, Jon Briggs, Jiehui Deng, Yihong Ma, Heehyoung Lee, Marcin Kortylewski, Maciej Kujawski, et al. 2008. « Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1alpha RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells ». *Molecular cancer research: MCR* 6 (7) : 1099-1105. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2177>.
- Nobata, Kouichi, Takahiko Kasai, Masaki Fujimura, Masayuki Mizuguchi, Kouichi Nishi, Yoshihisa Ishiura, Masahide Yasui, et Shinji Nakao. 2006. « Pulmonary sarcoidosis with usual interstitial pneumonia distributed predominantly in the lower lung fields ». *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 45 (6) : 359-62. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.45.1385>.
- Nonnenmacher, Yannic, et Karsten Hiller. 2018. « Biochemistry of proinflammatory macrophage activation ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 75 (12) : 2093-2109. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2784-1>.
- Norman, Jill T., Ian M. Clark, et Patricia L. Garcia. 2000. « Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts ». *Kidney International* 58 (6) : 2351-66. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00419.x>.
- Nunes, Hilario, Yurdagul Uzunhan, Thomas Gille, Christine Lamberto, Dominique Valeyre, et Pierre-Yves Brillet. 2012. « Imaging of sarcoidosis of the airways and lung parenchyma and correlation with lung function ». *The European Respiratory Journal* 40 (3) : 750-65. <https://doi.org/10.1183/09031936.00025212>.
- Oberstein, A., H. von Zitzewitz, F. Schweden, et J. Müller-Quernheim. 1997. « Non invasive evaluation of the inflammatory activity in sarcoidosis with high-resolution computed tomography ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 14 (1) : 65-72.
- Oltmanns, Ute, Bernd Schmidt, Soeren Hoernig, Christian Witt, et Matthias John. 2003. « Increased spontaneous interleukin-10 release from alveolar macrophages in active pulmonary sarcoidosis ». *Experimental Lung Research* 29 (5) : 315-28. <https://doi.org/10.1080/01902140303786>.
- Ortiz-Masià, Dolores, Irene Díez, Sara Calatayud, Carlos Hernández, Jesús Cosín-Roger, Joaquín Hinojosa, Juan V. Esplugues, et María D. Barrachina. 2012. « Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process ». *PloS One* 7 (10) : e48535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048535>.
- Oswald-Richter, Kyrá A., Bradley W. Richmond, Nicole A. Braun, Joan Isom, Susamma Abraham, Thyneice R. Taylor, John M. Drake, Daniel A. Culver, David S. Wilkes, et Wonder P. Drake. 2013. « Reversal of global CD4+ subset dysfunction is associated with spontaneous clinical resolution of pulmonary sarcoidosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (11) : 5446-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202891>.
- Ota, M., R. Amakawa, K. Uehira, T. Ito, Y. Yagi, A. Oshiro, Y. Date, et al. 2004. « Involvement of dendritic cells in sarcoidosis ». *Thorax* 59 (5) : 408-13. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.006049>.
- Otsuka, Goro, Ramtin Agah, Andrew D. Frutkin, Thomas N. Wight, et David A. Dichek. 2006. « Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor-1-dependent

- pathways ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (4): 737-43. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000201087.23877.e1>.
- Pabst, S., G. Baumgarten, A. Stremmel, M. Lennarz, P. Knüfermann, A. Gillissen, H. Vetter, et C. Grohé. 2006. « Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis ». *Clinical and Experimental Immunology* 143 (3): 420-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03008.x>.
- Pabst, S., T. Fränken, J. Schönau, S. Stier, G. Nickenig, R. Meyer, D. Skowasch, et C. Grohé. 2011. « Transforming growth factor- β gene polymorphisms in different phenotypes of sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 38 (1): 169-75. <https://doi.org/10.1183/09031936.00120410>.
- Pacheco, Yves, Clarice X. Lim, Thomas Weichhart, Dominique Valeyre, Abderrazzak Bentaher, et Alain Calender. 2020. « Sarcoidosis and the mTOR, Rac1, and Autophagy Triad ». *Trends in Immunology* 41 (4): 286-99. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.01.007>.
- Pacheco, Yves, Marine Ponchon, Serge Lebecque, Alain Calender, Jean François Bernaudin, Dominique Valeyre, Marc Iglarz, et al. 2018. « Granulomatous lung inflammation is nanoparticle type-dependent ». *Experimental Lung Research* 44 (1): 25-39. <https://doi.org/10.1080/01902148.2017.1412541>.
- Pagán, Antonio J., et Lalita Ramakrishnan. 2018. « The Formation and Function of Granulomas ». *Annual Review of Immunology* 36: 639-65. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100022>.
- Pagé, Elisabeth L., Geneviève A. Robitaille, Jacques Pouyssegur, et Darren E. Richard. 2002. « Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 48403-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209114200>.
- Palazon, Asis, Ananda W. Goldrath, Victor Nizet, et Randall S. Johnson. 2014. « HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity ». *Immunity* 41 (4): 518-28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>.
- Panselinas, Efstratios, et Marc A. Judson. 2012. « Acute pulmonary exacerbations of sarcoidosis ». *Chest* 142 (4): 827-36. <https://doi.org/10.1378/chest.12-1060>.
- Patel, Amit A., Yan Zhang, James N. Fullerton, Lies Boelen, Anthony Rongvaux, Alexander A. Maini, Venetia Bigley, et al. 2017. « The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (7): 1913-23. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>.
- Patterson, Karen C., et Edward S. Chen. 2018. « The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implications for Treatment ». *Chest* 153 (6): 1432-42. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.030>.
- Patterson, Karen C., Kyle Hogarth, Aliya N. Husain, Anne I. Sperling, et Timothy B. Niewold. 2012. « The clinical and immunologic features of pulmonary fibrosis in sarcoidosis ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 160 (5): 321-31. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.03.005>.
- Petrek, M., V. Kolek, J. Szotkowska, et R. M. du Bois. 2002. « CC and C chemokine expression in pulmonary sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 20 (5): 1206-12. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00289902>.
- Petrova, Varvara, Margherita Annicchiarico-Petruzzelli, Gerry Melino, et Ivano Amelio. 2018. « The hypoxic tumour microenvironment ». *Oncogenesis* 7 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>.
- Petersen, H. B., E. Johnson, et S. S. Osen. 1990. « Phagocytosis of agarose beads by receptors for C3b (CR1) and iC3b (CR3) on alveolar macrophages from patients with sarcoidosis ». *Scandinavian Journal of Immunology* 32 (6): 669-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1990.tb03209.x>.
- Phalke, Swati, Katja Aviszus, Kira Rubtsova, Anatoly Rubtsov, Briana Barkes, Linda Powers, Brenda Warner, et al. 2020. « Age-associated B Cells Appear in Patients with Granulomatous Lung Diseases ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 202 (7): 1013-23. <https://doi.org/10.1164/rccm.201911-2151OC>.
- Piekarski, Eve, Khadija Benali, et François Rouzet. 2018. « Nuclear Imaging in Sarcoidosis ». *Seminars in Nuclear Medicine* 48 (3): 246-60. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2018.02.005>.
- Piotrowski, W. J., J. Kiszalkiewicz, D. Pastuszek-Lewandoska, P. Górski, A. Antczak, M. Migdalska-Sęk, W. Górski, et al. 2015. « Expression of HIF-1A/VEGF/ING-4 Axis in Pulmonary Sarcoidosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 866: 61-69. https://doi.org/10.1007/5584_2015_144.
- Pizzini, Alex, Hannes Bacher, Magdalena Aichner, Alexander Franchi, Kathrin Watzinger, Ivan Tancevski, Thomas Sonnweber, et al. 2021. « High expression of mTOR signaling in granulomatous lesions is not predictive for the clinical course of sarcoidosis ». *Respiratory Medicine* 177 (janvier): 106294. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106294>.
- Planès, C., D. Valeyre, A. Loiseau, J. F. Bernaudin, et P. Soler. 1994. « Ultrastructural alterations of the air-blood barrier in sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis and their relation to lung histopathology ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150 (4): 1067-74. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.4.7921438>.
- Prabhakar, Nanduri R., et Gregg L. Semenza. 2012. « Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 ». *Physiological*

- Reviews* 92 (3) : 967-1003. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2011>.
- Prasse, A., C. G. Georges, H. Biller, H. Hamm, H. Matthys, W. Luttmann, et J. C. Virchow. 2000. « Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells ». *Clinical and Experimental Immunology* 122 (2) : 241-48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01365.x>.
- Prasse, Antje, Christine Katic, Martin Germann, Armin Buchwald, Gernot Zissel, et Joachim Müller-Quernheim. 2008. « Phenotyping sarcoidosis from a pulmonary perspective ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (3) : 330-36. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-742OC>.
- Prasse, Antje, Dmitri V. Pechkovsky, Galen B. Toews, Wolfgang Jungraithmayr, Florian Kollert, Torsten Goldmann, Ekkehard Vollmer, Joachim Müller-Quernheim, et Gernot Zissel. 2006. « A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (7) : 781-92. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1518OC>.
- Preusse, Corinna, Hans-H. Goebel, Debora Pehl, Jan L. Rinnenthal, Rudolf A. Kley, Yves Allenbach, Frank L. Heppner, et al. 2015. « Th2-M2 immunity in lesions of muscular sarcoidosis and macrophagic myofasciitis ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41 (7) : 952-63. <https://doi.org/10.1111/nan.12231>.
- Prokop, Stefan, Frank L. Heppner, Hans H. Goebel, et Werner Stenzel. 2011. « M2 polarized macrophages and giant cells contribute to myofibrosis in neuromuscular sarcoidosis ». *The American Journal of Pathology* 178 (3) : 1279-86. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.065>.
- Prosser, Gareth, Julius Brandenburg, Norbert Reiling, Clifton Earl Barry, Robert J. Wilkinson, et Katalin A. Wilkinson. 2017. « The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition ». *Microbes and Infection* 19 (3) : 177-92. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.001>.
- Raggi, Federica, Simone Pelassa, Daniele Pierobon, Federica Penco, Marco Gattorno, Francesco Novelli, Alessandra Eva, Luigi Varesio, Mirella Giovarelli, et Maria Carla Bosco. 2017. « Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 ». *Frontiers in Immunology* 8 : 1097. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01097>.
- Rahaghi, Franck F., Robert P. Baughman, Lesley Ann Saketkoo, Nadera J. Sweiss, Joseph B. Barney, Surinder S. Birring, Ulrich Costabel, et al. 2020. « Delphi consensus recommendations for a treatment algorithm in pulmonary sarcoidosis ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 29 (155). <https://doi.org/10.1183/16000617.0146-2019>.
- Ramos-Casals, Manuel, Belchin Kostov, Pilar Brito-Zerón, Antoni Sisó-Almirall, Robert P. Baughman, et Autoimmune Big Data Study Group. 2019. « How the Frequency and Phenotype of Sarcoidosis is Driven by Environmental Determinants ». *Lung* 197 (4) : 427-36. <https://doi.org/10.1007/s00408-019-00243-2>.
- Ramstein, Joris, Caroline E. Broos, Laura J. Simpson, K. Mark Ansel, Sara A. Sun, Melissa E. Ho, Prescott G. Woodruff, et al. 2016. « IFN- γ -Producing T-Helper 17.1 Cells Are Increased in Sarcoidosis and Are More Prevalent than T-Helper Type 1 Cells ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (11) : 1281-91. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1499OC>.
- Reich, Jerome M. 2002. « Mortality of intrathoracic sarcoidosis in referral vs population-based settings: influence of stage, ethnicity, and corticosteroid therapy ». *Chest* 121 (1) : 32-39.
- Remy-Jardin, M., F. Giraud, J. Remy, L. Wattinne, B. Wallaert, et A. Duhamel. 1994. « Pulmonary sarcoidosis: role of CT in the evaluation of disease activity and functional impairment and in prognosis assessment ». *Radiology* 191 (3) : 675-80. <https://doi.org/10.1148/radiology.191.3.8184045>.
- Richalet, Jean-Paul. 2021. « The Invention of Hypoxia ». *Journal of Applied Physiology*, mars. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00936.2020>.
- Riteau, Nicolas, et Jean-François Bernaudin. 2020. « In addition to mTOR and JAK/STAT, NLRP3 inflammasome is another key pathway activated in sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 55 (3). <https://doi.org/10.1183/13993003.00149-2020>.
- Rivera, Natalia V., Karina Patasova, Susanna Kullberg, Lina Marcela Diaz-Gallo, Tomoko Iseda, Camilla Bengtsson, Lars Alfredsson, et al. 2019. « A Gene-Environment Interaction Between Smoking and Gene polymorphisms Provides a High Risk of Two Subgroups of Sarcoidosis ». *Scientific Reports* 9 (1) : 18633. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54612-1>.
- Robinson, B. W., T. L. McLemore, et R. G. Crystal. 1985. « Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 75 (5) : 1488-95. <https://doi.org/10.1172/JCI111852>.
- Rogers, Francis J, et John R Haserick. 1954. « Sarcoidosis and the Kveim Reaction1 ». *Journal of Investigative Dermatology* 23 (5) : 389-406. <https://doi.org/10.1038/jid.1954.121>.
- Rojas, Manuel, Paula Restrepo-Jiménez, Diana M. Monsalve, Yovana Pacheco, Yeny Acosta-Ampudia, Carolina Ramírez-Santana, Patrick S. C. Leung, Aftab A. Ansari, M. Eric Gershwin, et Juan-Manuel Anaya. 2018. « Molecular mimicry and autoimmunity ». *Journal of Autoimmunity* 95 (décembre) : 100-123. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.012>.

- Rosen, Yale, Thomas J. Athanassiades, Sanggiu Moon, et Harold A. Lyons. 1978. « Nongranulomatous Interstitial Pneumonitis in Sarcoidosis: Relationship to Development of Epithelioid Granulomas ». *Chest* 74 (2) : 122-25. <https://doi.org/10.1378/chest.74.2.122>.
- Rossi, Giulio, Alberto Cavazza, et Thomas V. Colby. 2015. « Pathology of Sarcoidosis ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 49 (1) : 36-44. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8479-6>.
- Rossides, Marios, Johan Grunewald, Anders Eklund, Susanna Kullberg, Daniela Di Giuseppe, Johan Askling, et Elizabeth V. Arkema. 2018. « Familial aggregation and heritability of sarcoidosis: a Swedish nested case-control study ». *The European Respiratory Journal* 52 (2). <https://doi.org/10.1183/13993003.00385-2018>.
- Rossides, Marios, Susanna Kullberg, Johan Askling, Anders Eklund, Johan Grunewald, et Elizabeth V. Arkema. 2018. « Sarcoidosis mortality in Sweden: a population-based cohort study ». *European Respiratory Journal* 51 (2) : 1701815. <https://doi.org/10.1183/13993003.01815-2017>.
- Rossides, Marios, Susanna Kullberg, Anders Eklund, Daniela Di Giuseppe, Johan Grunewald, Johan Askling, et Elizabeth V. Arkema. 2020. « Risk of first and recurrent serious infection in sarcoidosis: a Swedish register-based cohort study ». *The European Respiratory Journal* 56 (3). <https://doi.org/10.1183/13993003.00767-2020>.
- Rossman, Milton D., Bruce Thompson, Margaret Frederick, Mary Maliarik, Michael C. Iannuzzi, Benjamin A. Rybicki, Janardan P. Pandey, et al. 2003. « HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites ». *American Journal of Human Genetics* 73 (4) : 720-35. <https://doi.org/10.1086/378097>.
- Rotenberg, Cécile, Valérie Besnard, Pierre-Yves Brillet, Stéphane Giraudier, Hilario Nunes, et Dominique Valeyre. 2018. « Dramatic response of refractory sarcoidosis under ruxolitinib in a patient with associated JAK2-mutated polycythemia ». *The European Respiratory Journal* 52 (6). <https://doi.org/10.1183/13993003.01482-2018>.
- Roth, Katherine J., et Bryan L. Copple. 2015. « Role of Hypoxia-Inducible Factors in the Development of Liver Fibrosis ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1 (6) : 589-97. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.09.005>.
- Ruthenborg, Robin J., Jae-Jun Ban, Anum Wazir, Norihiko Takeda, et Jung-Whan Kim. 2014. « Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 ». *Molecules and Cells* 37 (9) : 637-43. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0150>.
- Rybicki, B. A., M. C. Iannuzzi, M. M. Frederick, B. W. Thompson, M. D. Rossman, E. A. Bresnitz, M. L. Terrin, et al. 2001. « Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS) ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (11) : 2085-91. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.11.2106001>.
- Sahashi, K., Y. Ina, K. Takada, T. Sato, M. Yamamoto, et M. Morishita. 1994. « Significance of interleukin 6 in patients with sarcoidosis ». *Chest* 106 (1) : 156-60. <https://doi.org/10.1378/chest.106.1.156>.
- Saidenberg-Kermanac'h, Nathalie, Luca Semerano, Hilario Nunes, Danielle Sadoun, Xavier Guillot, Marouane Boubaya, Nicolas Naggara, Dominique Valeyre, et Marie-Christophe Boissier. 2014. « Bone fragility in sarcoidosis and relationships with calcium metabolism disorders: a cross sectional study on 142 patients ». *Arthritis Research & Therapy* 16 (2) : R78. <https://doi.org/10.1186/ar4519>.
- Sakthivel, P., J. Grunewald, A. Eklund, D. Bruder, et J. Wahlström. 2016. « Pulmonary sarcoidosis is associated with high-level inducible co-stimulator (ICOS) expression on lung regulatory T cells--possible implications for the ICOS/ICOS-ligand axis in disease course and resolution ». *Clinical and Experimental Immunology* 183 (2) : 294-306. <https://doi.org/10.1111/cei.12715>.
- Salez, F., P. Gosset, M. C. Copin, C. Lamblin Degros, A. B. Tonnel, et B. Wallaert. 1998. « Transforming growth factor-beta1 in sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 12 (4) : 913-19. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.12040913>.
- Saliba, Antoine-Emmanuel, Lei Li, Alexander J. Westermann, Silke Appenzeller, Daphne A. C. Stapels, Leon N. Schulte, Sophie Helaine, et Jörg Vogel. 2016. « Single-cell RNA-seq ties macrophage polarization to growth rate of intracellular Salmonella ». *Nature Microbiology* 2 (2) : 1-8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.206>.
- Sasaki, M., Y. Namioka, T. Ito, N. Izumiyama, S. Fukui, A. Watanabe, M. Kashima, M. Sano, T. Shioya, et M. Miura. 2001. « Role of ICAM-1 in the aggregation and adhesion of human alveolar macrophages in response to TNF-alpha and INF-gamma ». *Mediators of Inflammation* 10 (6) : 309-13. <https://doi.org/10.1080/09629350120102325>.
- Sato, Hiroe, Felix A. Woodhead, Tariq Ahmad, Jan C. Grutters, Paolo Spagnolo, Jules M.M. van den Bosch, Lisa A. Maier, et al. 2010. « Sarcoidosis HLA class II genotyping distinguishes differences of clinical phenotype across ethnic groups ». *Human Molecular Genetics* 19 (20) : 4100-4111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq325>.
- Saussine, Anne, Abdellatif Tazi, Séverine Feuillet, Michel Rybojad, Caroline Juillard, Anne Bergeron, Valérie

- Dessirier, et al. 2012. « Active chronic sarcoidosis is characterized by increased transitional blood B cells, increased IL-10-producing regulatory B cells and high BAFF levels ». *PLoS One* 7 (8) : e43588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043588>.
- Sawahata, Michiru, Takeshi Johkoh, Takeshi Kawanobe, Chiyoiko Kono, Yosikazu Nakamura, Masashi Bando, Koichi Hagiwara, et al. 2020. « Computed Tomography Images of Fibrotic Pulmonary Sarcoidosis Leading to Chronic Respiratory Failure ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010142>.
- Sawahata, Michiru, Yukihiro Sugiyama, Yosikazu Nakamura, Masayuki Nakayama, Naoko Mato, Hideaki Yamasawa, et Masashi Bando. 2015. « Age-related and historical changes in the clinical characteristics of sarcoidosis in Japan ». *Respiratory Medicine* 109 (2) : 272-78. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2014.12.012>.
- Scadding, J. G. 1961. « Prognosis of intrathoracic sarcoidosis in England. A review of 136 cases after five years' observation ». *British Medical Journal* 2 (5261) : 1165-72. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5261.1165>.
- Scher, Jose U., Vijay Joshua, Alejandro Artacho, Shahla Abdollahi-Roodsaz, Johan Öckinger, Susanna Kullberg, Magnus Sköld, et al. 2016. « The lung microbiota in early rheumatoid arthritis and autoimmunity ». *Microbiome* 4 (1) : 60. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0206-x>.
- Schmerch, Jasmin, Antje Prasse, Dimitrios Vlachakis, Kathrin L. Schuchardt, Dmitri V. Pechkovsky, Torsten Goldmann, Karoline I. Gaede, Joachim Müller-Quernheim, et Gernot Zissel. 2016. « Functional Toll-Like Receptor 9 Expression and CXCR3 Ligand Release in Pulmonary Sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 55 (5) : 749-57. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0278OC>.
- Schödel, Johannes, Spyros Oikonomopoulos, Jiannis Ragoussis, Christopher W. Pugh, Peter J. Ratcliffe, et David R. Mole. 2011. « High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq ». *Blood* 117 (23) : e207-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314427>.
- Schödel, Johannes, et Peter J. Ratcliffe. 2019. « Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology ». *Nature Reviews Nephrology* 15 (10) : 641-59. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0182-z>.
- Scholz, Carsten C., Miguel A. S. Cavadas, Murtaza M. Tambuwala, Emily Hams, Javier Rodríguez, Alex von Kriegsheim, Philip Cotter, et al. 2013. « Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (46) : 18490-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309718110>.
- Schupp, Jonas Christian, Sandra Freitag-Wolf, Elena Bargagli, Violeta Mihailović-Vučinić, Paola Rottoli, Aleksandar Grubanovic, Annegret Müller, et al. 2018. « Phenotypes of organ involvement in sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 51 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.00991-2017>.
- Schupp, Jonas Christian, Sandrine Tchaptchet, Niklas Lützen, Peggy Engelhard, Joachim Müller-Quernheim, Marina A. Freudenberg, et Antje Prasse. 2015. « Immune response to Propionibacterium acnes in patients with sarcoidosis--in vivo and in vitro ». *BMC pulmonary medicine* 15 (juillet) : 75. <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0070-7>.
- Schürmann, M., P. Reichel, B. Müller-Myhsok, M. Schlaak, J. Müller-Quernheim, et E. Schwinger. 2001. « Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (5) : 840-46. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.5.2007056>.
- Sehgal, Inderpaul Singh, Sahajal Dhooria, Ashutosh Nath Aggarwal, et Ritesh Agarwal. 2017. « Impact of Rapid On-Site Cytological Evaluation (ROSE) on the Diagnostic Yield of Transbronchial Needle Aspiration During Mediastinal Lymph Node Sampling: Systematic Review and Meta-Analysis ». *Chest*, novembre. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.004>.
- Selman, M., V. Ruiz, S. Cabrera, L. Segura, R. Ramírez, R. Barrios, et A. Pardo. 2000. « TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? » *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (3) : L562-574. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.3.L562>.
- Semenza, G. L., M. K. Neufeldt, S. M. Chi, et S. E. Antonarakis. 1991. « Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (13) : 5680-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5680>.
- Semenza, G L, et G L Wang. 1992. « A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. » *Molecular and Cellular Biology* 12 (12) : 5447-54.
- Semenza, Gregg L. 2011. « Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease ». *New England Journal of Medicine* 365 (6) : 537-47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011165>.
- Semenza, Gregg L. 2012. « Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine ». *Cell* 148 (3) : 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.
- Semenza, Gregg L. 2017. « A compendium of proteins that interact with HIF-1 α ». *Experimental Cell Research* 356 (2) : 128-35. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.041>.
- Semenza, Gregg L. 2019. « Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors ». *Annual Review of*

- Pharmacology and Toxicology* 59 : 379-403. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637>.
- Sepehri, Mitra, Katrina Hutton Carlsen, et Jørgen Serup. 2016. « Papulo-Nodular Reactions in Black Tattoos as Markers of Sarcoidosis: Study of 92 Tattoo Reactions from a Hospital Material ». *Dermatology* 232 (6) : 679-86. <https://doi.org/10.1159/000453315>.
- Shah, Kabeer K., Bobbi S. Pritt, et Mariam P. Alexander. 2017. « Histopathologic review of granulomatous inflammation ». *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* 7 (mai) : 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2017.02.001>.
- Shamaei, Masoud, Esmail Mortaz, Mihan Pourabdollah, Johan Garssen, Payam Tabarsi, Aliakbar Velayati, et Ian M. Adcock. 2018. « Evidence for M2 macrophages in granulomas from pulmonary sarcoidosis: A new aspect of macrophage heterogeneity ». *Human Immunology* 79 (1) : 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.10.009>.
- Sharp, Michelle, Taylor Brown, Edward S. Chen, Cynthia S. Rand, David R. Moller, et Michelle N. Eakin. 2020. « Association of Medication Adherence and Clinical Outcomes in Sarcoidosis ». *Chest* 158 (1) : 226-33. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.01.026>.
- Shehade, Hussein, Valérie Acolty, Muriel Moser, et Guillaume Oldenhove. 2015. « Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 Negatively Regulates Th1 Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (4) : 1372-76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402552>.
- Shen, Yongchun, Caishuang Pang, Yanqiu Wu, Diandian Li, Chun Wan, Zenglin Liao, Ting Yang, Lei Chen, et Fuqiang Wen. 2016. « Diagnostic Performance of Bronchoalveolar Lavage Fluid CD4/CD8 Ratio for Sarcoidosis: A Meta-analysis ». *EBioMedicine* 8 (juin) : 302-8. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.024>.
- Shi, Lanbo, Hugh Salamon, Eliseo A. Eugenin, Richard Pine, Andrea Cooper, et Maria L. Gennaro. 2015. « Infection with Mycobacterium tuberculosis induces the Warburg effect in mouse lungs ». *Scientific Reports* 5 (décembre) : 18176. <https://doi.org/10.1038/srep18176>.
- Shi, Lewis Z., Ruoning Wang, Gonghua Huang, Peter Vogel, Geoffrey Neale, Douglas R. Green, et Hongbo Chi. 2011. « HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 208 (7) : 1367-76. <https://doi.org/10.1084/jem.20110278>.
- Shigehara, K., N. Shijubo, M. Hirasawa, S. Abe, et T. Uede. 1998. « Immunolocalization of extracellular matrix proteins and integrins in sarcoid lymph nodes ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 433 (1) : 55-61. <https://doi.org/10.1007/s004280050216>.
- Shigehara, K., N. Shijubo, M. Ohmichi, G. Yamada, R. Takahashi, H. Okamura, M. Kurimoto, et al. 2000. « Increased levels of interleukin-18 in patients with pulmonary sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (5) : 1979-82. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.5.9911113>.
- Shigehara, Katsunori, Noriharu Shijubo, Mitsuhide Ohmichi, Ryuji Takahashi, Shin-ichiro Kon, Haruki Okamura, Masashi Kurimoto, et al. 2001. « IL-12 and IL-18 Are Increased and Stimulate IFN- γ Production in Sarcoid Lungs ». *The Journal of Immunology* 166 (1) : 642-49. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.642>.
- Shigemitsu, Hidenobu, et Arata Azuma. 2011. « Sarcoidosis and interstitial pulmonary fibrosis; two distinct disorders or two ends of the same spectrum ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 17 (5) : 303-7. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283486d52>.
- Shlobin, Oksana A., Vasilis Kouranos, Scott D. Barnett, Esam H. Alhamad, Daniel A. Culver, Joseph Barney, Francis C. Cordova, et al. 2020. « Physiological Predictors of Survival in Patients with Sarcoidosis Associated Pulmonary Hypertension: Results from an International Registry ». *The European Respiratory Journal*, mars. <https://doi.org/10.1183/13993003.01747-2019>.
- Shu, Shaoqun, Ying Wang, Meiling Zheng, Zhiwen Liu, Juan Cai, Chengyuan Tang, et Zheng Dong. 2019. « Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair ». *Cells* 8 (3). <https://doi.org/10.3390/cells8030207>.
- Silva, Ernesto, Serhiy Souchelnyskyi, Kie Kasuga, Anders Eklund, Johan Grunewald, et Åsa M. Wheelock. 2013. « Quantitative intact proteomics investigations of alveolar macrophages in sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 41 (6) : 1331-39. <https://doi.org/10.1183/09031936.00178111>.
- Silverstein, E., L. P. Pertschuk, et J. Friedland. 1979. « Immunofluorescent localization of angiotensin converting enzyme in epithelioid and giant cells of sarcoidosis granulomas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (12) : 6646-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6646>.
- Simonneau, Gérald, David Montani, David S. Celermajer, Christopher P. Denton, Michael A. Gatzoulis, Michael Krowka, Paul G. Williams, et Rogerio Souza. 2019. « Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension ». *European Respiratory Journal* 53 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>.
- Sitkovsky, Michail, et Dmitriy Lukashev. 2005. « Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension:

- HIF1 alpha and adenosine receptors ». *Nature Reviews. Immunology* 5 (9) : 712-21. <https://doi.org/10.1038/nri1685>.
- Soler, P., F. Basset, J. F. Bernaudin, et J. Chretien. 1976. « Morphology and Distribution of the Cells of a Sarcoid Granuloma: Ultrastructural Study of Serial Sections ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 278 (1) : 147-60. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb47026.x>.
- Soler, P., et J. F. Bernaudin. 1993. « [Physiology of granulomas] ». *Revue De Pneumologie Clinique* 49 (6) : 257-61.
- Song, Gwan Gyu, Jae-Hoon Kim, et Young Ho Lee. 2014. « Associations between TNF- α -308 A/G and lymphotoxin- α +252 A/G polymorphisms and susceptibility to sarcoidosis: a meta-analysis ». *Molecular Biology Reports* 41 (1) : 259-67. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2859-x>.
- Spagnolo, Paolo. 2015. « Sarcoidosis: a Critical Review of History and Milestones ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 49 (1) : 1-5. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8480-0>.
- Spagnolo, Paolo, Giulio Rossi, Rocco Trisolini, Nicola Sverzellati, Robert P. Baughman, et Athol U. Wells. 2018. « Pulmonary sarcoidosis ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 6 (5) : 389-402. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30064-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30064-X).
- Stanton, Lee-Anne, Gael Fenhalls, Andrew Lucas, Peter Gough, David R Greaves, James A Mahoney, Paul Van Helden, et Siamon Gordon. 2003. « Immunophenotyping of macrophages in human pulmonary tuberculosis and sarcoidosis ». *International Journal of Experimental Pathology* 84 (6) : 289-304. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2003.00365.x>.
- Starshinova, Anna A., Anna M. Malkova, Natalia Y. Basantsova, Yulia S. Zinchenko, Igor V. Kudryavtsev, Gennadiy A. Ershov, Lidia A. Soprun, Vera A. Mayevskaya, Leonid P. Churilov, et Piotr K. Yablonskiy. 2020. « Sarcoidosis as an Autoimmune Disease ». *Frontiers in Immunology* 10 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02933>.
- Stefansson, S., et D. A. Lawrence. 1996. « The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin ». *Nature* 383 (6599) : 441-43. <https://doi.org/10.1038/383441a0>.
- Strookappe, Bert, Jeff Swigris, Jolanda De Vries, Marjon Elfferich, Ton Knevel, et Marjolein Drent. 2015. « Benefits of Physical Training in Sarcoidosis ». *Lung* 193 (5) : 701-8. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9784-9>.
- Sverrild, A., V. Backer, K. O. Kyvik, J. Kaprio, N. Milman, C. B. Svendsen, et S. F. Thomsen. 2008. « Heredity in sarcoidosis: a registry-based twin study ». *Thorax* 63 (10) : 894-96. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.094060>.
- Swain, Lija, Marieke Wottawa, Annette Hillemann, Angelika Beneke, Haruki Odagiri, Kazutoyo Terada, Motoyoshi Endo, Yuichi Oike, Katja Farhat, et Dörthe M. Katschinski. 2014. « Prolyl-4-hydroxylase domain 3 (PHD3) is a critical terminator for cell survival of macrophages under stress conditions ». *Journal of Leukocyte Biology* 96 (3) : 365-75. <https://doi.org/10.1189/jlb.2HI1013-533R>.
- Sweiss, Nadera J., Rafah Salloum, Seema Gandhi, Seema Ghandi, Maria-Luisa Alegre, Ray Sawaqed, Maria Badaracco, et al. 2010. « Significant CD4, CD8, and CD19 lymphopenia in peripheral blood of sarcoidosis patients correlates with severe disease manifestations ». *PloS One* 5 (2) : e9088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009088>.
- Taflin, Cécile, Makoto Miyara, Dominique Nochy, Dominique Valeyre, Jean-Marc Naccache, Frédéric Altare, Pascale Salek-Peyron, et al. 2009. « FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions ». *The American Journal of Pathology* 174 (2) : 497-508. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080580>.
- Taimch, Ziad, Marshall I. Hertz, Sara Shumway, et Marc Pritzker. 2016. « Lung transplantation for pulmonary sarcoidosis. Twenty-five years of experience in the USA ». *Thorax* 71 (4) : 378-79. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207497>.
- Takeda, Norihiko, Ellen L. O'Dea, Andrew Doedens, Jung-whan Kim, Alexander Weidemann, Christian Stockmann, Masataka Asagiri, M. Celeste Simon, Alexander Hoffmann, et Randall S. Johnson. 2010. « Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis ». *Genes & Development* 24 (5) : 491-501. <https://doi.org/10.1101/gad.1881410>.
- Takeda, Yukiji, Sandra Costa, Estelle Delamarre, Carmen Roncal, Rodrigo Leite de Oliveira, Mario Leonardo Squadrito, Veronica Finisguerra, et al. 2011. « Macrophage skewing by Phd2 haploinsufficiency prevents ischaemia by inducing arteriogenesis ». *Nature* 479 (7371) : 122-26. <https://doi.org/10.1038/nature10507>.
- Talreja, Jaya, Pershang Farshi, Adnan Alazizi, Francesca Luca, Roger Pique-Regi, et Lobelia Samavati. 2017. « RNA-sequencing Identifies Novel Pathways in Sarcoidosis Monocytes ». *Scientific Reports* 7 (1) : 2720. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02941-4>.
- Talreja, Jaya, Harvinder Talwar, Nisar Ahmad, Ruchi Rastogi, et Lobelia Samavati. 2016. « Dual Inhibition of Rip2 and IRAK1/4 Regulates IL-1 β and IL-6 in Sarcoidosis Alveolar Macrophages and Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 197 (4) : 1368-78.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600258>.
- Talreja, Jaya, Harvinder Talwar, Christian Bauerfeld, Lawrence I. Grossman, Kezhong Zhang, Paul Tranchida, et Lobelia Samavati. 2019. « HIF-1 α regulates IL-1 β and IL-17 in sarcoidosis ». *ELife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.44519>.
- Tamura, R., A. Sato, K. Chida, et H. Suganuma. 1998. « Fibroblasts as Target and Effector Cells in Japanese Patients with Sarcoidosis ». *Lung* 176 (2) : 75-87. <https://doi.org/10.1007/PL00007596>.
- Tavee, Jinny O., Karen Karwa, Zubair Ahmed, Nicolas Thompson, Joseph Parambil, et Daniel A. Culver. 2017. « Sarcoidosis-associated small fiber neuropathy in a large cohort: Clinical aspects and response to IVIG and anti-TNF alpha treatment ». *Respiratory Medicine* 126 (mai) : 135-38. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.03.011>.
- Taylor, Cormac T., et Sean P. Colgan. 2017. « Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (12) : 774-85. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.103>.
- Taylor, Cormac T., Glen Doherty, Padraic G. Fallon, et Eoin P. Cummins. 2016. « Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (10) : 3716-24. <https://doi.org/10.1172/JCI84433>.
- Ten Berge, Bregje, Marthe S. Paats, Ingrid M. Bergen, Bernt van den Blink, Henk C. Hoogsteden, Bart N. Lambrecht, Rudi W. Hendriks, et Alex Kleijnjan. 2012. « Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis ». *Rheumatology (Oxford, England)* 51 (1) : 37-46. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker316>.
- Tezera, Liku B, Magdalena K Bielecka, Andrew Chancellor, Michaela T Reichmann, Basim Al Shammari, Patience Brace, Alex Batty, et al. 2017. « Dissection of the host-pathogen interaction in human tuberculosis using a bioengineered 3-dimensional model ». Sous la direction de Bree Aldridge. *ELife* 6 (janvier) : e21283. <https://doi.org/10.7554/eLife.21283>.
- Thillai, Muhunthan, Christopher P. Atkins, Anjali Crawshaw, Simon P. Hart, Ling-Pei Ho, Vasileios Kouranos, Karen Patterson, Nicholas J. Sreaton, Joanna Whight, et Athol U. Wells. 2021. « BTS Clinical Statement on pulmonary sarcoidosis ». *Thorax* 76 (1) : 4-20. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2019-214348>.
- Thompson, A. A. Roger, Philip M. Elks, Helen M. Marriott, Suttida Eamsamang, Kathryn R. Higgins, Amy Lewis, Lynne Williams, et al. 2014. « Hypoxia-inducible factor 2 α regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish ». *Blood* 123 (3) : 366-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-500207>.
- Torres Filho, I P, M Leunig, F Yuan, M Intaglietta, et R K Jain. 1994. « Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (6) : 2081-85.
- Toschi, Alfredo, Evan Lee, Noga Gadir, Michael Ohh, et David A. Foster. 2008. « Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (50) : 34495-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800170200>.
- Travis, WD. 2002. « Non-neoplastic disorders of the lower respiratory tract ». *Atlas of Nontumor Pathology*, 901-21.
- Travis, William D., Karoly Balogh, et Jerrold L. Abraham. 1985. « Silicone granulomas: Report of three cases and review of the literature ». *Human Pathology* 16 (1) : 19-27. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(85\)80209-4](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(85)80209-4).
- Trus, Evan, Sameh Basta, et Katrina Gee. 2020. « Who's in charge here? Macrophage colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor: Competing factors in macrophage polarization ». *Cytokine* 127 (mars) : 154939. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154939>.
- Tsiligianni, Ioanna, Katerina M. Antoniou, Despina Kyriakou, Nikolaos Tzanakis, George Chrysosfakis, Nikolaos M. Siafakas, et Demosthenes Bouros. 2005. « Th1/Th2 cytokine pattern in bronchoalveolar lavage fluid and induced sputum in pulmonary sarcoidosis ». *BMC pulmonary medicine* 5 (juin) : 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-5-8>.
- Tuleta, I., L. Biener, C. Pizarro, G. Nickenig, et D. Skowasch. 2018. « Proangiogenic and Profibrotic Markers in Pulmonary Sarcoidosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1114 : 57-66. https://doi.org/10.1007/5584_2018_199.
- Tutor-Ureta, Pablo, María J. Citores, Raquel Castejón, Susana Mellor-Pita, Miguel Yebra-Bango, Yolanda Romero, et Juan A. Vargas. 2006. « Prognostic value of neutrophils and NK cells in bronchoalveolar lavage of sarcoidosis ». *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry* 70 (6) : 416-22. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20120>.
- Tzouveleakis, Argyris, Vaggelis Harokopos, Triantafillos Paparountas, Nikos Oikonomou, Aristotelis Chatziioannou, George Vilaras, Evangelos Tsiambas, Andreas Karameris, Demosthenes Bouros, et Vassilis Aidinis. 2007. « Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (11) : 1108-19. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-683OC>.

- Tzouvelekis, Argyris, Paschalis Ntoliou, Andreas Karameris, Anastasios Koutsopoulos, Panagiotis Boglou, Andreas Koulelidis, Kostas Archontogeorgis, et al. 2012. « Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -vascular endothelial growth factor (VEGF)-inhibitory growth factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients ». *BMC research notes* 5 (novembre) : 654. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-654>.
- Ueda-Hayakawa, Ikuko, Hirotsugu Tanimura, Manabu Osawa, Hiroshi Iwasaka, Shuichi Ohe, Fumikazu Yamazaki, Kana Mizuno, et Hiroyuki Okamoto. 2013. « Elevated serum BAFF levels in patients with sarcoidosis: association with disease activity ». *Rheumatology (Oxford, England)* 52 (9) : 1658-66. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket186>.
- Ueno, Manabu, Toshitaka Maeno, Miyuki Nomura, Kana Aoyagi-Ikeda, Hiroki Matsui, Kenichiro Hara, Toru Tanaka, Tatsuya Iso, Tatsuo Suga, et Masahiko Kurabayashi. 2011. « Hypoxia-inducible factor-1 α mediates TGF- β -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 300 (5) : L740-752. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00146.2010>.
- Uribe-Querol, Eileen, et Carlos Rosales. 2017. « Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.
- Ushach, Irina, et Albert Zlotnik. 2016. « Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage ». *Journal of Leukocyte Biology* 100 (3) : 481-89. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-144R>.
- Uzunhan, Yurdagül, Olivier Bernard, Dominique Marchant, Nicolas Dard, Valérie Vanneaux, Jérôme Larghero, Thomas Gille, et al. 2016. « Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 (5) : L439-451. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00117.2015>.
- Uzunhan, Yurdagül, Hilario Nunes, Florence Jeny, Maxime Lacroix, Sophie Brun, Pierre-Yves Brillet, Emmanuel Martinod, et al. 2017. « Chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 49 (6). <https://doi.org/10.1183/13993003.02396-2016>.
- Valentonyte, Ruta, Jochen Hampe, Klaus Huse, Philip Rosenstiel, Mario Albrecht, Annette Stenzel, Marion Nagy, et al. 2005. « Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2 ». *Nature Genetics* 37 (4) : 357-64. <https://doi.org/10.1038/ng1519>.
- Valeyre, Dominique, Jean-François Bernaudin, Florence Jeny, Boris Duchemann, Olivia Freynet, Carole Planès, Marianne Kambouchner, et Hilario Nunes. 2015. « Pulmonary Sarcoidosis ». *Clinics in Chest Medicine* 36 (4) : 631-41. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.08.006>.
- Valeyre, Dominique, Antje Prasse, Hilario Nunes, Yurdagül Uzunhan, Pierre-Yves Brillet, et Joachim Müller-Quernheim. 2014a. « Sarcoidosis ». *The Lancet* 383 (9923) : 1155-67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60680-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60680-7).
- van Maarseveen, T. C. M. Th, W. Vos, et P. J. van Diest. 2009. « Giant cell formation in sarcoidosis: cell fusion or proliferation with non-division? ». *Clinical and Experimental Immunology* 155 (3) : 476-86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03841.x>.
- Veltkamp, M., P. a. H. M. Wijnen, C. H. M. van Moorsel, G. T. Rijkers, H. J. T. Ruven, M. Heron, O. Bekers, et al. 2007. « Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis ». *Clinical and Experimental Immunology* 149 (3) : 453-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03428.x>.
- Venet, A., A. J. Hance, C. Saltini, B. W. Robinson, et R. G. Crystal. 1985. « Enhanced alveolar macrophage-mediated antigen-induced T-lymphocyte proliferation in sarcoidosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 75 (1) : 293-301. <https://doi.org/10.1172/JCI111688>.
- Verleden, Stijn E., Arno Vanstapel, Laurens De Sadeleer, Adriana Dubbeldam, Tinne Goos, Iwein Gyselinck, Vincent Geudens, et al. 2021. « Distinct airway involvement in subtypes of end-stage fibrotic pulmonary sarcoidosis ». *CHEST* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.01.003>.
- Via, Laura E., P. Ling Lin, Sonja M. Ray, Jose Carrillo, Shannon Sedberry Allen, Seok Yong Eum, Kimberly Taylor, et al. 2008. « Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates ». *Infection and Immunity* 76 (6) : 2333-40. <https://doi.org/10.1128/IAI.01515-07>.
- Viola, Antonella, Fabio Munari, Ricardo Sánchez-Rodríguez, Tommaso Scolaro, et Alessandra Castegna. 2019. « The Metabolic Signature of Macrophage Responses ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>.
- Vorselaars, Adriane D. M., Coline H. M. van Moorsel, Pieter Zanen, Henk J. T. Ruven, Anke M. E. Claessen, Heleen van Velzen-Blad, et Jan C. Grutters. 2015. « ACE and sIL-2R correlate with lung function improvement in sarcoidosis during methotrexate therapy ». *Respiratory Medicine* 109 (2) : 279-85. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2014.11.009>.
- Vousden, Katherine A., Tomas Lundqvist, Bojana Popovic, Brian Naiman, Alan M. Carruthers, Philip Newton, Daniel J. D. Johnson, et al. 2019. « Discovery and characterisation of an antibody that selectively modulates the inhibitory activity of plasminogen activator inhibitor-1 ». *Scientific Reports* 9 (1) : 1605.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38842-x>.
- Wahlström, Jan, Jörn Dengjel, Bengt Persson, Hüseyin Duyar, Hans-Georg Rammensee, Stefan Stevanović, Anders Eklund, Robert Weissert, et Johan Grunewald. 2007. « Identification of HLA-DR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (11) : 3576-82. <https://doi.org/10.1172/JCI32401>.
- Walker, Lucy S. K., et David M. Sansom. 2011. « The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (12) : 852-63. <https://doi.org/10.1038/nri3108>.
- Walsh, Simon Lf, Athol U. Wells, Nicola Sverzellati, Gregory J. Keir, Lucio Calandriello, Katerina M. Antoniou, Susan J. Copley, et al. 2014. « An integrated clinicoradiological staging system for pulmonary sarcoidosis: a case-cohort study ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 2 (2) : 123-30. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70276-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70276-5).
- Wanat, Karolyn A., Misha Rosenbach, Amy F. Zoiber, Paul J. Zhang, et Andras Schaffer. 2014. « E-cadherin is expressed by mono- and multinucleated histiocytes in cutaneous sarcoidal and foreign body granulomas ». *The American Journal of Dermatopathology* 36 (8) : 651-54. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31828de7e0>.
- Wang, Alice, Katelyn Singh, Wael Ibrahim, Brett King, et William Damsky. 2020. « The Promise of JAK Inhibitors for Treatment of Sarcoidosis and Other Inflammatory Disorders with Macrophage Activation: A Review of the Literature ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 93 (1) : 187-95.
- Wang, G L, et G L Semenza. 1993. « General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9) : 4304-8.
- Wang, G. L., et G. L. Semenza. 1995. « Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (3) : 1230-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1230>.
- Wang, Ting, Huiying Liu, Guan Lian, Song-Yang Zhang, Xian Wang, et Changtao Jiang. 2017. « HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages ». *Mediators of Inflammation* 2017 : 9029327. <https://doi.org/10.1155/2017/9029327>.
- Warburg, O. 1956. « On the origin of cancer cells ». *Science (New York, N.Y.)* 123 (3191) : 309-14. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- Watson, Chris J., Patrick Collier, Isaac Tea, Roisin Neary, Jenny A. Watson, Claire Robinson, Dermot Phelan, et al. 2014. « Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype ». *Human Molecular Genetics* 23 (8) : 2176-88. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt614>.
- Watson, Jenny A., Chris J. Watson, Amanda McCann, et John Baugh. 2010. « Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response ». *Epigenetics* 5 (4) : 293-96. <https://doi.org/10.4161/epi.5.4.11684>.
- Watts, Emily R., et Sarah R. Walmsley. 2019. « Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity ». *Trends in Molecular Medicine* 25 (1) : 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.10.006>.
- Waypa, Gregory B., et Paul T. Schumacker. 2019. « Roles of HIF1 and HIF2 in pulmonary hypertension: it all depends on the context ». *European Respiratory Journal* 54 (6). <https://doi.org/10.1183/13993003.01929-2019>.
- Weichhart, Thomas, Markus Hengstschläger, et Monika Linke. 2015. « Regulation of innate immune cell function by mTOR ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (10) : 599-614. <https://doi.org/10.1038/nri3901>.
- Werner, Jessica L., Sylvia G. Escolero, Jeff T. Hewlett, Tim N. Mak, Brian P. Williams, Yoshinobu Eishi, et Gabriel Núñez. 2017. « Induction of Pulmonary Granuloma Formation by Propionibacterium acnes Is Regulated by MyD88 and Nox2 ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 56 (1) : 121-30. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0035OC>.
- Wikén, Maria, Johan Grunewald, Anders Eklund, et Jan Wahlström. 2009. « Higher monocyte expression of TLR2 and TLR4, and enhanced pro-inflammatory synergy of TLR2 with NOD2 stimulation in sarcoidosis ». *Journal of Clinical Immunology* 29 (1) : 78-89. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9225-0>.
- Wikén, Maria, Farah Idali, Muntasir Abo Al Hayja, Johan Grunewald, Anders Eklund, et Jan Wahlström. 2010. « No evidence of altered alveolar macrophage polarization, but reduced expression of TLR2, in bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis ». *Respiratory Research* 11 (septembre) : 121. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-121>.
- Wilsher, M. L. 1998. « Seasonal clustering of sarcoidosis presenting with erythema nodosum ». *The European Respiratory Journal* 12 (5) : 1197-99. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.12051197>.
- Wilson, Jayne Louise, Hannah Katharina Mayr, et Thomas Weichhart. 2019. « Metabolic Programming of Macrophages: Implications in the Pathogenesis of Granulomatous Disease ». *Frontiers in Immunology* 10 : 2265. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02265>.
- Wu, Chi-Hung, Pei-I. Chung, Chen-Yi Wu, Yen-Ta Chen, Yun-Wen Chiu, Yun-Ting Chang, et Han-Nan Liu. 2017. « Comorbid autoimmune diseases in patients with sarcoidosis: A nationwide case-control study in Taiwan ». *The Journal of Dermatology* 44 (4) : 423-30. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13654>.

- Wynn, Thomas A., et Kevin M. Vannella. 2016. « Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis ». *Immunity* 44 (3) : 450-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>.
- Xiong, Anji, et Yi Liu. 2017. « Targeting Hypoxia Inducible Factors-1 α As a Novel Therapy in Fibrosis ». *Frontiers in Pharmacology* 8 (mai). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00326>.
- Xu, Chengfang, Xuejiao Li, Peiling Guo, et Jia Wang. 2017. « Hypoxia-Induced Activation of JAK/STAT3 Signaling Pathway Promotes Trophoblast Cell Viability and Angiogenesis in Preeclampsia ». *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 23 (octobre) : 4909-17. <https://doi.org/10.12659/MSM.905418>.
- Xu, Lauren, Seth Kligerman, et Allen Burke. 2013. « End-stage sarcoid lung disease is distinct from usual interstitial pneumonia ». *The American Journal of Surgical Pathology* 37 (4) : 593-600. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182785a2d>.
- Xu, Zuoyu, Xiao-Feng Li, Hongyan Zou, Xilin Sun, et Baozhong Shen. 2017. « 18F-Fluoromisonidazole in tumor hypoxia imaging ». *Oncotarget* 8 (55) : 94969-79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21662>.
- Yanagishita, Takeshi, Daisuke Watanabe, Yoichi Akita, Aki Nakano, Yuichiro Ohshima, Yasuhiko Tamada, et Yoshinari Matsumoto. 2007. « Construction of novel in vitro epithelioid cell granuloma model from mouse macrophage cell line ». *Archives of Dermatological Research* 299 (8) : 399-403. <https://doi.org/10.1007/s00403-007-0778-1>.
- Yang, Ivana V., Iain Konigsberg, Kristyn MacPhail, Li Li, Elizabeth J. Davidson, Peggy M. Mroz, Nabeel Hamzeh, et al. 2019. « DNA Methylation Changes in Lung Immune Cells Are Associated with Granulomatous Lung Disease ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 60 (1) : 96-105. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0177OC>.
- Yang, Nan, Andrew Berry, Carolin Sauer, Matthew Baxter, Ian J. Donaldson, Karen Forbes, Rachelle Donn, Laura Matthews, et David Ray. 2020. « Hypoxia regulates GR function through multiple mechanisms involving microRNAs 103 and 107 ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 518 (décembre). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111007>.
- Yoon, Hee-Young, Hyeong Min Kim, Ye-Jee Kim, et Jin Woo Song. 2018. « Prevalence and incidence of sarcoidosis in Korea: a nationwide population-based study ». *Respiratory Research* 19 (1) : 158. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0871-3>.
- Yorozu, Pariko, Asuka Furukawa, Keisuke Uchida, Takumi Akashi, Tomoya Kakegawa, Tomohisa Ogawa, Junko Minami, et al. 2015. « Propionibacterium acnes catalase induces increased Th1 immune response in sarcoidosis patients ». *Respiratory Investigation* 53 (4) : 161-69. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2015.02.005>.
- Zaba, Lisa C., Gideon P. Smith, Miguel Sanchez, et Stephen D. Prystowsky. 2010. « Dendritic Cells in the Pathogenesis of Sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (1) : 32-39. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0033TR>.
- Zanoni, Ivan, et Francesca Granucci. 2013. « Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00032>.
- Zhang, Chen, Kevin M. Chan, Lindsay A. Schmidt, et Jeffrey L. Myers. 2016. « Histopathology of Explanted Lungs From Patients With a Diagnosis of Pulmonary Sarcoidosis ». *Chest* 149 (2) : 499-507. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0615>.
- Zhang, Chongxu, Stephanie Chery, Aaron Lazerson, Norman H Altman, Robert Jackson, Greg Holt, Michael Campos, Andrew V Schally, et Mehdi Mirsaedi. 2020. « Anti-inflammatory effects of α -MSH through p-CREB expression in sarcoidosis like granuloma model ». *Scientific Reports* 10 (avril). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64305-9>.
- Zhang, Hong, Hasan O. Akman, Eric L. P. Smith, Jin Zhao, Joanne E. Murphy-Ullrich, et Olcay A. Batuman. 2003. « Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins ». *Blood* 101 (6) : 2253-60. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0629>.
- Zhang, Mengjuan, et Song Zhang. 2020. « T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases ». *Frontiers in Immunology* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01142>.
- Zhang, Ruifeng, Yingli Wu, Meng Zhao, Chuanxu Liu, Lin Zhou, Shaoming Shen, Shihua Liao, Kun Yang, Qingyun Li, et Huanying Wan. 2009. « Role of HIF-1 α in the regulation ACE and ACE2 expression in hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (4) : L631-640. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90415.2008>.
- Zhao, Ya-bin, Wei Li, Qin Zhang, Yan Yin, Chuan-jia Yang, Wen-xiang Xu, Jian Kang, Rui-qun Qi, et Gang Hou. 2020. « Distinct miRNA Gene Expression Profiles Among the Nodule Tissues of Lung Sarcoidosis, Tuberculous Lymphadenitis and Normal Healthy Control Individuals ». *Frontiers in Medicine* 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.527433>.
- Zhong, Jianyong, Hai-Chun Yang, Valentina Kon, Agnes B. Fogo, Daniel A. Lawrence, et Ji Ma. 2014. « Vitronectin-binding PAI-1 protects against the development of cardiac fibrosis through interaction with

- fibroblasts ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 94 (6) : 633-44. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.51>.
- Zhou, Emily-Rose, et Sergio Arce. 2020. « Key Players and Biomarkers of the Adaptive Immune System in the Pathogenesis of Sarcoidosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197398>.
- Zhou, Tong, Nancy Casanova, Nima Pouladi, Ting Wang, Yves Lussier, Kenneth S. Knox, et Joe G. N. Garcia. 2017. « Identification of Jak-STAT signaling involvement in sarcoidosis severity via a novel microRNA-regulated peripheral blood mononuclear cell gene signature ». *Scientific Reports* 7 (1) : 4237. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04109-6>.
- Ziegenhagen, M. W., M. E. Rothe, M. Schlaak, et J. Müller-Quernheim. 2003. « Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis ». *The European Respiratory Journal* 21 (3) : 407-13. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00010403>.
- Ziegenhagen, Manfred W., Manuela E. Rothe, Gernot Zissel, et Joachim Müller-Quernheim. 2002. « Exaggerated TNFalpha release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis ». *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG* 19 (3) : 185-90.
- Zimmermann, Alexandra, Henrik Knecht, Robert Häsler, Gernot Zissel, Karoline I. Gaede, Sylvia Hofmann, Almut Nebel, Joachim Müller-Quernheim, Stefan Schreiber, et Annegret Fischer. 2017. « Atopobium and Fusobacterium as novel candidates for sarcoidosis-associated microbiota ». *The European Respiratory Journal* 50 (6). <https://doi.org/10.1183/13993003.00746-2016>.
- Zissel, G., J. Homolka, J. Schlaak, M. Schlaak, et J. Müller-Quernheim. 1996. « Anti-inflammatory cytokine release by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (3 Pt 1) : 713-19. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810610>.
- Zissel, Gernot, et Joachim Müller-Quernheim. 2015. « Cellular Players in the Immunopathogenesis of Sarcoidosis ». *Clinics in Chest Medicine* 36 (4) : 549-60. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.08.016>.

Annexes

Annexe 1:

Jeny F, Grutters JC. Experimental models of sarcoidosis: where are we now? *Curr Opin Pulm Med.* 2020 Sep;26(5):554-561.

p202

Annexe 2:

Besnard V, Jeny F. Models Contribution to the Understanding of Sarcoidosis Pathogenesis: "Are There Good Models of Sarcoidosis?". *J Clin Med.* 2020 Jul 31;9(8):E2445

Page de garde p210

Annexe 3 :

Jeny, Florence, Yves Pacheco, Valerie Besnard, Dominique Valeyre, et Jean-François Bernaudin. 2016. « Experimental Models of Sarcoidosis ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 22 (5): 492-99.

Page de garde p211

Annexe 4 :

Jeny F, Bernaudin JF, Valeyre D, Nunes H, Planès C, Besnard V. L'hypoxie est-elle un facteur impactant l'évolution de la sarcoïdose pulmonaire ? [Is hypoxia a factor in the progression of pulmonary sarcoidosis?]. *Rev Mal Respir.* 2020 Mar;37(3):214-217.

Page de garde p212

Annexe 5:

Jeny F, Uzunhan Y, Lacroix M, Gille T, Brillet PY, Nardi A, Bouvry D, Planès C, Nunes H, Valeyre D. Predictors of mortality in fibrosing pulmonary sarcoidosis. *Respir Med.* 2020 Aug;169:105997.

p213

Annexe 6 :

Liste des publications réalisées pendant la thèse

p220



Experimental models of sarcoidosis: where are we now?

Florence Jeny^{a,b} and Jan C. Grutters^{c,d}

Purpose of review

Sarcoidosis remains a mysterious disease that presents many challenges both in pathogenetic understanding and in the management of patients. This review presents experimental models for sarcoidosis developed since 2016 and discusses their strengths and weaknesses and how they have contributed to the understanding and therapeutic approaches in this disease. In addition, future directions are proposed to overcome the limitations of current models.

Recent findings

New cellular models using infectious antigen as trigger, and transgenic models in mice have recently been developed to study signaling pathways potentially implicated in the pathogenesis of sarcoidosis.

Summary

No model fully reproduces sarcoidosis, but most of them generate data supporting key concepts and some open up therapeutic perspectives, like mTOR inhibition or IL-1 β blocking. However, there are still many limitations to these models, largely related to the complexity of sarcoidosis, which might be overcome with new technologies, such as mathematical modeling.

Keywords

experimental models, granuloma, sarcoidosis

INTRODUCTION

Sarcoidosis remains a mysterious and rare disease that presents many challenges both in pathogenetic understanding and in the management of patients. It is characterized by a granulomatous disease of the lungs, and in many cases involves other organs, and its origin is unknown [1,2]. The mechanisms involved in the initiation of inflammation and in the evolution of the granuloma, which can range from spontaneous resolution to perpetuation of the granuloma or its transformation into fibrosis, are poorly understood. Composition and role of the different cellular actors constituting granuloma, variability of environmental triggers, and genetic factors further add to its complexity.

From the clinician's point of view, sarcoidosis epidemiology and phenotype are characterized by wide variations according to age, sex, ethnicity, geographical origin, environment, socioeconomic status [2–5]. Two major issues include the risk of mortality, which is higher than in the general population [6,7] and related to prognostic factors such pulmonary fibrosis, pulmonary hypertension or ethnicity [8–11]; and the management of persistent signs of discomfort and parasarcoidosis syndrome

which can severely affect patients' quality of life, and whose pathogenicity is poorly understood.

For these reasons, there is high need for experimental models of sarcoidosis to understand its pathogenicity and to help in the therapeutic advancement. A good sarcoidosis experimental model must replicate human molecular and morphological features of granulomas, reproduce its natural history from onset to resolution, test various sarcoidosis-causing antigens, and the different therapeutics, able to represent the diverse disease phenotypes, and reproduce easily with low cost to facilitate high throughput [12,13]. However, because of its complexity and the absence of a

^aINSERM UMR 1272, Université Sorbonne Paris Nord, ^bAP-HP, Service de Pneumologie, Hôpital Avicenne, Bobigny, France, ^cDepartment of Pulmonology and Center of Interstitial Lung Diseases, St. Antonius Hospital, Nieuwegein and ^dDivision Heart and Lungs, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

Correspondence to Florence Jeny, AP-HP, Service de Pneumologie, Hôpital Avicenne, 125 Rue de Stalingrad, 93000 Bobigny, France. Tel: +33 149855125; e-mail: florence.jeny@aphp.fr

Curr Opin Pulm Med 2020, 26:554–561

DOI:10.1097/MCP.0000000000000708

KEY POINTS

- Understanding pathogenesis and finding treatment that improves clinical outcome is challenging in sarcoidosis.
- Recent experimental models of sarcoidosis have supported novel mechanisms of granuloma formation, which opens up therapeutic perspectives.
- Innovative technologies might help overcome limitations of current experimental models.

known cause, creating a good sarcoidosis model remains a challenge.

The aim of this review is to present the most recently developed sarcoidosis models since the last review four years ago [12] and discuss their strengths and weaknesses and how they have contributed to current understanding and therapeutic approaches in sarcoidosis. At last, future directions are proposed to overcome the limits of current models.

RECENT EXPERIMENTAL MODELS OF SARCOIDOSIS, ADVANTAGES, AND DISADVANTAGES (TABLE 1)

In-vitro models

In-vitro models are generally based on cells from patients with sarcoidosis derived from a single-cell type, unable to form granulomas, nor to study interactions and dynamics between cells, but allowing to study specifically one cellular actor, such multinuclear giant cell whose role is not well defined [14,15]; cells from bronchoalveolar lavage (BAL); or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), able to form granulomas after stimulation [16,17^{*}]. However, since the origin of constituting granuloma cells is complex, it is difficult to know whether BAL cells or PBMC are representative. Lepzien *et al.* [18] demonstrated in sarcoidosis, six different mononuclear phagocyte subsets varying in frequencies in the different following anatomical compartments: PBMCs, BAL, lung lymph node, and endobronchial biopsies. Cells from BAL or PBMC did not necessarily reflected cells obtained from lung lymph node and endobronchial biopsies [18]. Recent studies showed that resident interstitial macrophages in lung have a mixed origin but can be provided from blood monocytes [19]. Besides, tuberculosis-infected resident alveolar macrophage from mice could relocalize to the lung interstitium and initiate granuloma formation [20]. Still, PBMCs are readily available, and the cells that ultimately contribute to tissue granuloma formation can be derived from PBMCs [21].

Unlike histological analyses, in-vitro models can provide information on the dynamics of initial granuloma formation by studying the cellular actors involved, the signaling pathways induced and the gene and protein modifications [16,17^{*},22^{*}]. But these models are limited, as these shorted termed experiences do not explore the prolonged history of granuloma and its evolution toward fibrosis and not integrate currently the surrounding granuloma environment, such extracellular matrix, epithelium, endothelium, lymphatic, or cells like fibroblasts.

Contrary to in-vivo animal models, human in-vitro models include clinical and genetic variability, comorbidities, and exposures derived from sarcoidosis patient sample; however, this variability between patients exposes to more difficult biological analysis. At last, in-vitro models allow to test treatment effectiveness or to study the role of a suspect antigen in the formation of granulomas in sarcoidosis.

Models developed with peripheral blood mononuclear cell from patients with sarcoidosis

Few in-vitro granuloma models using samples from sarcoidosis patients have been developed recently. They are based on cell stimulation with infectious antigens suspected to be involved in sarcoidosis [23]. Crouser *et al.* used PBMCs exposed to tuberculin purified protein derivative-coated bead, as beads could promote phagocytosis [16]. PBMCs of sarcoidosis and latent tuberculosis PBMCs showed in-vitro multicellular granuloma formation characterized by central macrophage and peripheral T-cell aggregates compared with healthy people. However, despite similar in histology, sarcoidosis and latent tuberculosis displayed very distinctive cytokine and gene expression [16]. Locke *et al.* [22^{*}] with the same model, were able to correlate data from gene analysis between in-vitro granuloma and tissue from sarcoidosis patients.

Recently, Zhang *et al.* [17^{*}] showed that PBMCs from sarcoidosis patients with microparticles from *Mycobacterium abscessus* cell wall reproduce well-formed granulomas, with clear Th1 and Th17 inflammatory profiles based on gene expression and cytokine secretion studies, with a distinct response to mycobacterium between controls and sarcoidosis. The advantage according to the authors is that *M. abscessus* is more prevalent in environment than *Mycobacterium tuberculosis*.

A recent study worked on the effect of different strains of *Propionibacterium acnes* (suspect antigen in sarcoidosis) on PBMCs from healthy patients. *P. acnes* strain coming from the lymph nodes of patients with sarcoidosis was responsible for the

Table 1. Recent experimental models of sarcoidosis

Models	Methods	Advantages	Disadvantages	Applications or novel insights	Future directions
In vitro models PBMCs from sarcoidosis patients*	PBMCs exposed to tuberculin PPD-coated bead [16,22 [¶]] <i>M. abscessus</i> cell wall microparticules [17 [¶]] <i>P. acnes</i> [24]	Readily available Made with various cells populations Include sarcoidosis variability (clinical, genetic) Able to test treatment effectiveness Able to study the role of suspect antigen Difference between sarcoidosis and control	No spontaneous models Do not explore prolonged history of granuloma No surrounding granuloma environment PBMCs representative of granuloma cells?	Explore early step of granuloma formation Different results between types of antigen allowing to explore different sarcoidosis key features - M2 polarization and IL-13 pathway [22 [¶]]	3D in-vitro models Lung-on-the-chip - Mathematical and in-silico model resuming the different data from biological and other omics
In-vivo mice models exposed to putative sarcoidosis causing agents		Association with transgenic model to study different signaling pathways Able to study different phases of granuloma evolution	No spontaneous models Unable to replicate polygenic immune-mediated human disease No systemic disease		Transgenic mice with genetic sarcoidosis polymorphism Humanized mouse model
<i>P. acnes</i> [30–32]	Intratracheal instillation(s) of <i>P. acnes</i> (alive or	inactivated) ± sensitization ± adjuvant	Antigen suspected in sarcoidosis Possibility according to the frequency of instillation to study pulmonary fibrosis or spontaneously resolving granuloma	Sensitization (hypersensitivity granulomatous reaction) Various methods suggesting difficulty in reproducibility	IL17A pathways with regulation of balance Th17/Treg in granuloma formation [32]
Mycobacteria [33,34 ^{¶¶}]	Intravenous injection of TDM + IFA [34 ^{¶¶}] SodA coated beads with subcutaneous sensitization + IFA [33]	Antigen suspected in sarcoidosis No sensitization [34 ^{¶¶}] Supported and validated by human data [33]	Acute and transient with spontaneous resolution No epithelioid cells in the center of the evolving granuloma [34 ^{¶¶}]	Inflammasome implication in early phase of granuloma formation Test of anti-IL-1-β and NLRP3 inflammasome blocker (MCC950)	
Inorganic [35 [¶] ,36–40]	Intratracheal instillation of MWCNT Quantum dots [40]	Carbon nanoparticle suspected antigen Transcriptional similarity with patient [37] Double hit strategy (ESAT-6 + MWCNT) and lung fibrosis Long-lasting granuloma	Foreign body granuloma No granuloma on mediastinal lymph nodes	PPAR-γ and immunometabolic consequence in granuloma	
mTORC1 model [40]	Activation of the metabolic checkpoint kinase mTORC1 in macrophages by deletion of TSC2 in mice	No requirement of antigen exposure Systemic disease (lung, skin, ganglion) Persistent granuloma Validation with human sample and genetic study	Represent only some form of sarcoidosis (1/3 of granuloma)	mTORC1 pathways involvement in persistent sarcoidosis disease Trial ongoing	

α-MSH α-melanocyte stimulating hormone; IFA, incomplete Freund adjuvant; MWCNT, multiwall carbon nanotube; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PPAR-γ, peroxisome proliferator-activated receptor-γ; PPD, purified protein derivate; TDM, trehalose 6,6'-dimycolate (glycolipid molecule extracted from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*); TSC2, tuberous sclerosis complex 2.
*Not tested in sarcoidosis PBMCs.

highest number of granulomas, but with a significantly higher bacterial burden, and with a higher decrease in CD8+ T lymphocytes and a higher increase of CD4+ T lymphocytes contrary to other strains [24].

A limitation of sarcoidosis in-vitro research is the lack of specificity relating to disease-causing antigen, and the choice of a single antigen is difficult as results are different even with different strains from a single type of bacteria, also, granuloma formation in-vitro is not spontaneous. With the development of 3D models like it is performed in tuberculosis in-vitro, an environmental substrate might help in the formation of granuloma without antigen stimulation, by favoring cellular contacts and taking into account the spherical dimension of the granuloma [25^o].

In-vivo models

There are no spontaneous animal models of sarcoidosis except in very rare cases in horses, Norway brown rats, and very recently in dogs [26]. Many models of granulomatosis with known causes but different etiopathogeny from sarcoidosis have been developed such models for tuberculosis or recently with abatacept (inhibitor of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) known to cause sarcoidosis like reactions, leading to granulomatous hepatitis in mice [27,28]. Chronic beryllium disease which is very similar to sarcoidosis clinically and pathologically was nicely modeling with transgenic mice overexpressing major histocompatibility complex class II-DP2 and exposed to beryllium. Recently, this model evidenced a protective role of B cells in the disease [29^o].

Like in-vitro models, the majority of current in-vivo models exposed mice to putative sarcoidosis causing agents, either antigens of infectious origin or inorganic particles but are unable to accurately replicate polygenic immune-mediated human granulomatous disease, and only reproduce a lung granuloma without systemic disease.

Models based on infectious agents

The two main in-vivo models based on infectious agents followed different strategies: the use of mycobacterial antigens without provoking tuberculosis and the exposure to *P. acnes*.

P. acnes models vary widely in methods between studies: different strains, alive or inactivated bacteria [30], preceded or not by *P. acnes* sensitization, with or without adjuvant [31^o,32]. Interestingly, repeated intratracheal instillations provided more granulomas and an evolution toward pulmonary fibrosis compared with one instillation that is

followed by resolution of granuloma after few weeks [32]. These two types of administration allow studying different evolutions similarly to the different courses of sarcoidosis. However, these very different methods underline the difficulty of handling *P. acnes* models and their reproducibility. Moreover, sensitization might induce granulomatous reaction because of hypersensitivity that is different from sarcoidosis. Only Werner *et al.* [30] obtained granuloma without sensitization but with viable strain of *P. acnes* isolated from a patient with sarcoidosis.

Because sarcoidosis patients can be reactive to some mycobacterial proteins and that mycobacteria antigens were detected in sarcoidosis patient granulomas [23], models were generated using mycobacterial peptides to study granuloma development in mouse lungs sometimes with prior sensitization [33]. Huppertz *et al.* [34^o] used intravenously injection of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) (glycolipid molecule extracted from the cell wall of *M. tuberculosis*) associated with incomplete Freund adjuvant to reproduce lung granulomatosis in mice. However, TDM-induced granuloma formation was limited by an acute and transient with spontaneous resolution that occurs after 10 days, and ultrastructural analysis showed accumulation of macrophages but not epithelioid cells in the center of the evolving granuloma [34^o].

Models based on inhalation of inorganic particles

Based on the possible association between carbon nanoparticles and sarcoidosis, murine model of chronic granulomatous inflammation was generated by administration of multiwall carbon nanotubes (MWCNT) by the team from East Carolina University [35^o,36–39] or by quantum dots (QDOT), particularly QDOT705, a cadmium-based nanoparticles [40]. Interestingly, granulomatous inflammation was different between MWCNT and QDOT, with a more pronounced inflammation and a different type of cell recruitment with QDOT [40]. A limitation of nanoparticle models is that they can assimilate to foreign body granulomas with fundamentally different immune features than sarcoidosis.

Interestingly, Mohan *et al.* [37] evidenced in the MWCNT model, transcriptional similarity in activated pathway between alveolar macrophages from mice and from sarcoidosis patients. The same team showed additive effects on granuloma formation by using a combination of MWCNT with microbial antigens (mycobacterial antigen 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6), a T-cell activator associated with tuberculosis and sarcoidosis) [35^o]. The double hit strategy promoted increased granulomas, fibrosis, and inflammatory mediators,

indicating that trigger multiplication could be responsible for granuloma persistence associated with pulmonary fibrosis. Contrary to sarcoidosis, granulomas were absent on mediastinal lymph node from mice in this model [36]. Taken together, these nanoparticle models allow studying long-lasting granuloma (60 days) and fibrosing evolution.

Transgenic models

Antigen-mediated models have been mixed with transgenic mice to study signaling pathways potentially implicated in the pathogeny for sarcoidosis like NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (*NLRP3*), *IL17A*, *PPARG*, or mutations involving innate immunity [30,31[■],34[■],36].

In 2017, a very interesting model, (*cf infra*) without antigen exposure, whose initial goal was to study the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in macrophages, described sarcoid-like granulomas generated with the deletion of the inhibitor tuberous sclerosis complex 2 (*Tsc2*) in the myeloid lineage in mice. Mice exhibited spontaneous formation of noncaseating granulomas with epithelioid cells in multiple organs (lung, skin, ganglion) [41[■]]. In addition to modeling the disease, this study

might represent a major breakthrough in the understanding of the pathogenesis.

CONTRIBUTION OF MODELS TO UNDERSTANDING OF SARCOIDOSIS PATHOGENICITY AND TO THERAPEUTIC TARGETS

Models led to significant advances in the understanding of the disease with identification of possible pathways involved in sarcoidosis, and for some to therapeutic trials (Fig. 1).

mTOR Complex 1 (mTORC1) signaling pathways in persistent sarcoidosis

Linke *et al.* [41[■]] with the activation of the metabolic checkpoint kinase mTORC1 in macrophages, by deletion of *Tsc2* induced systemic granulomatous disease. They evidenced in macrophages an increase proliferation, inhibition of apoptosis, increased glycolysis, and development of hypertrophic epithelioid cells. At last, everolimus an mTOR inhibitor was able to completely resolve granuloma in mice. The authors identified activated mTORC1 signaling in one-third of granulomas obtained from

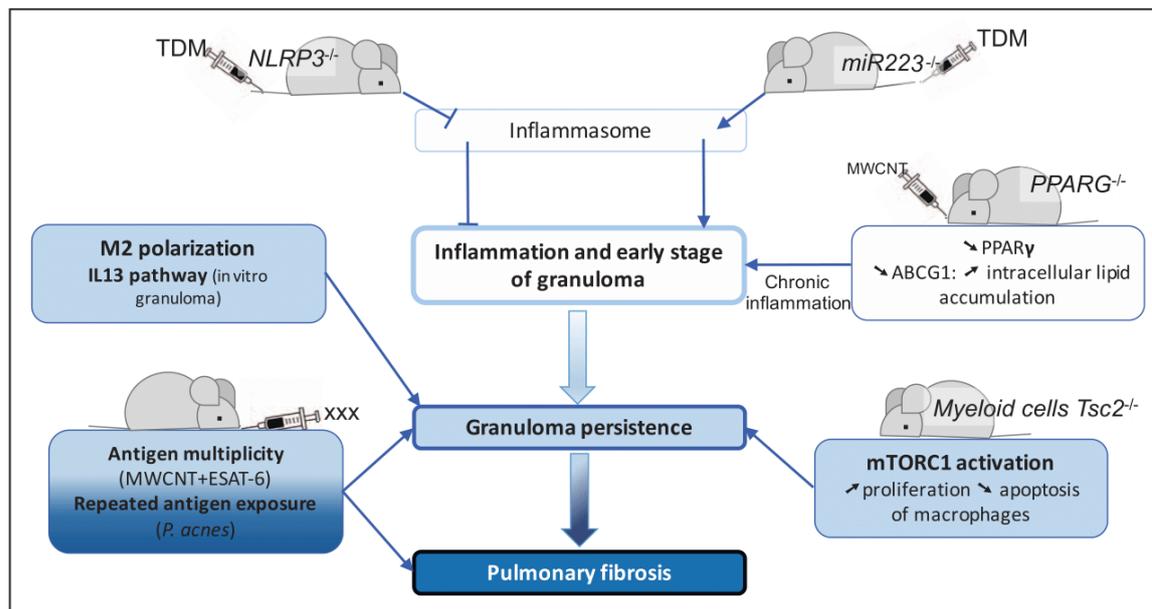


FIGURE 1. Key understanding from recent experimental models. In sarcoidosis, an uncontrolled and chronic inflammation could be amplified by inflammasome pathway or lipid metabolism dysregulation leading to lipid accumulation in macrophages. Chronic disease is possibly favored by persistence of M2 polarization or mTORC1 activation in macrophages inducing proliferation and decreased apoptosis. Pulmonary fibrosis could be triggered by multiplicity repeated antigen exposure. MWCNT, mTORC1, mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; MWCNT, multiwall carbon nanotube; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; TDM, trehalose 6,6'-dimycolate (glycolipid molecule extracted from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*); TSC2, tuberous sclerosis complex 2; ABCG1, ATP-binding cassette lipid transporter-G1.

27 biopsies from patients, associated with markers of proliferation, and the mTORC1 pathway was significantly enriched in population with progressive disease compared with self-limiting disease. This study highlights the possible role of mTORC1 pathway in chronic disease and persistent granuloma. These results were supported by a genetic study on five French families, which led to the identification of enriched gene in mTOR signaling pathway and autophagy [42]. One developed hypothesis is that defects in autophagy and mTOR-related pathways decrease the clearance of antigens and promote granuloma formation and Th17 differentiation in sarcoidosis [43[¶]]. A successful treatment of sarcoidosis with the mTOR inhibitor rapamycin has been reported [44] and a pilot study with sirolimus in sarcoidosis with cutaneous affection is ongoing (EudraCT Number: 2017-004930-27).

Inflammasome in early stage of sarcoidosis

Huppertz *et al.* [34^{¶¶}] used a murine pulmonary granuloma induced by TDM to support their results in human, showing that NLRP3 inflammasome pathway is activated in sarcoidosis. They evidenced in sarcoid granulomas, coexpression of active Casp-1 and IL-1 β (activated NLRP3 inflammasome components), with an IL-1 β staining score positively correlated with disease severity. They further show that cells from severe sarcoidosis patients increased IL-1 β production. The transcription of miR-223 (NLRP3 down regulator), was decreased in alveolar macrophages, whereas NLRP3 mRNA expression levels were increased. In the murine model using TDM, BAL cells displayed increased IL-1 β and immunohistochemical staining showed that macrophages in the granulomas express IL-1 β . Deficient mice for NLRP3 and miR-223 exhibited decreased or increased lung granuloma counts, respectively. At last, NLRP3 inhibitor MCC950 or anti-IL-1 β antibody decreased numbers of pulmonary granuloma in TDM wild-type mice. This model could be used to analyze specifically the contribution of IL-1 β in the disease especially in early stage of sarcoidosis. Targeting the inflammasome using IL-1 β blockade in cardiac sarcoidosis (ClinicalTrials.gov NCT04017936) or in patients with active pulmonary sarcoidosis (NCT02888080) is ongoing.

Immunometabolic role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) is a transcription factor regulating adipogenesis and antiinflammatory genes. PPAR γ activity was shown to be deficient in alveolar macrophages from patients

with sarcoidosis [45]. Conversely, in MWCNT mice model, a deficiency in PPAR γ has been evidence [46]. Transgenic mouse knockout for PPAR γ exhibited higher inflammatory response, more granulomas, increased TH17 markers in BAL, and more pulmonary fibrosis when exposed to MWCNT and ESAT-6 compared with wild-type mice [35[¶],36]. In wild-type animals, rosiglitazone, an antidiabetic drug, and PPAR γ -specific ligand limited the frequency and severity of MWCNT-induced pulmonary granulomas, attenuated alveolar macrophage nuclear factor-kappa B (NF κ B) activity and downregulated the expression of proinflammatory mediators compared with placebo [39]. Rosiglitazone also prevented the MWCNT-deficiency of ATP-binding cassette lipid transporter-G1 (ABCG1) expression. ABCG1 deficiency resulted in lipid accumulation which promoted proinflammatory macrophage activation [38,39]. Deficiency of alveolar macrophage ABCG1 (myeloid-specific lipid transporter knockout mice) promoted pulmonary granulomatous inflammation in MWCNT model [38]. Interestingly, patients with sarcoidosis also displayed reduced ABCG1 messenger RNA and protein in BAL cells compared with healthy control patients [46]. PPAR γ pathway is known to be involved in several granulomatous disease, its dysregulation in a disease scenario can have immunometabolic consequences that directly impact macrophage effector functions and disease outcome [14].

Antiinflammatory role of α -melanocyte stimulating hormone

Recently, Zhang *et al.* tested on their in-vitro model of PBMC exposed to *Mycobacterium abscessus* particles, the effect of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). α -MSH decreased inflammatory mediators because of phosphorylation of C-AMP Response Element-binding protein (CREB), a transcription factor for antiinflammatory genes. However, α -MSH did not have effect on granuloma formation [17[¶]].

Immune cells diversity and polarization

The dogma of predominant M1/Th1 response in sarcoidosis has been modified by recent studies supported by experimental models in last few years. The balance between Th17, Th17.1 cells, and Tregs in sarcoidosis patients has important implication in the pathogenesis of the disease [47]. Interestingly, *IL-17A* gene knockout mice prevented the formation of granuloma induced by *P. acnes* and was associated with modification of the Th17/Treg balance in favor of Treg [31[¶]].

Crouser *et al.* [16] showed that granuloma formation was associated with maintenance of M2 polarization markers with possible involvement of the IL13 pathway [22^{*}]. M2 polarization would favor the aggregation of macrophages and their fusion. In addition, authors found M2 polarization marker (CD163) in lung tissue [22^{*}]. Nevertheless, macrophages display remarkable plasticity and can change their physiology in response to environmental factors. Mosser *et al.* [48] proposed a spectrum of macrophage populations based on three different homeostatic activities – host defense, wound healing, and immune regulation. Single-cell analysis has further and will be extended the known spectrum of activation states beyond the original M1/M2 dichotomy [49].

FUTURES DIRECTIONS

In-vitro models are limited by the absence of a matrix and cellular environment. To address these limitations, 3D culture models are currently being developed in tuberculosis [25^{*}], and organoid model like lung-on-a-chip technique would represent an accurate model to study the impact of lung environment on granuloma [50,51].

To overcome the limit of origin of granuloma cells, ex-vivo techniques using tissues from patients should be developed. Recently, an ex-vivo technique succeed to maintained in 3D culture microdissected zebrafish mycobacteria granuloma enables to study high-resolution microscopy of granuloma macrophage dynamics, including epithelioid macrophage motility and granuloma consolidation [52^{*}].

In-vivo models, do not fully take into account the variability of the disease. The use of mouse models with genetic mutations whose polymorphisms have been noted in sarcoidosis, accompanied by an environmental trigger, would make it possible to understand the implications of these polymorphisms in the pathogenesis of sarcoidosis. Also, contrary to historical models based on injection of sarcoid material from patients into rodents with contrasting results, humanized mouse using immunodeficient mice engrafted with human stem cells, that can currently mimicking disease of human tuberculosis [53], could give the possibility to test sarcoidosis cells in a humanized mouse model. The variability of the disease should finally be best modeled by mathematical and in-silico models. The last model developed in sarcoidosis was published in 2014 by Hao *et al.* [54] who developed an in-silico model based on disease mechanisms, including interactions between cytokines, various cells and chemokines reported in the literature. In-silico model requires biological robustness and will

rely on recent technique of single-cell analysis and other omics, to provide personalized medicine. At last, no model has addressed the symptoms or para-sarcoidosis syndromes, which remains one of the major concerns of patients [55].

CONCLUSION

In conclusion, the last few years have seen the development of sarcoidosis models, particularly *in vitro* and *in vivo*, which have made it possible to make progress in the understanding of the disease and opening up new therapeutic perspectives. However, there are still many limitations to these models, largely explained by the complexity of sarcoidosis, but that might be overcome with the introduction of new technologies in the near future.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

None.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

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

- of special interest
- of outstanding interest

1. Crouser ED, Maier LA, Wilson KC, *et al.* Diagnosis and detection of sarcoidosis: an official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 201:e26–e51.
2. Grunewald J, Grutters JC, Arkema EV, *et al.* Sarcoidosis. *Nat Rev Dis Primer* 2019; 5:45.
3. Brito-Zerón P, Kostov B, Superville D, *et al.* Geoepidemiological big data approach to sarcoidosis: geographical and ethnic determinants. *Clin Exp Rheumatol* 2019; 37:1052–1064.
4. Ramos-Casals M, Kostov B, Brito-Zerón P, *et al.* How the frequency and phenotype of sarcoidosis is driven by environmental determinants. *Lung* 2019; 197:427–436.
5. Ungprasert P, Carmona EM, Utz JP, *et al.* Epidemiology of sarcoidosis 1946–2013: a population-based study. *Mayo Clin Proc* 2016; 91:183–188.
6. Rossides M, Kullberg S, Askling J, *et al.* Sarcoidosis mortality in Sweden: a population-based cohort study. *Eur Respir J* 2018; 51:1701815.
7. Jamilloux Y, Maucort-Boulch D, Kerever S, *et al.* Sarcoidosis-related mortality in France: a multiple-cause-of-death analysis. *Eur Respir J* 2016; 48:1700–1709.
8. Kirkil G, Lower EE, Baughman RP. Predictors of mortality in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2018; 153:105–113.
9. Jeny F, Uzunhan Y, Lacroix M, *et al.* Predictors of mortality in fibrosing pulmonary sarcoidosis. *Respir Med* 2020; 169:105997.
10. Boucly A, Cottin V, Nunes H, *et al.* Management and long-term outcomes of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2017; 50:1700465.
11. Mirsaeidi M, Machado RF, Schraufnagel D, *et al.* Racial difference in sarcoidosis mortality in the United States. *Chest* 2015; 147:438–449.
12. Jeny F, Pacheco Y, Besnard V, *et al.* Experimental models of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2016; 22:492–499.
13. Le V, Crouser ED. Sarcoidosis models: past, present, and future. In: Baughman RP, Valeyre D, editors. *Sarcoidosis* [Internet]. Philadelphia: Elsevier; 2019. pp. 67–73. ; Chapter 5.
14. Wilson JL, Mayr HK, Weichhart T. Metabolic programming of macrophages: implications in the pathogenesis of granulomatous disease. *Front Immunol* 2019; 10:2265.

15. Tanimura H, Mizuno K, Okamoto H. Serum levels of soluble CD163 as a specific marker of macrophage/monocyte activity in sarcoidosis patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG* 2015; 32:99–105.
 16. Crouser ED, White P, Caceres EG, *et al.* A novel in vitro human granuloma model of sarcoidosis and latent tuberculosis infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017; 57:487–498.
 17. Zhang C, Chery S, Lazerson A, *et al.* Anti-inflammatory effects of α -MSH through p-CREB expression in sarcoidosis like granuloma model. *Sci Rep* 2020; 10:7277.
- Original in-vitro granuloma model using *Mycobacterium abscessus* particles on PBMCs.
18. Lepzien R, Rankin G, Pourazar J, *et al.* Mapping mononuclear phagocytes in blood, lungs, and lymph nodes of sarcoidosis patients. *J Leukoc Biol* 2019; 105:797–807.
 19. Evren E, Ringqvist E, Willinger T. Origin and ontogeny of lung macrophages: from mice to humans. *Immunology* 2020; 160:126–138.
 20. Cohen SB, Gern BH, Delahaye JL, *et al.* Alveolar macrophages provide an early *Mycobacterium tuberculosis* niche and initiate dissemination. *Cell Host Microbe* 2018; 24:439–446.e4.
 21. Pagán AJ, Ramakrishnan L. The formation and function of granulomas. *Annu Rev Immunol* 2018; 36:639–665.
 22. Locke LW, Crouser ED, White P, *et al.* IL-13-regulated macrophage polarization during granuloma formation in an in vitro human sarcoidosis model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; 60:84–95.
- Interesting in-vitro model previously well described, supporting the idea of M2-macrophage polarization in sarcoidosis.
23. Esteves T, Aparicio G, Garcia-Patos V. Is there any association between sarcoidosis and infectious agents?: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med* 2016; 16:165.
 24. Aubin GG, Ada Da Silva G, Eishi Y, *et al.* Immune discrepancies during in vitro granuloma formation in response to *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* infection. *Anaerobe* 2017; 48:172–176.
 25. Elkington P, Lerm M, Kapoor N, *et al.* In vitro granuloma models of tuberculosis: potential and challenges. *J Infect Dis* 2019; 219:1858–1866.
- Well-documented review on new techniques used for in-vitro tuberculosis granuloma models
26. Iyori K, Kinoshita M, Imai A, *et al.* Clinical and histopathological presentation and successful treatment with ciclosporin for canine sarcoidosis: a case report. *Vet Dermatol* 2019; 30:438.e136.
 27. Cohen Aubart F, Lhote R, Amoura A, *et al.* Drug-induced sarcoidosis: an overview of the WHO pharmacovigilance database. *J Intern Med* 2019. [published online ahead of print, 2019 Oct 15]
 28. Almogairien SM. Abatacept induced granulomatous hepatitis with a sarcoidosis-like reaction: a blinded trial in mice. *BMC Pharmacol Toxicol* 2019; 20:26.
 29. Atif SM, Mack DG, McKee AS, *et al.* Protective role of B cells in sterile particulate-induced lung injury. *JCI Insight* 2019; 5:e125494.
- Very interesting in-vivo transgenic model (HLA-DP2 overexpression mice exposed to beryllium) of chronic beryllium disease highlighting the protective role of B lymphocytes.
30. Werner JL, Escolero SG, Hewlett JT, *et al.* Induction of pulmonary granuloma formation by *Propionibacterium acnes* is regulated by MyD88 and Nox2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017; 56:121–130.
 31. Song J, Zhao M, Li Q, *et al.* IL-17A can promote *Propionibacterium acnes*-induced sarcoidosis-like granulomatosis in mice. *Front Immunol* 2019; 10:1923.
- Implication of TH17, IL17A pathways in a model of *P. acnes* in-vivo model using transgenic mice KO for IL-17A.
32. Jiang D, Huang X, Geng J, *et al.* Pulmonary fibrosis in a mouse model of sarcoid granulomatosis induced by booster challenge with *Propionibacterium acnes*. *Oncotarget* 2016; 7:33703–33714.
 33. Zhang B, Zhao F, Mao H, *et al.* Interleukin 33 ameliorates disturbance of regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis. *Int Immunopharmacol* 2018; 64:208–216.
 34. Huppertz C, Jäger B, Wiczorek G, *et al.* The NLRP3 inflammasome pathway is activated in sarcoidosis and involved in granuloma formation. *Eur Respir J* 2020; 55:1900119.
- This study well demonstrated the implication of NLRP3 inflammasome pathway in sarcoidosis supported by an in-vitro granuloma model which also was used to test different drugs targeting inflammasome.
35. Malur A, Mohan A, Barrington RA, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ deficiency exacerbates fibrotic response to mycobacteria peptide in murine sarcoidosis model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; 61:198–208.
- This study used an in-vivo model able to reproduce granuloma and pulmonary fibrosis by the association of mycobacteria peptide to MWCNT instillation and highlight thanks to transgenic mice the involvement of PPAR γ .
36. Sanderford V, Barna BP, Barrington RA, *et al.* PPAR γ deficiency in carbon nanotube-elicited granulomatous inflammation promotes a Th17 response to a microbial antigen. *J Nanomed Nanotechnol* 2020; 11:541.
 37. Mohan A, Malur A, McPeck M, *et al.* Transcriptional survey of alveolar macrophages in a murine model of chronic granulomatous inflammation reveals common themes with human sarcoidosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018; 314:L617–L625.
 38. McPeck M, Malur A, Tokarz DA, *et al.* Alveolar macrophage ABCG1 deficiency promotes pulmonary granulomatous inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; 61:332–340.
 39. McPeck M, Malur A, Tokarz DA, *et al.* PPAR-gamma pathways attenuate pulmonary granuloma formation in a carbon nanotube induced murine model of sarcoidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503:684–690.
 40. Pacheco Y, Ponchon M, Lebecque S, *et al.* Granulomatous lung inflammation is nanoparticle type-dependent. *Exp Lung Res* 2018; 44:25–39.
 41. Linke M, Pham HT, Katholnig K, *et al.* Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. *Nat Immunol* 2017; 18:293–302.
- Very interesting in vivo model, without antigen exposure, able to general sarcoid-like granulomas in different organs with the deletion of Tsc2 in the myeloid lineage in mice. In addition to modelling the disease, this study represents a major breakthrough in the understanding of the pathogenesis.
42. Calender A, Lim CX, Weichhart T, *et al.* Exome sequencing and pathogenicity-network analysis of five French families implicate mTOR signalling and autophagy in familial sarcoidosis. *Eur Respir J* 2019; 54:1900430.
 43. Pacheco Y, Lim CX, Weichhart T, *et al.* Sarcoidosis and the mTOR, Rac1, and autophagy triad. *Trends Immunol* 2020; 41:286–299.
- Very well-documented and precise review with interesting hypothesis on the association between mTOR, Rac1, and autophagy.
44. Manzia TM, Bellini MI, Corona L, *et al.* Successful treatment of systemic de novo sarcoidosis with cyclosporine discontinuation and provision of rapamune after liver transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2011; 24:e69–e70.
 45. Culver DA, Barna BP, Raychaudhuri B, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity is deficient in alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30:1–5.
 46. Barna BP, McPeck M, Malur A, *et al.* Elevated microRNA-33 in sarcoidosis and a carbon nanotube model of chronic granulomatous disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 54:865–871.
 47. Crouser ED. Role of imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2018; 24:521–526.
 48. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:958–969.
 49. Locati M, Curtale G, Mantovani A, *et al.* Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2020; 15:123–147.
 50. Thacker VV, Dhar N, Sharma K, *et al.* A lung-on-chip infection model reveals protective and permissive roles of alveolar epithelial cells in tuberculosis. *bioRxiv* 2020; 2020.02.03.931170.
 51. Konar D, Devarasetty M, Yildiz DV, *et al.* Lung-on-a-chip technologies for disease modeling and drug development. *Biomed Eng Comput Biol* 2016; 7(Suppl 1):17–27.
 52. Cronan MR, Matty MA, Rosenberg AF, *et al.* An explant technique for high-resolution imaging and manipulation of mycobacterial granulomas. *Nat Methods* 2018; 15:1098–107.
- Methods study showing the possibility of ex-vivo culture of mycobacterial granuloma from zebrafish; technique that could be considered during sarcoidosis.
53. Arrey F, Löwe D, Kuhlmann S, *et al.* Humanized mouse model mimicking pathology of human tuberculosis for in vivo evaluation of drug regimens. *Front Immunol* 2019; 10:89.
 54. Hao W, Crouser ED, Friedman A. Mathematical model of sarcoidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:16065–16070.
 55. van Helmond SJ, Polish LB, Judson MA, Grutters JC. Patient perspectives in sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2019; 25:478–483.

Review

Models Contribution to the Understanding of Sarcoidosis Pathogenesis: “Are There Good Models of Sarcoidosis?”

Valérie Besnard ^{1,*}  and Florence Jeny ^{1,2} 

¹ UMR 1272, Hypoxie & Poumon, Université Sorbonne Paris Nord, 1 rue de Chablis, 93017 Bobigny, France; florence.jeny@aphp.fr

² AP-HP, Hôpital Avicenne, Service de Pneumologie, 93017 Bobigny, France

* Correspondence: valerie.besnard@inserm.fr; Tel.: +33-148-388-877; Fax: +33-148-388-924

Received: 8 July 2020; Accepted: 27 July 2020; Published: 31 July 2020



Abstract: Sarcoidosis is a systemic, granulomatous, and noninfectious disease of unknown etiology. The clinical heterogeneity of the disease (targeted tissue(s), course of the disease, and therapy response) supports the idea that a multiplicity of trigger antigens may be involved. The pathogenesis of sarcoidosis is not yet completely understood, although in recent years, considerable efforts were put to develop novel experimental research models of sarcoidosis. In particular, sarcoidosis patient cells were used within in vitro 3D models to study their characteristics compared to control patients. Likewise, a series of transgenic mouse models were developed to highlight the role of particular signaling pathways in granuloma formation and persistence. The purpose of this review is to put in perspective the contributions of the most recent models in the understanding of sarcoidosis.

Keywords: sarcoidosis; models; macrophage; lung; granuloma

1. Introduction

Sarcoidosis is a systemic disease of unknown etiology that is characterized by the formation of immune granulomas in different organs, mainly the lungs, the lymphatic system, the skin, the eye, and the heart [1]. The diagnosis consists of the association of compatible clinical, biological, and radiological signs, the histological demonstration of a granuloma characteristic of sarcoidosis, and the elimination of other causes of granulomatosis [2]. Genetically predisposed individuals are exposed to unknown trigger(s), possibly microorganisms, inorganic particles, or other environmental factors that initiate and maintain inflammatory and immune responses. Genetic susceptibility plays an important role in the pathogenesis of sarcoidosis [3]. Recently, nucleotide-binding oligomerization domain 2 *NOD2* mutations were involved in the pathogenesis of sarcoidosis, as well as in Blau syndrome (BS) and early onset sarcoidosis (EOS) [4–7]. *NOD2* is a cytosolic protein that is involved in microbial cell wall components sensing and inflammation regulation through NFκB activation [8]. In a Swedish study, Rossides et al. showed an increasing risk (3.7 fold) in first-degree relatives of patient with sarcoidosis [9]. Likewise, analysis of a twin cohort revealed an 80-fold increased risk of developing sarcoidosis compared to the general population [10]. A gene–environment interaction study identified additional genes (*FCRL1*, *IL23R*) that could distinguish patients with or without Löfgren’s syndrome [11].

The epidemiology and phenotype of sarcoidosis varies highly around the world across age, sex, ethnicity groups, environmental exposure, and socioeconomic status [12–15]. In France, it is an uncommon disease, with a prevalence of 30.2/100,000 people and an incidence of 4.9/100,000 [16]. African Americans and Northern Europeans seem to be the two most affected groups [17,18]. Sarcoidosis incidence and prevalence appear higher in women around the world with some exceptions [19–23].

REVIEW



Experimental models of sarcoidosis

Florence Jeny^{a,b}, Yves Pacheco^c, Valerie Besnard^b, Dominique Valeyre^{a,b},
and Jean-François Bernaudin^{a,b,d}

Purpose of review

Sarcoidosis is a disease caused by a complex combination of genetic susceptibility, immune networks and infectious and/or environmental agents. The onset and phenotypic variability of sarcoidosis remain poorly elucidated, not only due to the lack of clearly identified causes, but also because it is widely considered that no reliable model of this disease is available. In this review, we discuss the various models of granulomatous diseases in order to challenge this assertion.

Recent findings

A large number of models of granulomatous diseases are available, both cellular models used to study the natural history of granulomas and experimental animal models mostly developed in rodents.

Summary

Although none of the available models fully reproduces sarcoidosis, most of them generate various data supporting key concepts. Selected models with a high level of confidence among those already published may provide various pieces of the sarcoidosis jigsaw puzzle, whereas clinical data can provide other elements. A 'systems biology' approach for modelling may be a way of piecing together the various pieces of the puzzle. Finally, experimental models and a systemic approach should be considered to be tools for preclinical evaluation of the efficacy of drugs prior to testing in clinical trials.

Keywords

experimental models, granuloma, sarcoidosis

INTRODUCTION

Sarcoidosis remains a challenging disease with highly variable clinical presentations and a natural history that remains enigmatic. It is characterized by an exaggerated granulomatous immunologic response and the epithelioid cell granuloma is considered to be a histologic hallmark of the disease [1,2]. Recent progress in our understanding of sarcoidosis has emphasized the complex interplay between a genetic background/susceptibility, innate and adaptive immune networks and infectious antigens and/or environmental agents [1,2]. However, current knowledge of the disease can be considered to be essentially based on theoretical concepts rather than a comprehensive knowledge of the sequential mechanisms involved in the pathogenesis of the various stages of the disease. This lack of knowledge is generally attributed to the absence of clearly identified causal agents and a reliable model of the disease. The purpose of this article is therefore to review this last assertion.

One of the approaches initially proposed to address this issue was based on the analogy with other granulomatous diseases, such as berylliosis or diseases induced by *Mycobacteria* [3]. However, while sustained by similar histopathologic lesions,

tuberculosis for example and sarcoidosis are really different diseases. Another way would be to benefit from spontaneous sarcoidosis in animals, but it is very rarely reported in other species than humans. The alternate way is to develop various experimental in-vitro and/or in-vivo models allowing comprehensive studies of the various mechanisms and their inter-relationship.

In summary, a reliable model of sarcoidosis must address the following objectives:

- (1) Reproduce the characteristic granulomatous immune reaction and its natural history, from onset to resolution.

^aAP-HP, Hôpital Avicenne, Service de Pneumologie, ^bUniversité Paris 13, EA2363, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, ^cUniversité Claude Bernard Lyon-1, Lyon and ^dUniversité Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris, France

Correspondence to Prof. Dr Jean-François Bernaudin, Service de Pneumologie, Hôpital Avicenne, 93000 Bobigny, France. Tel: +33 148955120; fax: +33 148955129; e-mail: jean-francois.bernaudin@aphp.fr

Curr Opin Pulm Med 2016, 22:000–000

DOI:10.1097/MCP.0000000000000295



ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com


JOURNÉES DE RECHERCHE RESPIRATOIRE

L'hypoxie est-elle un facteur impactant l'évolution de la sarcoïdose pulmonaire ?

Is hypoxia a factor in the progression of pulmonary sarcoidosis?

F. Jeny^{a,b,*}, J.-F. Bernaudin^{a,b,c}, D. Valeyre^{a,b},
H. Nunes^{a,b}, C. Planès^{a,d}, V. Besnard^a

^a UMR 1272 hypoxie & poumon, Inserm–université Paris 13, SMBH, Bobigny, France

^b Service de pneumologie, hôpital Avicenne AP–HP, Bobigny, France

^c Faculté de médecine, Sorbonne université, Paris, France

^d Service d'explorations fonctionnelles, hôpital Avicenne AP–HP, Bobigny, France

Reçu le 12 janvier 2020 ; accepté le 12 janvier 2020

MOTS CLÉS

Sarcoïdose
pulmonaire ;
Hypoxie ;
Granulome

Résumé La sarcoïdose est une affection qui peut réduire l'espérance de vie principalement en raison d'une fibrose pulmonaire que l'on pense induite par le granulome épithélioïde. L'absence de vascularisation du cœur des granulomes suggère que les macrophages constitutifs de ces structures sont en hypoxie. Or, les voies de signalisation cellulaires hypoxiques constituent des facteurs pro-inflammatoires et profibrosants dans différents organes. Des données récentes suggèrent une implication du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF) dans les mécanismes impliqués dans la sarcoïdose, ce qui constituerait une nouvelle piste de recherche dans la compréhension et la prise en charge thérapeutique de la maladie.

© 2020 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Pulmonary
sarcoidosis;
Hypoxia;
Granuloma

Summary Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease that can reduce life expectancy mainly due to pulmonary fibrosis resulting from granulomatous inflammation. The lack of vascularization within pulmonary granulomas suggests that macrophages localized in the center of these structures are hypoxic. Hypoxia signaling pathways are known to be pro-inflammatory and pro-fibrotic in various pathological conditions. Recent data suggest an involvement of the

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : florence.jeny@aphp.fr (F. Jeny).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.02.006>

0761-8425/© 2020 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Pour citer cet article : Jeny F, et al. L'hypoxie est-elle un facteur impactant l'évolution de la sarcoïdose pulmonaire ?
Revue des Maladies Respiratoires (2020), <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.02.006>

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Respiratory Medicine

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/rmed>

Predictors of mortality in fibrosing pulmonary sarcoidosis

Florence Jeny^{a,b,*}, Yurdagül Uzunhan^{a,b,1}, Maxime Lacroix^c, Thomas Gille^{a,d},
 Pierre-Yves Brillet^{a,c}, Annyse Nardi^e, Diane Bouvry^{a,b}, Carole Planès^{a,d}, Hilario Nunes^{a,b},
 Dominique Valeyre^{a,b}

^a INSERM UMR 1272, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France^b AP-HP, service de pneumologie, hôpital Avicenne, Bobigny, France^c AP-HP, service de radiologie, hôpital Avicenne, Bobigny, France^d AP-HP, service de physiologie et explorations fonctionnelles, hôpital Avicenne, Bobigny, France^e Service de Pneumologie, CH Général Delafontaine, Saint-Denis, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Sarcoidosis
 Mortality
 Pulmonary fibrosis
 Pulmonary hypertension
 Prognosis

ABSTRACT

Introduction: Pulmonary fibrosing sarcoidosis is associated with increased mortality. This study was aimed to explore the prognosis value of a panel of parameters for predicting mortality.

Methods: This retrospective study included 216 patients with confirmed stage 4 pulmonary sarcoidosis. Stage 4 diagnosis date served as baseline. The following information was systematically present at baseline: epidemiological characteristics; treatments; pulmonary function; composite physiologic index (CPI); systolic pulmonary artery pressure at echocardiography; pulmonary fibrosis extent, main pulmonary artery/ascending aorta diameters ratio (MPAD/AAD) and MPAD/body surface area (BSA) measured and calculated using computed tomography, Walsh's algorithm based on CPI, lung fibrosis extent and MPAD/AAD ratio, and modified Walsh's algorithm with MPAD/BSA replacing MPAD/AAD allowed to estimate good or bad prognosis profiles. The primary outcome of the study was all cause mortality and lung transplantation. The value of baseline parameters was tested as predictors of mortality using univariate and multivariate analyses.

Results: Median follow-up was 105 months. There were 41 deaths and 5 transplantations. At multivariate analysis, survival was independently predicted by several parameters including CPI, lung fibrosis extent, pulmonary hypertension at echography or MPAD/BSA ratio, Walsh's algorithm, and geographic origin. The modified Walsh's algorithm was most highly predictive.

Conclusion: Survival was best predicted by geographic origin, lung fibrosis extent, PH at echography or MPAD/BSA ratio, as well as by various scores among them the modified Walsh's algorithm had very high predictive value thanks to MPAD/BSA ratio which accurately predicted mortality.

1. Introduction

A higher risk of mortality has been evidenced in sarcoidosis in several studies [1–6]. An excessive mortality rate does not apply to every sarcoidosis patient but concerns a subgroup of patients. This point has been very clearly shown in Rossides' study where mortality was increased in patients requiring sarcoidosis-specific treatment in the first 3 months while other patients had a normal survival [1]. In Western studies, death was often found associated to a significantly deteriorated pulmonary function [7,8], pulmonary fibrosis [8], and pre-capillary pulmonary hypertension [9–11] while cardiac sarcoidosis, particularly

in Japan [12,13] plays also a role [14]. The long-term use of treatments like corticosteroids, as shown in other chronic diseases like in rheumatoid arthritis [15–17] or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) might also increase mortality [18]. Comorbidities could also have an impact on mortality since the burden of comorbidities might be increased in sarcoidosis patients, particularly coronary artery disease, congestive heart disease, stroke, depression, diabetes and osteoporotic fractures, all conditions which *per se* have been associated to mortality risk [19,20].

Several factors may be simultaneously present in a same sarcoidosis patient (e.g., marked pulmonary function impairment, pulmonary

* Corresponding author. Hôpital Avicenne 125 rue de Stalingrad, 93009, Bobigny, France.

E-mail address: florence.jeny@aphp.fr (F. Jeny).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105997>

Received 9 January 2020; Received in revised form 14 April 2020; Accepted 27 April 2020

Available online 12 May 2020

0954-6111/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

fibrosis, pulmonary hypertension, cardiac sarcoidosis or long-term corticosteroid treatment). Thus, there is a need for determining exact elementary factors independently predictive of mortality. This is mandatory to identify as early as possible patients with high risk pulmonary sarcoidosis. Recently, predictors of mortality in pulmonary sarcoidosis were investigated in two large cohorts from referral centre populations [21,22]. Both studies showed that an extent of pulmonary fibrosis higher than 20% on thoracic high resolution computed tomography (HRCT) and pulmonary hypertension (PH) were independent predictive factors of mortality. PH was assessed using different means -one measuring the main pulmonary artery diameter to ascending aorta diameter ratio (MPAD/AAD) [21], and the other right heart catheterisation- [22]. Contradictory results were found for composite physiologic index (CPI) a weighted index of pulmonary function variables that correlates with the extent of interstitial disease on HRCT [23]. An algorithm combining CPI and the extent of pulmonary fibrosis on HRCT and MPAD/AAD ratio ("Walsh's algorithm") [21] or right catheterisation [22] was predictive of mortality in both studies, but only in univariate analysis in Kirkil's study [22]. Moreover, age was predictive in multivariate analysis and being black or having stage 4 chest radiographs in univariate analysis only in the Kirkil's study [22].

The aim of our study was to assess, in an extra cohort made of stage 4 sarcoidosis in a tertiary centre for sarcoidosis in Greater Paris (France), the value of predicting mortality factors including those tested in Walsh's and Kirkil's studies [21,22], particularly the algorithm defined by Walsh but also some other factors like PH estimated through echocardiography, frequently used in practice, and MPAD/body surface area ratio (BSA), which has been shown a better surrogate of PH measured by right catheterization in sarcoidosis [24]. Moreover, comorbidities and treatment were also investigated. As many sarcoidosis patients with increased mortality risk have pulmonary fibrosis [7,8], the study was focused on a group of stage 4 sarcoidosis patients.

2. Methods

2.1. Patients

This retrospective study was conducted in Pulmonary Department of Avicenne university hospital. The study received institutional review board approval (CLEA-2016-036). The requirement for signed informed consent was waived according to French legislation. The database of patients admitted to the pulmonary department with confirmed stage 4 sarcoidosis was searched for the 1988–2017 period. A minor part of the patients studied had been recruited for previous studies with a different design [8,25]. Diagnosis of sarcoidosis was confirmed according to the 1999 statement on sarcoidosis [26] and evidence of noncaseating granulomas was required. All patients included in the study had a pulmonary function test, chest HRCT and an echocardiography with an estimation of systolic pulmonary arterial pressure available at the time of stage 4 diagnosis.

2.2. Epidemiological data and investigations at baseline

Stage 4 diagnosis date was chosen as baseline. The following information was collected at baseline: age, sex, geographical origin, body mass index (BMI), body surface area (BSA) calculated from the simplified formula of Mosteller [27] $BSA (m^2) = \sqrt{\frac{Height(cm) \times Weight (kg)}{3600}}$, the presence or not of diabetes mellitus, cardiac sarcoidosis, treatment at baseline consisting of corticosteroids (<or >10 mg/day prednisone equivalent) or its combination with an immunosuppressant therapy. Smoking status was registered as "current smoker", "ever smoker" and "never smoker". "Ever smoker" applied when patients smoked more than one cigarette a day for more than 1 year.

The following data were also collected at baseline: forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1s (FEV1) and diffusing

capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) were expressed as % of predicted values. We calculated the CPI with the following formula: $CPI = 91 - (0,65 \times \text{percent predicted DLCO}) - (0,53 \times \text{percent predicted FVC}) + (0,34 \times \text{percent predicted FEV1})$ for every patient [21].

PH was defined by estimated systolic pulmonary artery pressure >35 mmHg on doppler echocardiography.

Chest radiography and HRCT were reviewed in concert by two radiologists (PYB and ML with a 15 and 3 years' experience on interstitial pneumonia imaging respectively). CT lung fibrosis extent was determined at 3 levels (upper, middle, lower part of the lungs) on both lungs according to Sumikawa [28]. The extent of fibrosis was rounded to the nearest 5%. Main pulmonary artery diameter (MPAD) and ascending aorta diameter (AAD) were assessed on HRCT. We also calculated MPAD/BSA ratio known to be also predictive of PH in sarcoidosis [24]. MPAD/AAD >1 and MPAD/BSA >16 were used as cut-off according to previous study [21,24].

The Walsh's algorithm [21] was applied (Fig. 1). CPI higher than 40 allowed to directly identify patients with a poor prognosis. Patients with CPI ≤40 were classified with a poor prognosis if they had on HRCT either MPAD/AAD >1, and/or the presence of pulmonary fibrosis >20%. All other patients were classified with a good prognosis. A "modified Walsh's algorithm" derived from Walsh's algorithm used MPAD/BSA >16 ratio instead of MPAD/AAD >1 ratio (Fig. 2).

2.3. Outcomes

The primary outcome was all cause mortality and lung transplantation. We calculated the survival period from baseline to the date of death or lung transplantation, or in the case of survivors to the last known contact. Vital status was known for all patients at the end of the study period.

2.4. Statistical analysis

Data were given as means (SD), medians (Q1; Q3) or as proportions expressed in percentages where appropriate. Mortality was assessed using a multivariate Cox proportional hazards model, with adjustments for age and gender (forced-in covariates). The proportional hazards assumption was checked using statistical tests based on the scaled Schoenfeld residuals. To avoid collinearity, different models were elaborated: Walsh's algorithms (original and modified) were analysed separately and apart CPI, extent of fibrosis or pulmonary hypertension assessment. PH at echography was analysed separately from MPAD/BSA, also because of collinearity. Candidate covariates were included for multivariate analyses if p value was <0.2. Covariates were selected with backward elimination. Survival curves were based on the Kaplan–Meier method. Analysis was performed using STATA (version 13, StataCorp, College Station, Texas). P-values <0,05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Flow chart and population characteristics

Fig. 1 shows the flow chart with a classification of patients at baseline according to the Walsh's algorithm while Fig. 2 shows the classification of patients at baseline according to the modified Walsh's algorithm (Figs. 1 and 2). We identified 298 stage 4 sarcoidosis patients referred to Pulmonology Department in Avicenne Hospital investigated from 1988 to 2016. Eighty-two patients were not included: 47 had no CT, 9 had no echocardiography, 12 had no CT and no echocardiography, 7 had no pulmonary function test and stage 4 was not confirmed in 7 patients by radiologists involved in the study. Thus, 216 patients made up the final study population. Thirty-five patients had never been treated, 38 were treated by prednisone with a daily dose lower than 10 mg, 79 were treated with a daily dose higher than 10 mg, 60 took

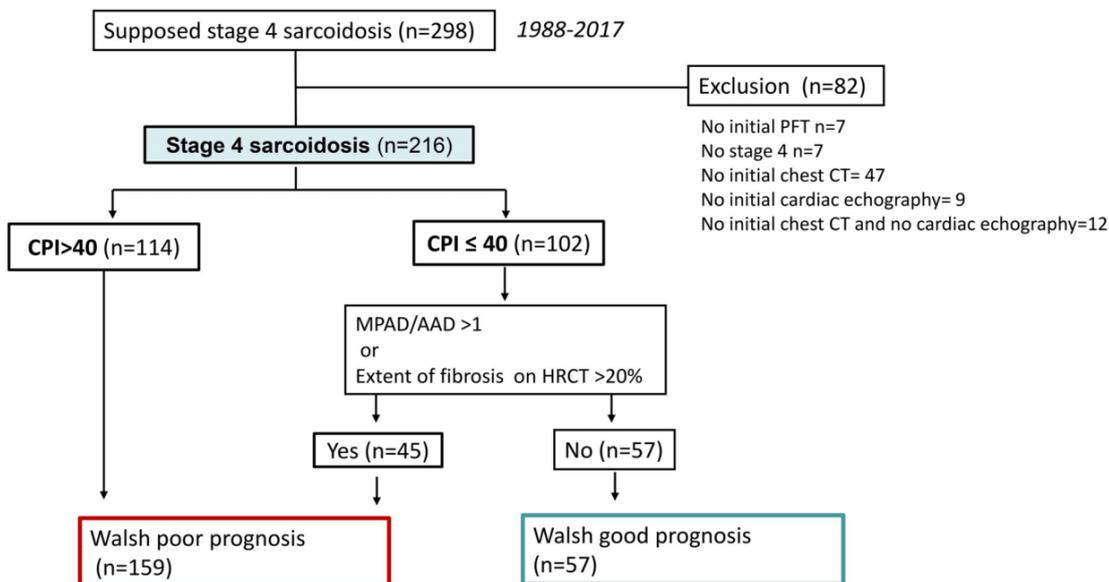


Fig. 1. Flow chart of patient selection and their classification according to Walsh's algorithm
Abbreviations: PFT pulmonary function test; HRCT: High resolution of Computed tomography, CPI: composite physiologic index; MPAD: mean pulmonary artery diameter; AAD: ascending aorta diameter.

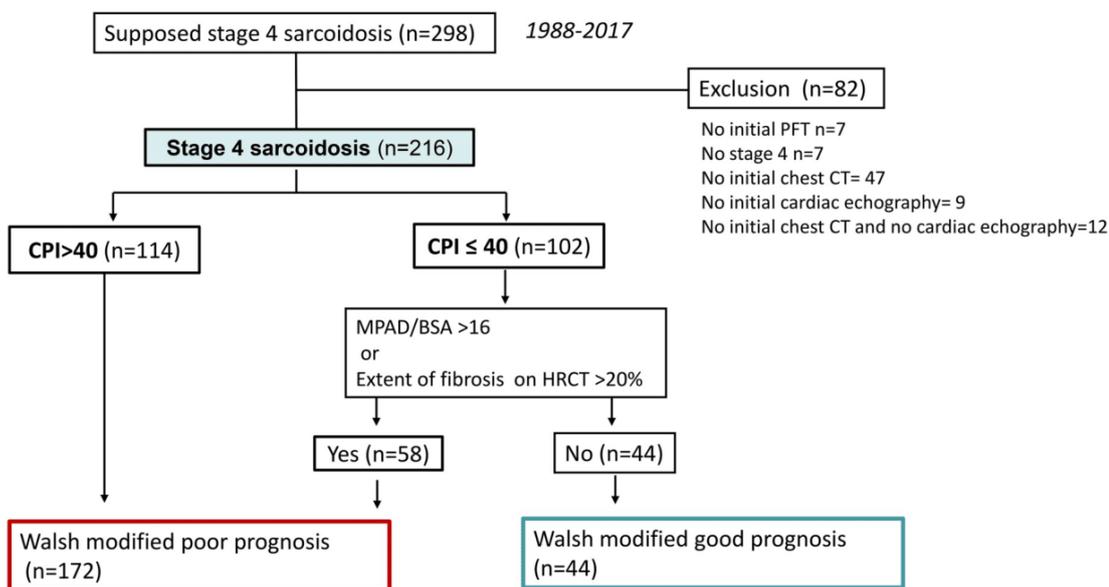


Fig. 2. Flow chart of patient selection and their classification according to modified Walsh's algorithm
Abbreviations: PFT pulmonary function test; HRCT: High resolution of Computed tomography, CPI: composite physiologic index; MPAD: mean pulmonary artery diameter; AAD: ascending aorta diameter.

immunosuppressive drugs while treatment was unknown for 4 patients.

Table 1 presents patients' characteristics collected at baseline. Forty-one patients died and 5 underwent lung transplantation. Survival at 1, 5, 10 and 15 years from baseline were respectively at 98.1%, 94.4%, 83.5% and 75.4%.

Median follow up was around 8 years. Of note, patients native from Sub-Saharan Africa or French West Indies had a higher mortality risk than other patients of the study despite a trend to be younger (see electronic supplement Table 1). They also had more often diabetes mellitus. Moreover, they had a higher CPI score, a higher pulmonary

fibrosis extent, while PH and O₂ supplementation were no more frequent than in other patients. A higher proportion of them also had a bad prognosis according to Walsh's algorithm (see electronic supplement Table 1).

3.2. Univariate analysis

Univariate cox regression survival analysis for "all cause" mortality was performed for different explanatory variables and are exhibited in Table 2.

Table 1
Patients' characteristics at stage 4 sarcoidosis diagnosis (n = 216).

Age	46 (37–54)
Sex (male)	118 (54.6%)
Geographical origin	
Europe	113 (52.3%)
Sub-Saharan Africa or French West Indies	57 (26.4%)
North Africa	39 (18%)
Asia	5 (2.3%)
Not stated	2 (0.9%)
Number of deaths/lung transplantation	41 (19%)/5 (2.3%)
Treatment	
No treatment	35 (16.2%)
Prednisone ≤ 10 mg/day	38 (17.6%)
Prednisone > 10 mg/day	79 (36.6%)
Immunosuppressive drugs	60 (27.8%)
Not stated	4 (1.9%)
Smoking status	
Never	133 (61.6%)
Ever	58 (26.8%)
Current	19 (8.8%)
Not stated	6 (2.8%)
Diabetes	35 (16.2%)
BMI	23.9 (21.2; 27.2)
Follow up (time in months)	105 (64.5; 187)
Cardiac sarcoidosis	30 (13.9%)
Pulmonary function	
FVC % predicted	69.2 (19.9)
FEV ₁ % predicted	61.3 (18.8)
DLCO % predicted	52.8 (18.9)
CPI	41 (29; 54)
O ₂ supplementation	23 (10.6%)
PH at echography	38 (17.6%)
HRCT	
Extent of fibrosis (% of total lung)	15 (10; 25)
MPAD/AAD	1 (0.9; 1.1)
MPAD/BSA	16.5 (14.7; 18.9)

Data are presented as n (%) or mean (sd) or median (Q1; Q3). FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; O₂: oxygen; CPI: composite physiologic index ($91.0 - (0.65 \times D_{LCO}) - (0.53 \times FVC) + (0.34 \times FEV_1)$); MPAD: mean pulmonary artery diameter; AAD: ascending aorta diameter; BSA: body surface area; HRCT: High resolution computed tomography; BMI Body mass index.

Being native from Sub-Saharan Africa or French West Indies, oxygen supplementation, extent of pulmonary fibrosis >20%, PH at echocardiography, and the different prognostic scores (CPI, Walsh's algorithm and modified Walsh's algorithm) were all predictive of mortality. However, other tested parameters, including sex, tobacco smoking, diabetes mellitus, sarcoidosis treatment at baseline or associated cardiac sarcoidosis were not found predictive of mortality. The proportional hazards assumption was not satisfied for age, making this factor uninterpretable in cox analysis.

The MPAD/BSA ratio was a mortality prognostic factor as well as PH at echocardiography while MPAD/AAD ratio was not. Median MPAD/BSA ratio was significantly higher in patients with echocardiography PH versus patients without (19.36 versus 16.26 p < 0,0001) (Mann Whitney test); median MPAD/AAD ratio was also significantly higher for patients with PH versus patients without (1,06 versus 1) (p < 0,001) (Mann Whitney test)). The previous cut-offs described by Walsh et al. [21] for CPI > 40; MPAD/AAD > 1 and extent of fibrosis >20% were applied in our population in a log rank analysis (Figs. 3 and 4) as other binary variables. Patients with a bad prognosis according to Walsh's algorithm or to a "modified Walsh's algorithm" by integrating MPAD/BSA >16 instead of MPAD/AAD >1 had a lower survival than those with a good prognosis (Fig. 4).

3.3. Multivariate analysis

The different models of multivariate analysis are shown in Table 3. To avoid collinearity CPI, Walsh's algorithm and modified Walsh's

Table 2
Univariate cox-regression survival analysis for all-cause mortality.

Variable	HR	95% CI	P value
Age (years)	1.02	1.00; 1.04	0.016
Sex (male)	1.41	0.78; 2.55	0.249
Geographical origin			
Europe	0.72	0.40; 1.29	0.27
Sub-Saharan Africa or FWI	2.12	1.18; 3.80	0.012
North Africa	0.51	0.2; 1.29	0.16
Treatment	0.82	0.6; 1.11	0.20
Smoker (ever and current)	0.82	0.42; 1.43	0.41
Diabetes	1.83	0.87; 3.83	0.11
BMI	0.95	0.88; 1.02	0.14
Cardiac sarcoidosis	1.20	0.47; 3.00	0.71
O ₂ supplementation	5.07	2.64; 9.72	< 0.001
Fibrosis > 20%	2.80	1.49; 5.28	0.001
PH on echocardiography	3.42	1.89; 6.20	< 0.001
MPAD/AAD > 1	1.49	0.83; 2.67	0.18
MPAD/BSA (mm.m-2) > 16	2.61	1.26; 5.42	0.01
CPI > 40	3.78	1.87; 7.64	< 0.001
Walsh poor prognosis	5.54	1.71; 17.94	0.004
Modified Walsh poor prognosis*	11.00	1.51; 80.06	0.02

Abbreviations: HR: Hazard ratio; CI confidence interval; O₂: oxygen; CPI: composite physiologic index; MPAD: mean pulmonary artery diameter; AAD: ascending aorta diameter; BSA: body surface area. FWI: French West Indies, BMI Body mass index, PH: pulmonary hypertension; * modified Walsh's algorithm" by integrating MPAD/BSA >16 instead of MPAD/AAD >1.

algorithm results were analysed separately.

The independent factors predictive of mortality in model 1 and 2 were Sub-Saharan Africa or French West Indies origin, Walsh poor prognosis and modified Walsh poor prognosis algorithm. Modified Walsh algorithm was highly predictive with a hazard ratio of 51 (IC 95% (4.42; 561.3) p = 0.001).

In model 3, PH at echocardiography (or according to MPAD/BSA >16 see electronic supplement Table n°2), CPI > 40, and fibrosis >20% were independent risk factors of mortality.

All these factors were predictive of mortality independently from age and sex, nevertheless the proportional hazards assumption was not satisfied for age.

4. Discussion

Attention is paid to advanced pulmonary sarcoidosis with important consequences on treatment. Following two important studies evidencing predictive factors of mortality in pulmonary sarcoidosis [21,22], we found interesting to look for predictive factors including most of those explored in these studies but also other ones including: (i) evaluation of pulmonary hypertension by echocardiography, largely used in clinical practice (ii) MPAD/BSA ratio that has recently been shown very promising for predicting PH at right catheterisation [24], and (iii) factors possibly involved in mortality risk like sarcoidosis treatments, associated cardiac sarcoidosis or diabetes mellitus [7,8,22].

Our study showed that: (i) CPI >40, pulmonary fibrosis extent > 20% at HRCT and PH at echocardiography or using MPAD/BSA ratio were independent predictors of mortality; (ii) Walsh's algorithm was confirmed predictive of mortality; (iii) strikingly, modified Walsh's algorithm taking into account MPAD/BSA instead of MPAD/AAD was highly predictive of mortality, with a higher hazard ratio and this was linked to the fact that the MPAD/BSA ratio was a good predictor of mortality while the MPAD/AAD ratio was not; (iv) patients native from Sub-Saharan Africa or French West Indies had a higher risk of mortality; (v) all other parameters, including sarcoidosis treatment, associated cardiac sarcoidosis and diabetes mellitus were not predictive.

Different approaches are used to explore mortality in sarcoidosis: autopsy studies [12], centre cohort studies [8,19,21,22], nation-wide register-based studies [1] and death-certificate based studies [2,3,11]. The epidemiology of sarcoidosis is very variable according to

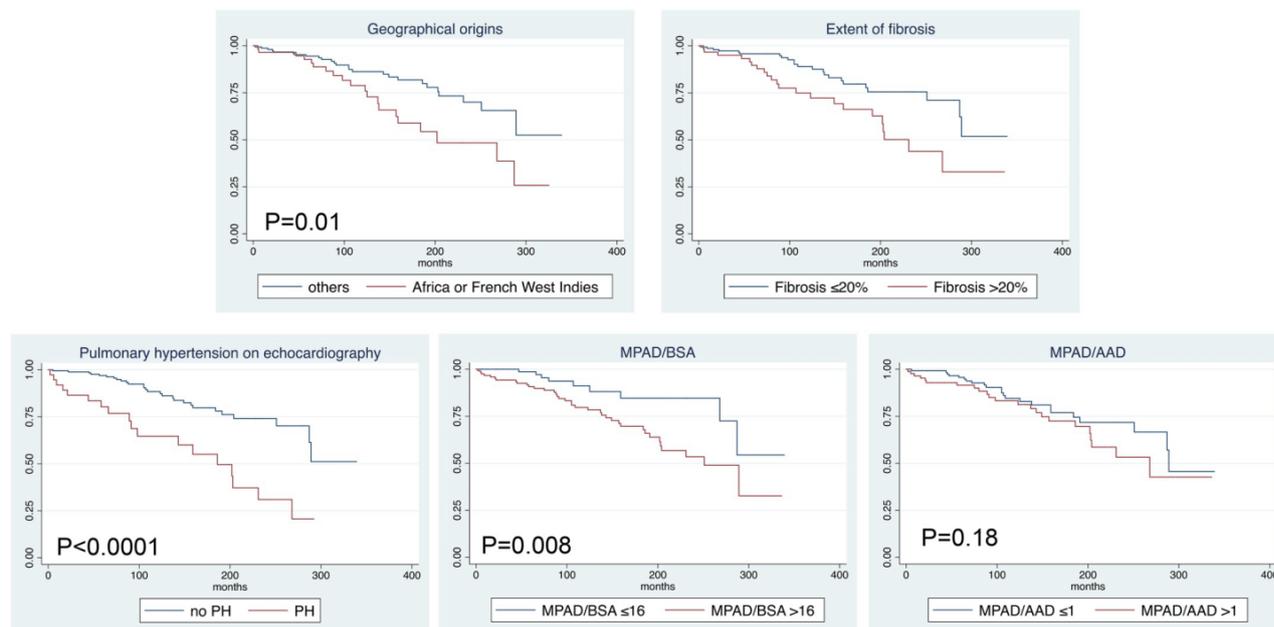


Fig. 3. Comparison of survival for various factors represented by Kaplan Meier curve (P represented the result of log rank test) MPAD: mean pulmonary artery diameter; AAD: ascending aorta diameter; BSA: body surface area. PH: Pulmonary hypertension on echocardiography defined by pulmonary artery pressure estimation >35 mmHg.

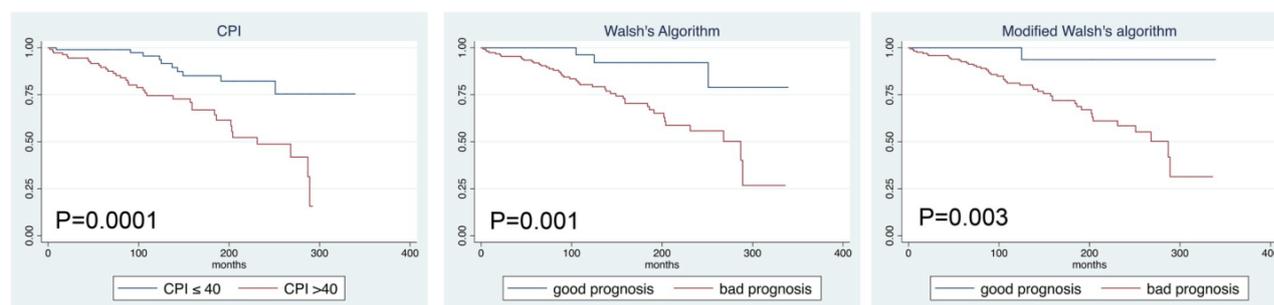


Fig. 4. Comparison of survival for scoring represented by Kaplan Meier curve P represented the result of log rank test. CPI Composite physiologic index. Walsh's algorithm according to Ref. [21]. Modified Walsh's algorithm, used MPAD/BSA ratio instead of MPAD/AAD ratio.

geography, gender and race [29–31], so are mortality rate and causes [5, 11, 22, 29]. In our study, natives from Sub-Saharan Africa or French West Indies had an increased sarcoidosis-related risk of mortality compared to grouped other patients, most of them born in Europe. This result is in line with Kirkil's and with Mirsaedi's studies evidencing a higher mortality risk in African Americans than in Caucasians, even though contrary to Mirsaedi patients native from Sub-Saharan Africa or French West Indies had no trend to have more PH than others in our series [11, 22]. In our study, 35% of Sub-Saharan Africans or French West Indian died or were transplanted vs 16.3% of other patients. At baseline, they tended to be younger, less frequently smokers and had more severe pulmonary fibrosis with both higher fibrosis extent percentage and higher CPI but the proportion of patients with PH, according either to echocardiography or to MPAD/BSA ratio was not significantly different. A worse prognosis predictor using Walsh's algorithm was also evidenced in this group of patients.

To be noted, we did not find a predictive value for mortality when considering baseline treatment or cardiac sarcoidosis. The rarity of cardiac sarcoidosis might explain this negative result. The adverse

impact of treatments, particularly corticosteroids might have been underestimated. However, death in patients with advanced pulmonary sarcoidosis is usually linked to underlying sarcoidosis [8, 22]. The evidence of an increased mortality risk due to long-term corticosteroid treatment observed in rheumatoid arthritis and COPD is not necessarily transposable to sarcoidosis but deserves further investigation on larger series with a longer follow up.

Our study patients were recruited in a sarcoidosis tertiary referral centre in Greater Paris, France. Compared to those in Walsh's and Kirkil's studies, our patients had more advanced pulmonary disease: mean CPI was 41 instead of 34.3; Oxygen supplementation concerned 10.6% instead of 8%; a 18.3% fibrosis extent was observed instead of 15%, and 21.3% died instead of 20% in Walsh's study. In Kirkil's study, 8.4% of patients died. Interestingly, in Kirkil's study, despite a higher mortality in radiological stage 4, some patients at other radiological stages, particularly stage 3, died. However, these two studies used as baseline the diagnosis of sarcoidosis to calculate survival, and not the stage 4 diagnosis as in our study, making a methodological difference for comparing survival.

Table 3
Multivariate cox regression survival analysis for all-cause mortality in different models.

	Variable	HR	%95 CI	P value
Model 1	Walsh poor prognosis	13.6	3.09; 59.25	<0.001
	Age	1.05	1.02; 1.07	<0.001
	Sex (Male)	1.41	0.77; 2.56	0.26
	Sub-Saharan Africa or FWI	2.29	1.25; 4.18	0.007
Model 2	Modified Walsh poor prognosis*	51	4.42; 561.3	0.001
	Age	1.06	1.03; 1.09	<0.001
	Sex (Male)	1.59	0.87; 2.90	0.15
	Sub-Saharan Africa or FWI	2.52	1.35; 4.71	0.04
Model 3	Age	1.04	1.02; 1.06	0.001
	Sex (Male)	1.71	0.92; 3.14	0.09
	CPI>40	3.31	1.51; 7.26	0.003
	PH at echocardiography	2.22	1.15; 4.28	0.02
	Fibrosis >20%	1.98	1.02; 3.84	0.04

Abbreviations: HR: Hazard ratio; CI confidence interval, CPI: composite physiologic index; * *modified Walsh's algorithm* by integrating MPAD/BSA>16 instead of MPAD/AAD>1; MPAD: mean pulmonary artery diameter; AAD: ascending aorta diameter; BSA: body surface area FWI: French West Indies; PH: Pulmonary hypertension at echography defined by pulmonary artery pressure estimation>35 mmHg

The impact of PH on mortality was confirmed in our study, interestingly while we used another approach: in Walsh's study PH diagnosis was based on MPAD/AAD ratio [21], while it relied on right catheterisation in Kirkil's study [22]. In our study, it was evidenced through echocardiography and MPAD/BSA ratio. Interestingly, in our cohort MPAD/BSA ratio, well correlated to echocardiography, was predictive of mortality while MPAD/AAD ratio despite also correlated to PH at echography was not. It is in line with the study by Huitema et al. [24] indicating that MPAD/BSA ratio might be the most accurate predictor of PH on CT in patients with pulmonary sarcoidosis.

When using models for multivariate survival analysis, the modified Walsh's algorithm Hazard ratio was found very impressive. It must be emphasized that it is an easy-practice tool. Thus, the measure of MPAD/BSA might be recommended in clinical practice allowing to improve Walsh's algorithm. It might help the detection of patients more at risk and help consider patients for transplantation. Several patients who died from pulmonary sarcoidosis might have benefited from this algorithm leading to a lung transplantation all the more as they were often in the age range making it possible [32]. Moreover, the opportunity to select patients with sarcoidosis pulmonary fibrosis and a bad prognosis on modified Walsh's algorithm might facilitate the design of new treatment trials, for example with antifibrotic drugs.

There were several limitations in our study. It was retrospective and monocentric.

Only patients with stage 4 patients were studied. This condition is associated to increased mortality but it has been shown that an increased risk of mortality may also be encountered in some stage 3 patients particularly those with associated PH [22]. While pulmonary hypertension is most often associated with pulmonary fibrosis in sarcoidosis, a significant proportion of cases with pulmonary hypertension may have less advanced radiologic changes. In the multi-national registry for sarcoidosis associated pulmonary hypertension nearly 25% of patients had a radiological stage 2 or 3 [33].

The diagnosis of pulmonary hypertension in our study was not determined by right heart catheterization, an invasive procedure, but only estimated with a systolic pulmonary artery pressure>35 mmHg at echocardiography. Measurement of systolic pulmonary artery pressure was not possible in some cases, and the diagnosis of pulmonary hypertension on echography may have been underestimated. Similarly, we did not take into account the presence of indirect signs of pulmonary hypertension such as right ventricle dilatation.

As our assessment of treatments at baseline was retrospective, some

information like cumulative doses of prednisone were not available, preventing us from estimating with accuracy the impact of treatments on mortality. Finally, some points were not investigated like personal income or occupational and environmental risks which might have given interesting information and might have impacted the mortality risk [34].

5. Conclusion

This study on radiological stage 4 sarcoidosis clearly showed that mortality could be predicted in patients with CPI>40, lung fibrosis extent >20% and PH. High MPAD/BSA ratio at HRCT appeared a good predictor of PH and of mortality. Modified Walsh's algorithm using MPAD/BSA ratio was shown a very accurate predictive index of mortality.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRedit authorship contribution statement

Florence Jeny: Writing - original draft, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Visualization. **Yurdagül Uzunhan:** Writing - original draft, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Visualization. **Maxime Lacroix:** Writing - review & editing, Investigation. **Thomas Gille:** Writing - review & editing, Investigation. **Pierre-Yves Brillet:** Writing - review & editing, Investigation, Resources. **Annelise Nardi:** Writing - review & editing, Investigation, Resources. **Diane Bouvry:** Writing - review & editing, Resources. **Carole Planès:** Writing - review & editing, Resources. **Hilario Nunes:** Writing - review & editing, Conceptualization, Resources, Supervision. **Dominique Valeyre:** Writing - original draft, Writing - review & editing, Conceptualization, Resources, Supervision.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105997>.

References

- [1] M. Rossides, S. Kullberg, J. Asklund, A. Eklund, J. Grunewald, E.V. Arkema, Sarcoidosis mortality in Sweden: a population-based cohort study, *Eur. Respir. J.* 51 (2) (2018 Feb 1) 1701815.
- [2] Y. Jamilloux, D. Maucort-Boulch, S. Kerever, M. Gerfaud-Valentin, C. Broussolle, M. Eb, et al., Sarcoidosis-related mortality in France: a multiple-cause-of-death analysis, *Eur. Respir. J.* 48 (6) (2016) 1700–1709.
- [3] J.J. Swigris, A.L. Olson, T.J. Huie, E.R. Fernandez-Perez, J. Solomon, D. Sprunger, et al., Sarcoidosis-related mortality in the United States from 1988 to 2007, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (11) (2011 Jun 1) 1524–1530.
- [4] J.M. Reich, Mortality of intrathoracic sarcoidosis in referral vs population-based settings: influence of stage, ethnicity, and corticosteroid therapy, *Chest* 121 (1) (2002 Jan) 32–39.
- [5] J.E. Park, Y.S. Kim, M.J. Kang, C.J. Kim, C.H. Han, S.M. Lee, et al., Prevalence, incidence, and mortality of sarcoidosis in Korea, 2003–2015: a nationwide population-based study, *Respir. Med.* 144S (2018 Nov) S28–S34.
- [6] J. Gribbin, R.B. Hubbard, I. Le Jeune, C.J.P. Smith, J. West, L.J. Tata, Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK, *Thorax* 61 (11) (2006 Nov) 980–985.
- [7] R.P. Baughman, D.B. Winget, E.H. Bowen, E.E. Lower, Predicting respiratory failure in sarcoidosis patients, *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. Off. J. WASOG* 14 (2) (1997 Sep) 154–158.
- [8] A. Nardi, P.-Y. Brillet, P. Letoumelin, F. Girard, M. Brauner, Y. Uzunhan, et al., Stage IV sarcoidosis: comparison of survival with the general population and causes of death, *Eur. Respir. J.* 38 (6) (2011 Dec) 1368–1373.
- [9] R.P. Baughman, P.J. Engel, L. Taylor, E.E. Lower, Survival in sarcoidosis-associated pulmonary hypertension: the importance of hemodynamic evaluation, *Chest* 138 (5) (2010 Nov 1) 1078–1085.

- [10] A. Boucly, V. Cottin, H. Nunes, X. Jais, A. Tazi, G. Prévôt, et al., Management and long-term outcomes of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension, *Eur. Respir. J.* 50 (4) (2017).
- [11] M. Mirsaedi, R.F. Machado, D. Schraufnagel, N.J. Sweiss, R.P. Baughman, Racial difference in sarcoidosis mortality in the United States, *Chest* 147 (2) (2015 Feb) 438–449.
- [12] K. Iwai, M. Sekiguti, Y. Hosoda, R.A. DeRemee, H.D. Tazelaar, O.P. Sharma, et al., Racial difference in cardiac sarcoidosis incidence observed at autopsy, *Sarcoidosis* 11 (1) (1994 Mar) 26–31.
- [13] Y. Yazaki, M. Isobe, M. Hiroe, S. Morimoto, S. Hiramitsu, T. Nakano, et al., Prognostic determinants of long-term survival in Japanese patients with cardiac sarcoidosis treated with prednisone, *Am. J. Cardiol.* 88 (9) (2001 Nov 1) 1006–1010.
- [14] Y. Zhou, E.E. Lower, H.-P. Li, A. Costea, M. Attari, R.P. Baughman, Cardiac sarcoidosis: the impact of age and implanted devices on survival, *Chest* 151 (1) (2017 Jan) 139–148.
- [15] M. Chester Wasko, A. Dasgupta, G. Ilse Sears, J.F. Fries, M.M. Ward, Prednisone use and risk of mortality in patients with rheumatoid arthritis: moderation by use of disease-modifying antirheumatic drugs, *Arthritis Care Res.* 68 (5) (2016) 706–710.
- [16] I. del Rincón, D.F. Battafarano, J.F. Restrepo, J.M. Erikson, A. Escalante, Glucocorticoid dose thresholds associated with all-cause and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66 (2) (2014 Feb) 264–272.
- [17] M. Movahedi, R. Costello, M. Lunt, S.R. Pye, J.C. Sergeant, W.G. Dixon, Oral glucocorticoid therapy and all-cause and cause-specific mortality in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective cohort study, *Eur. J. Epidemiol.* 31 (10) (2016) 1045–1055.
- [18] A.M. Schols, G. Wesseling, A.D. Kester, G. de Vries, R. Mostert, J. Slangen, et al., Dose dependent increased mortality risk in COPD patients treated with oral glucocorticoids, *Eur. Respir. J.* 17 (3) (2001 Mar) 337–342.
- [19] P. Ungprasert, E.L. Matteson, C.S. Crowson, Increased risk of multimorbidity in patients with sarcoidosis: a population-based cohort study 1976 to 2013, *Mayo Clin. Proc.* 92 (12) (2017 Dec) 1791–1799.
- [20] A. Nowiński, E. Puścińska, A. Goljan, J. Peradzynska, M. Bednarek, D. Korzybski, et al., The influence of comorbidities on mortality in sarcoidosis: a observational prospective cohort study, *Clin. Res. J.* 11 (5) (2017 Sep) 648–656.
- [21] S.L. Walsh, A.U. Wells, N. Sverzellati, G.J. Keir, L. Calandriello, K.M. Antoniou, et al., An integrated clinicoradiological staging system for pulmonary sarcoidosis: a case-cohort study, *Lancet Respir. Med.* 2 (2) (2014 Feb) 123–130.
- [22] G. Kirkil, E.E. Lower, R.P. Baughman, Predictors of mortality in pulmonary sarcoidosis, *Chest* 153 (1) (2018 Jan) 105–113.
- [23] A.U. Wells, S.R. Desai, M.B. Rubens, N.S.L. Goh, D. Cramer, A.G. Nicholson, et al., Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (7) (2003 Apr 1) 962–969.
- [24] M.P. Huitema, M. Spee, V.M.M. Vorseleers, S. Boerman, R.J. Snijder, H.W. van Es, et al., Pulmonary artery diameter to predict pulmonary hypertension in pulmonary sarcoidosis, *Eur. Respir. J.* 47 (2) (2016 Feb) 673–676.
- [25] Y. Uzunhan, H. Nunes, F. Jeny, M. Lacroix, S. Brun, P.-Y. Brillet, et al., Chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis, *Eur. Respir. J.* 49 (6) (2017).
- [26] Statement on sarcoidosis. Joint statement of the American thoracic society (ATS), the European respiratory society (ERS) and the world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders (WASOG) adopted by the ATS board of directors and by the ERS executive committee, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160 (2) (1999 Aug) 736–755. February 1999.
- [27] R.D. Mosteller, Simplified calculation of body-surface area, *N. Engl. J. Med.* 317 (17) (1987 Oct 22) 1098.
- [28] H. Sumikawa, T. Johkoh, T.V. Colby, K. Ichikado, M. Suga, H. Taniguchi, et al., Computed tomography findings in pathological usual interstitial pneumonia: relationship to survival, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177 (4) (2008 Feb 15) 433–439.
- [29] O. Dumas, L. Abramovitz, A.S. Wiley, Y.C. Cozier, C.A. Camargo, Epidemiology of sarcoidosis in a prospective cohort study of U.S. Women, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 (1) (2016 Jan) 67–71.
- [30] B. Duchemann, I. Annesi-Maesano, C. Jacobe de Naurois, S. Sanyal, P.-Y. Brillet, M. Brauner, et al., Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris, *Eur. Respir. J.* 50 (2) (2017).
- [31] E.V. Arkema, J. Grunewald, S. Kullberg, A. Eklund, J. Askling, Sarcoidosis incidence and prevalence: a nationwide register-based assessment in Sweden, *Eur. Respir. J.* 48 (6) (2016) 1690–1699.
- [32] Z. Taimeh, M.I. Hertz, S. Shumway, M. Pritzker, Lung transplantation for pulmonary sarcoidosis. Twenty-five years of experience in the USA, *Thorax* 71 (4) (2016 Apr) 378–379.
- [33] O.A. Shlobin, V. Kouranos, S.D. Barnett, E.H. Alhamad, D.A. Culver, J. Barney, et al., Physiological predictors of survival in patients with sarcoidosis associated pulmonary hypertension: results from an international registry, *Eur. Respir. J.* 1901747 (2020 Mar 26).
- [34] L.J. Harper, A.K. Gerke, X.-F. Wang, M.L. Ribeiro Neto, R.P. Baughman, K. Beyer, et al., Income and other contributors to poor outcomes in US sarcoidosis patients, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201 (8) (2019 Apr 15) 955–964.

Annexe 6 : liste des autres travaux publiés pendant la thèse

Articles en langue anglaise

1. Nunes H, **Jeny F**, Bouvry D, Picard C, Bernaudin J-F, Ménard C, et al. Pleuroparenchymal fibroelastosis associated with telomerase reverse transcriptase mutations. *Eur Respir J*. 2017 May;49(5).
2. Uzunhan Y, Nunes H, **Jeny F**, Lacroix M, Brun S, Brillet P-Y, et al. Chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2017 Jun;49(6).
3. Valeyre D, **Jeny F**, Nunes H. Current Medical Therapy for Sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2017 Aug;38(4):523–31.
4. Uzunhan Y, **Jeny F** (premier auteur ex-aequo), Kambouchner M, Didier M, Bouvry D, Nunes H, et al. The Lung in Dysregulated States of Humoral Immunity. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 2017;94(5):389–404.
5. Bernard O, **Jeny F**, Uzunhan Y, Dondi E, Terfous R, Label R, et al. Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signalings. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017 Nov 22;ajplung.00153.2017.
6. Besnard V, Calender A, Bouvry D, Pacheco Y, Chapelon-Abrieu C, **Jeny F**, Nunes H, Planès C, Valeyre D G908R NOD2 variant in a family with sarcoidosis. *Respir Res*. 2018 Mar 20;19(1):44.
7. **Jeny F**, Brillet P-Y, Kim Y-W, Freynet O, Nunes H, Valeyre D. The place of high-resolution computed tomography imaging in the investigation of interstitial lung disease. *Expert Rev Respir Med*. 2019 Jan;13(1):79–94.
8. Alfaro TM, Moor CC, Alfieri V, **Jeny F**, Kreuter M, Wijssenbeek MS, Renzoni EA, Bargagli E, Nunes H, Spagnolo P, Bonella F, Molina-Molina M, Antoniou K, Poletti V. Research highlights from the 2018 ERS International Congress: interstitial lung diseases. *ERJ Open research* 2019 accepted (NC-NC)
9. Nunes H, **Jeny F**, Bouvry D, Uzunhan Y, Valeyre D. Indications for treatment of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med*. sept 2019;25(5):505-18.
10. Trosini Desert V, **Jeny F**, Maksud P, Giron A, Degos, V, Similowski T Contribution of endobronchial ultrasound elastography to the characterization of mediastinal lymphadenopathy: A single-center, prospective observational study. *Respir Med Res* 76: 28-33; nov 2019
11. **Jeny F**, JF Bernaudin, F Cohen Aubart, PY Brillet, D Bouvry, H. Nunes, D. Valeyre. Diagnosis issues in sarcoidosis. *Respir Med Res* Oct 28;77:37-45.
12. Chauveau S, **Jeny F**, Montagne M-E, Taam RA, Houdouin V, Meinzer U, et al. Child-Adult Transition in Sarcoidosis: A Series of 52 Patients. *J Clin Med*. 3 juill 2020;9(7).
13. Sesé L, Khamis W, **Jeny F**, Uzunhan Y, Duchemann B, Valeyre D, et al. Adult interstitial lung diseases and their epidemiology. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. juin 2020;49(2):104023.
14. **Jeny F**, Lhote R, Lorillon G, Belhomme N, Pugnet G, Borie R, Justet A, Jouneau S, Freymond N, Mekinian A, Dhote R, Tandjaoui-Lambiotte Y, Saindenberg N, Gazengel P, Hervier B, Haroche J, Mathian A, Hié M, Chazal T, Taieb D, Uzunhan Y, Le Pavec J, Annesi-Maesano I, Bergot E, Tazi A, Amoura Z, Valeyre D, Nunes H, Cohen-Aubart F. Correspondence on 'Glucocorticoid-induced relapse of COVID-19 in a patient with sarcoidosis'. *Ann Rheum Dis*. 2020 Oct

Articles en langue française

1. **Jeny F**, Valeyre D Sarcoïdose Mise au point. *Revue du praticien. Rev Prat*. 2019 Jan;69(1):83-95.
2. Sesé L, **Jeny F**, Uzunhan Y, et al. Rôle de la pollution au cours des pneumopathies interstitielles diffuses [The effect of air pollution in diffuse interstitial lung disease] *Rev Mal Respir*. 2020;S0761-8425(20)30091-7.

Articles non indexés PUBMED

1. **Jeny F**, Didier M, Bouvry D, Valeyre D, Nunes H. Le poumon de la sarcoïdose. *Revue du Rhumatisme Monographie Poumon et Rhumatisme vol 85, Issue 3, Pages 145-232 (June 2018)*.
2. **Jeny F**, Didier M, Nunes H, Valeyre D ; « Sarcoïdose ». *La Revue du Praticien - Médecine Générale | N° : 992 | Pages : 875-80 | Rubrique éditoriale : DOSSIER 2018*
3. **Jeny F**, Valeyre D ; Syndrome parasarcoïdien. *Le quotidien du médecin*, 6 mai 2019.

Chapitres de livres de langue anglaise

1. Valeyre D, **Jeny F**, Freynet O, Nunes H, Key diagnostic issues. *ERS Book, Idiopathic Pulmonary fibrosis 2016*.

2. Valeyre D, Nunes H, **Jeny F**, Mahévas M, Judson M. Sarcoidosis extra pulmonary manifestations. Clinical handbook of interstitial lung disease edited by M. Thillai, David R. Moller, K. C. Meyer. Nov 2017.
3. Bernaudin JF, Moguelet P, **Jeny F**, Besnard V, Valeyre D, Kambouchner M. Pathology of granuloma. Sarcoidosis a clinician's guide. RP Baughman, D Valeyre. Elsevier 7dec 2018.
4. Valeyre D, **Jeny F**, Bouvry D, Uzunhan Y, Nunes H, Bernaudin JF. Evaluation of pulmonary sarcoidosis. Sarcoidosis a clinician's guide. RP Baughman, D Valeyre. Elsevier 7dec 2018.
5. Rech JS, Brillet PY, **Jeny F**, Kambouchner M, Nunes H, Arnulf B, Valeyre D, Uzunhan Y, Amyloidosis and the lung. ERS monograph, Pulmonary manifestations of systemic disease, 2019

Chapitres de livre de langue française

1. Bouvry, D, **Jeny F**, Valeyre D, Nunes H. Pneumologie fondée sur les preuves 5e Edition Sarcoidose pulmonaire. Publication 2017.
2. Gille T, **Jeny F**, Planès. Explorations fonctionnelles respiratoires de repos, Traité de médecine de Guillemin L (2017) Tome 2.
3. Valeyre D, Uzunhan Y, **Jeny F**, Nunes H. Sarcoïdose Traité de médecine de Guillemin L (2016) Tome 1
4. Brillet PY, Levand K, Moya L, Debray MP, **Jeny F**, Valeyre D, Brauner M. chapitre pneumopathie interstitielle idiopathique, Imagerie thoracique de l'adulte Grenier P. 4^e édition 2017.
5. Valeyre D, **Jeny F**, Uzunhan Y, Brillet PY, Nunes H, Bernaudin JF Pneumopathies interstitielles diffuses. Diagnostics difficiles en médecine interne Masson (sous presse).
6. Valeyre, D, Uzunhan Y, **Jeny F**, Nunes H. Sarcoïdose. Chapitre S03-P01-C23. 5e Edition du Traité de médecine

Résumé

La sarcoïdose, est une granulomatose systémique d'étiologie inconnue, touchant préférentiellement l'appareil respiratoire intrathoracique. La formation des granulomes serait due à une réaction immunitaire disproportionnée, face à un/des antigène(s) inconnu(s) chez un sujet génétiquement prédisposé. L'évolution du granulome est extrêmement variable allant de la résolution spontanée, à sa persistance et parfois son évolution vers la fibrose sans que les mécanismes ne soient compris. Du fait de l'absence de vascularisation au niveau du centre des granulomes pulmonaires, les macrophages constitutifs de ces structures se trouvent très probablement en hypoxie. Nous formulons l'hypothèse qu'un microenvironnement hypoxique pourrait favoriser le maintien du granulome et son évolution vers la fibrose au cours de la sarcoïdose.

Dans un premier travail nous avons analysé l'effet de l'hypoxie (FiO₂ : 1,5% pendant 24 heures) *in vitro* sur macrophages dérivés de monocytes sanguins humains (hMDM) issus de patients atteints de sarcoïdose pulmonaire active ou inactive et de témoins sains. L'hypoxie augmentait de façon plus importante en cas de sarcoïdose active : l'activité transactivatrice de HIF-1 α , la réponse pro-inflammatoire (TNF α , IL1 β , IL8), sans activation de NF- κ B (p65, p50) et la réponse pro fibrosante des hMDM avec une sécrétion de PAI-1. PAI-1 était associé à une inhibition de la migration de fibroblastes pulmonaires humains. Ces résultats étaient associés à la présence de HIF-1 α et PAI-1 en immunohistochimie dans les granulomes pulmonaires de biopsies de patients. L'hypoxie diminuait la phagocytose et l'expression du récepteur *scavenger* CD36 chez les témoins mais pas chez les patients atteints de sarcoïdose. L'hypoxie diminuait aussi l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et de HLA-DR dans les formes actives de sarcoïdose.

Dans un deuxième travail nous avons étudié l'effet de l'hypoxie (Hx) prolongée (15 jours) dans des modèles *in vivo* de granulomatose pulmonaire induite chez la souris (C57BL/6J) par les nanotubes de carbones (NT) et le *Propionibacterium acnes* (PA)

Le groupe NT exposé à l'hypoxie présentait plus de souris avec granulomes que le groupe NT exposé à la normoxie. En revanche, le groupe PA exposé à l'hypoxie présentait une tendance à la diminution des granulomes par rapport au groupe PA exposé à la normoxie. Les ARNm de l'*Il18*, *Il12b* et *Tnfa* du groupe NT/Hypoxie étaient augmentés par rapport aux autres groupes (p<0,05). L'hypoxie diminuait l'expression de *Ccl4* et de *Cxcl9* chez les souris PA (p<0,05). Dans les deux modèles, les souris sous hypoxie présentaient des lésions de fibrose. La double exposition NT/Hx augmentait l'expression de *Pdgfb*, par rapport aux souris NT/Nx (p<0,05) et aux souris PBS/Nx (p<0,01). Enfin, une expression de HIF-1 α a également été retrouvée au sein des granulomes dans les deux modèles.

La réponse à l'hypoxie des macrophages de patients atteints de sarcoïdose pulmonaire en particulier ceux des formes actives est caractérisée par une réponse pro-inflammatoire, une réponse pro-fibrosante, pro-angiogénique et une phagocytose plus importante que les témoins ou les patients ayant une maladie peu active. En fonction de l'antigène utilisé pour induire une granulomatose pulmonaire dans des modèles murins, l'hypoxie semble moduler la formation des granulomes pulmonaires et la fibrose en induisant ou inhibant l'expression de cytokines impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires. L'hypoxie pourrait donc bien être un facteur favorisant le maintien du granulome et son évolution vers la fibrose.

Abstract

Sarcoidosis is a systemic granulomatosis of unknown etiology, preferentially affecting the lung. Granuloma formation is thought to be due to a disproportionate immune response to unknown antigen(s) in a genetically predisposed individual. The evolution of the granuloma is variable, ranging from spontaneous resolution to evolution towards fibrosis with still quite unknown mechanisms. Due to the lack of vascularization in the center of granulomas observed in pulmonary biopsies, the macrophages constituting these structures are most likely hypoxic. We hypothesize that a hypoxic microenvironment could favor the maintenance of the granuloma and its evolution towards fibrosis during sarcoidosis.

Firstly, we analyzed the effect of hypoxia (FiO₂: 1.5% for 24 hours) *in vitro* on human blood monocyte-derived macrophages (hMDM) from patients with active or inactive pulmonary sarcoidosis and from healthy controls. Hypoxia increased more significantly in active sarcoidosis the activity of HIF-1 α , the pro-inflammatory response (TNF α , IL1 β , IL8), without NF-kB activation (p65, p50) and the pro-fibrotic response with PAI-1 secretion associated with inhibition of human lung fibroblast migration. These findings were associated with the presence of HIF-1 α and PAI-1 on immunohistochemistry analysis of lung granulomas biopsies. Hypoxia decreased phagocytosis and CD36 scavenger receptor expression in controls but not in sarcoidosis patients. Hypoxia also decreased the expression of CD80/CD86 co-stimulatory molecules and HLA-DR in active forms of sarcoidosis.

Secondly, we studied the effect of prolonged hypoxia (Hx) (15 days) in two *in vivo* models of murine (C57BL/6J) pulmonary granulomatosis induced by carbon nanotubes (NT) and *Propionibacterium acnes* (PA).

In the NT group exposed to hypoxia more granulomas were observed than in the NT group exposed to normoxia. In contrast, the PA group exposed to hypoxia showed a trend toward fewer granulomas compared with the PA group exposed to normoxia. *Il18*, *Il12b* and *Tnfa* mRNAs in the NT/Hypoxia group were increased compared to the other groups (p<0.05). Hypoxia decreased *Ccl4* and *Cxcl9* expression in PA mice (p<0.05). In both models, mice under hypoxia showed fibrosis lesions. Double exposure NT/Hx increased *Pdgfb* expression, compared with NT/Nx mice (p<0.05) and PBS/Nx mice (p<0.01). Finally, HIF-1 α expression was also detected within the granulomas in both models exposed to hypoxia.

The response to hypoxia of macrophages from patients with pulmonary sarcoidosis, in particular the active forms, is characterized by a pro-inflammatory response, a pro-fibrosis response, a pro-angiogenic response and a more important phagocytic activity than controls or patients with a less active disease. Depending on the antigen used to induce pulmonary granulomatosis in mouse models, hypoxia seems to modulate pulmonary granuloma formation and fibrosis by inducing or inhibiting the expression of cytokines involved in the recruitment of inflammatory cells. Hypoxia could be a factor favoring the maintenance of granuloma and its evolution towards fibrosis.